15

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

"Purificación de antígenos específicos de *Leishmania mexicana mexicana* usando una columna de intercambio iónico, reconocidos por sueros de pacientes con leishmaniasis".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CLAUDIA FABIOLA MARTINEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR: Q.F.B. LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXIÓN

MÉXICO, D.F. **Octubre 2000.**

284431

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

DEDICATORIA.

A mis padres, Sofía y Manuel por ser lo más bello que tengo, por creer en mí SIEMPRE, y estar a mi lado en cada momento maravilloso e inolvidable de mi vida. Por darme la mejor herencia: MI CARRERA, en la que hemos compartido risas, lágrimas, desvelos, sacrificios, buenos y malos ratos, pero hoy llegamos a la meta juntos.

Por todo su amor, confianza, paciencia, apoyo incondicional, pero sobretodo por ser:

Mis padres.....GRACIAS¡¡.

A mis hermanas, Rosalía y Paola por ser parte de mi vida y de todo esto, porque han sufrido algunas o casi todas las consecuencias de mis buenos y malos ratos. Gracias **pequitas y bodoque** por soportarme, apoyarme, comprenderme, ayudarme y darle a mi vida su presencia.

A mi tía Rebequita por ser un ser humano incomparable, lleno de nobleza y comprensión hacia los demás, por estar conmigo animándome y queriéndome siempre.....GRACIAS.

A la memoria de mis abuelos: Eduwiges, José, Jovita y Román, por que dondequiera que se encuentren, siempre están en mi mente y en mi corazón, y sé que desde alguna parte comparten todos los momentos importantes y hermosos de mi vida.

A mis tíos (as) y primos (as), por que han estado conmigo de una u otra manera, dándome cariño y apoyo. A cada uno de ustedes, todo mi cariño y agradecimiento.

A mis profesores del laboratorio L-313, Dr. Rubén Marroquín, Q.B.P. Dora A. Pérez, MC. Maurilio Flores, Q.B.P. Ruth Paz, Q.F.B. Yolanda Flores, Q.F.B. Luis Mora, MC. Ricardo Calvillo, por que todos y cada uno de ellos son personas bellísimas, que sin ningún interés transmiten todo lo que saben, no solo en el campo científico sino también como seres humanos. Gracias a todos, por despertar en nosotros sus estudiantes, el interés y amor a la ciencia, que aunque difícil, impredecible y muchas veces desconcertante es FASCINANTE y EMOCIONANTE.

Por su apoyo, consejos, enseñanzas, paciencia pero sobre todo por su amistad.....GRACIAS, siempre estarán en una parte muy especial de mi corazón.

A mis compañeros, Ángeles Lara, Lupita Zavaleta, Eunice Galaviz, Lilla Tequianes, Landy Vite, Raúl Sánchez, Sr. Toñito, gracias por su apoyo, sus consejos, su compañía, y por lo mas valioso su AMISTAD, y por hacer siempre del L-313 un espacio lleno de alegría y convivencia para trabajar.

A mi amigo, Juan F. Hernández, gracias por todo el apoyo y confianza, pero sobre todo por la amistad y cariño que me brindaste.

A mis hermana postizas:

Yanira Zepeda Ortega. Y....el caballito de feria???

Irais Villaseñor Cardoso. Y..... la pipeta???

Victoria Aguilar Urbina. Y..... eso que???

Por ser mis MEJORES AMIGAS, sin limitaciones ni reservas, por escucharme siempre y darme sus consejos, su apoyo, su compañia y una SONRISA en los mejores y peores momentos..... GRACIAS¡¡¡ LAS QUIERO MUCHO¡¡¡¡

A Pablo Fernández de Castro por ser una parte tan importante de mi vida, por ser único y especial para mí, por la gran amistad que nos une y nos seguirá uniendo toda la vida, por el hermoso amor que me da y que me hace sentir LIBRE, FELIZ Y COMPLETA cada día.

Linuuuuuus.....M+ Y siempre Q+ Gracias por existir y ser PFC.....QTH, por eso mismo TA ¡¡¡¡..... Y .

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Velasco Castrejon, por su asesoría a lo largo de este trabajo, por sus consejos, el apoyo, la enseñanza pero sobretodo por su amistad. Solo espero que no diga "QUE TERRIBLE TESIS".

A la Dra. Beatriz Rivas Sánchez, por su asesoría, gracias Bety por compartir conmigo tus conocimientos, experiencias y amistad. "HOY SI EXTRAÑE EL CALDITO DE POLLO"

Gracias a ambos por permitirme trabajar con ustedes y seguir aprendiendo, los quiero mucho¡

Al Dr. Rubén Marroquín Segura, por permitirme formar parte del laboratorio y de esa gran familia que es el L-313, por la gran confianza que siempre deposito en mi, por su apoyo, asesoría, consejos y su amistad. Usted será mi MAESTRO SIEMPRE.

Al Q.F.B. Luis Alfredo Mora Guevara, por que siempre me brindo la ayuda necesaria para llegar a la culminación de este trabajo. Gracias¡

A mis profesores, por todos los conocimientos que durante muchos años fueron sembrando en mi, y que han servido de cimientos para mi formación profesional. A todos....MIL GRACIAS.

A mi gloriosa UNIVERSIDAD, por que en ella tuve la gran oportunidad de formarme profesionalmente y crecer como persona al lado de muchísimos estudiantes que egresamos de ella. Gracias por el inmenso orgullo de ser UNIVERSITARIA.

A todas las personas, que han formado parte de mi vida y de todo esto, ya que todas han dejado sembrado algo en mi, que me ha hecho madurar como ser humano, y de alguna manera han contribuido a que hoy sea:

UN QUÍMICO-FARMACEUTICO-BIOLOGO.

TABLA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ag	Antígeno
Amp	Amperes
Ab	Anticuerpo
cm	Centímetros
Con-A	Concanavalina-A
Da	Daltons
PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
GP(s)	Glicoproteínas
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Horas
IB	Inmunoblot
IET	Inmunoelectrotransferencia
IM	Intramuscular
KDa	Kilodaltons
L	Litros
LCL	Leishmania Cutánea Localizada
LCD	Leishmania Cutánea Diseminada
LMC	Leishmania Mucocutánea
LV	Leishmania Viseral
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mm	Milímetros
min.	Minutos
N	Normalidad
MPM	Marcadores de Peso Molecular
r.p.m.	Revoluciones Por Minuto
V	Volts
Vol.	Volumen
WB	Western-blot

ÍNDICE

1. RESUMEN 1
2. INTRODUCCIÓN 2
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS 4
3.1. Definición 4
3.2. Antecedentes Históricos 4
3.3. Agente Etiológico 5
3.4. Ciclo Biológico 6
3.5. Distribucion Geográfica 9
3.6. Formas Clínicas 9
3.7. Superficie de Membrana de Especies de *Leishmania sp* 12
3.8. Aspectos Inmunológicos 13
3.9. Respuesta Inmune 14
3.10. Diagnóstico 16
3.10.1. Diagnóstico Clínico 16
3.10.2. Diagnóstico de Laboratorio 17
3.10.2.1. Impronta 17
3.10.2.2. Prueba de aldehído o formol gel 18
3.10.2.3. Cultivo de microbiopsias 18
3.10.2.4. Inoculación en animales 18
3.10.2.5. Reacción de Montenegro o prueba cutánea de hipersensibilidad tardia 19
3.10.2.6. Fijación de complemento 19
3.10.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 19
3.10.2.8. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) 20
3.10.2.9. ELISA (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay) 20
3.10.2.10. Electroforesis 25
3.10.2.11. Inmunoelectrotransferencia (IET) 29
3.11. Tratamiento 32
3.12. Bioquímica 33
3.12.1. Proteínas 33
3.12.2. Clasificación de las proteínas 33
3.12.3. Enlaces responsables de la estructura de las proteínas 34
3.12.4. Niveles de la estructura proteinica 36

3.13. Glicoproteínas 37
3.13.1. Ocurrencia y funciones 37
3.13.2. Identificación, purificación y análisis estructural de las glicoproteínas. 38
3.13.3. Azúcares presentes en las glicoproteínas 38
3.13.4. Lectinas 39
3.13.5. Clasificación de las glicoproteínas 40
3.14. Cromatografía 41
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 43
5. OBJETIVOS 44
6. HIPÓTESIS 44
7. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS EMPLEADOS 45
8. MÉTODOS 48
8.1. Parásitos 50
8.2. Obtención del antígeno soluble 50
8.3. Elución del antígeno soluble por la columna (Sepharose 4B-Concanavalina-A) 51
8.4. Cuantificación de proteínas del antígeno soluble por el método de Lowry. 52
8.5. Microhemaglutinacion en Placa 53
8.6. ELISA 54
8.7. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida 57
8.8. Inmunoelectrotransferencia (IET) 61
8.9. Análisis Estadístico 63
9. RESULTADOS 64
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 83
11. ANÁLISIS DE RESULTADOS 84
12. CONCLUSIONES 87
13. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES 88
14. REFERENCIAS 89

1. RESUMEN

Se obtuvo un enriquecido proteico de promastigotes en cultivo de RPMI de *Leishmania mexicana mexicana*, mediante procedimientos convencionales y este se utilizó para purificar mediante el uso de una columna de intercambio iónico (Sepharosa 4B-Concanavalina-A), de esta elución se obtuvieron dos fracciones a las cuales se les llamó, Fracción I (correspondiente al volumen vacío) y la Fracción II que sale después de dicho volumen.

A las fracciones I, II y fracción sin purificar se les determinó la cantidad de proteína presente, posteriormente se realizaron ELISAS utilizando estas tres fracciones y 25 sueros de pacientes con diferentes tipos de leishmaniasis, así como sueros comerciales anti-A, anti-B, y sueros de pacientes sanos con grupo sanguíneo "A", "B", y "O".

Los resultados obtenidos mediante esta técnica demostraron que la reactividad cruzada presente con el grupo sanguíneo "B" no se eliminó.

También se realizaron inmunoelectrotransferencias con las tres fracciones del antígeno, los resultados mostraron que la glicoproteína gp63 no se pierde. La fracción I contiene la gp63, y esta carece de residuos de manosa.

2. INTRODUCCIÓN

Leishmania mexicana mexicana es un protozoario intracelular y hemoflagelado, que ataca piel y vísceras del hombre y diversos animales mamíferos, siendo esta especie una de las causantes de LEISHMANIASIS. Esta enfermedad es transmitida por la picadura de un pequeño mosquito piloso perteneciente a los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) *y Lutzomyia* (Nuevo Mundo).

Las leishmaniasis constituyen una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia para la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que afectan a 12,000,000 de individuos, pertenecientes a 80 países, de los cuales enferman cada año alrededor de 400,000 y ponen en riesgo a más de 350,000,000 incrementándose año con año el número de afectados. Esta enfermedad tiene consecuencias patológicas, socioeconómicas y psicológicas severas, pues a menudo afecta la calidad de vida del paciente ya que le imposibilita la realización de una vida activa normal.

La *leishmania mexicana mexicana* causa diferentes formas clínicas: **la leishmaniasis cutánea localizada (LCL)** o úlcera de los chicleros, la **leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)** o leishmaniasis leproide, la **leishmaniasis mucocutánea (LMC)** o espundia, cada una de ellas con un cuadro clínico diferente, y que en ocasiones se confunde con otras patologías parasitarias, micóticas, etc., lo cual impide un diagnóstico certero si el médico solo cuenta con los datos clínicos. Por lo que el laboratorio es esencial para un diagnóstico definitivo de la leishmaniasis.

En México el diagnóstico de laboratorio se realiza mediante la aplicación de técnicas inmunológicas como la intradermorreacción (IDR) con leishmania, técnicas parasitoscópicas como improntas y biopsias, métodos serológicos en los cuales se determina la respuesta al agente, aspirado en medios específicos, inoculación en animales y ELISA, sin embargo, la especificidad en esta ultima, no ha sido del todo satisfactoria ya que se reporta reactividad cruzada entre isohemaglutininas de grupo sanguíneo "B" y los antígenos de superficie de *Leishmania mexicana mexicana.*

En la actualidad se utilizan técnicas mas sofisticadas para el diagnóstico de leishmaniasis tales como el radioinmunoensayo (RIA), Inmunoblot (IB) o "Western blot", que es una técnica altamente sensible y específica pero presenta las desventajas de ser cara y difícil de realizar, por lo que se requiere la capacitación de personal para su realización.

En la realización de la técnica de Inmunoblot (IB), se utiliza antígeno soluble de este parásito, este es rico en las dos moléculas mas abundantes de la superficie de *Leishmania*: la glicoproteína 63 (gp63) y un lipofosfoglicano (LPG), ambos involucrados en el ataque de el parásito a la célula huésped, el macrófago. La gp 63 es específica en especies de *Leishmania* y esta es reconocida por sueros de pacientes con leishmaniasis.

Debido a la reactividad cruzada entre individuos de grupo sanguíneo "B" y *Leishmania*, el presente trabajo se orientó a la obtención de un antígeno purificado en columnas de sepharosa4B-concanavalina A con la idea de retener antígenos con carbohidratos que contienen manosas y obtener un antígeno en el levigado de la columna que no presentara dicha reacción cruzada y con ello aumentar la especificidad de las pruebas.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. DEFINICIÓN

Las leishmaniasis, también llamada úlcera de los chicleros o picada de la mosca chiclera, son enfermedades parasitarias causadas por varias especies de protozoarios hemoflagelados que atacan a la piel y vísceras del hombre y diversos animales. [1-3]Son transmitidas por la picadura de la hembra de un pequeño mosquito piloso perteneciente a los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). [3, 4]

3.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En el viejo Mundo, la primera descripción de la leishmaniasis tegumentaria es atribuida a El-Razi en Irak alrededor del año 1500 de nuestra era. En 1885 Altounyan publicó un trabajo sobre el padecimiento en Aleppo, Siria y Cunninghan en ese año observó por primera vez a los parásitos a los que supuso "esporas incluidas en una amiba". En 1903 Leishman describió los parásitos causantes del Kala-azar, Donovan los redescribió en el mismo padecimiento y Wright crea el género *Leishmania* en honor a Leishman.

La historia de la leishmaniasis en América data desde 1788, cuando Hipólito Ruíz botánico español, en Perú hizo una descripción de la presencia de "llagas corrosivas" en la cara de los nativos, los cuales atribuían estas a la picadura de un insecto llamado uta.

En México se asegura que las leishmaniasis existieron desde la época precolombina, ya que Diego López de Cogolludo, relató que los primeros franciscanos que intentaron convertir a los Itzaes del Petén, encontraron numerosos indígenas con las "orejas podridas". El primero que describió la leishmaniasis tegumentaria en Yucatán y en México fue Seidelin en 1912 quien le llamó "úlcera de los chicleros" por encontrar las lesiones ulcerosas con mucha frecuencia en las orejas de los trabajadores dedicados a la extracción de la resina del chicle. El primer estudio epidemiológico mexicano sobre leishmaniasis fue realizado en 1942 por Beltrán y Bustamante en campamentos chicleros de la península de Yucatán.

En 1953, Biagi en Escárcega, Campeche, observó que la úlcera de los chiqueros se comportaban en forma más parecida a la leishmaniasis causada por *L. Tropica* que a la producida por *L. Braziliensis*, que se suponía era la única especie que producía leishmaniasis tegumentaria en América y considerándola una subespecie de aquella, la llamó *L. Tropica mexicana*. Este criterio fue avalado por Grarnham y Adler quienes la convirtieron en una nueva especie: ***Leishmania mexicana***.

En 1965, Márquez publicó el estudio del primer caso de leishmaniasis cutánea diseminada en México y cinco años después, Ramírez presentó en un Congreso de Dermatologia 3 casos de LCD descubiertos por Portales y col. en Coahuila.

En 1988, Velasco y cols. Estudiaron en Veracruz el primer caso bien documentado de leishmaniasis mucocutánea en México. En 1990, se estudio el primer caso de kala-azar en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. [5]

3.3. AGENTE ETIOLÓGICO

Las leishmanias son causadas por varias especies y subespecies de complejos de *Leishmania*, protozoario que no sólo parásita al hombre sino también a mamíferos domésticos y silvestres.[1, 2] El género se divide en varias categorías taxonómicas tal y como se ilustra.

	PROTOZOA
PHYLUM	SARCOMASTIGOPHORA
SUBPHYLUM	MASTIGOPHORA
CLASE	ZOOMASTIGOPHORA
ORDEN	KINOTOPLASTIDA
SUBORDEN	TRIPANOSOMATINA
FAMILIA	TRIPANOSOMATIDAE

Cuadro 1. Taxonomia de las especies conocidas de *Leishmania* que parasitan al hombre.[2]

3.4. CICLO BIOLÓGICO

Respecto a su ciclo biológico, en el país, existen 38 especies distribuidas prácticamente en todo el territorio pero el único transmisor comprobado es *Lutzomyia* (Nyssomyia) olmeca, confundido en su descubrimiento por error con *Plebotomus flaviscutellatus*. Este insecto demostró su capacidad vectorial transmitiendo la úlcera de los chicleros por picadura al humano, sin embargo se supone que *L. longipalpis*, *L. diabólica* y *L. cruziata*, transmiten respectivamente el kala-azar en la cuenca del Balsas, la leishmaniasis cutánea localizada y difusa en el norte de México, así como la úlcera de los chicleros en Oaxaca y en la Chontalpa tabasqueña. [2, 3]

Los vectores de las leishmaniasis son pequeños dípteros pilosos, de la subfamilia *Phletominae*, que posee unas 600 especies y subespecies, con 70 transmisoras de leishmaniasis. En el viejo mundo, éstas pertenecen al género *Phlebotomus* y en América a *Lutzomyia*. No hay evidencias concluyentes que de otros géneros (Sergentomyia) puedan transmitir leishmaniasis al hombre.

Estos artrópodos se distribuyen en todo el país, pero son importantes sólo en áreas de endemia de leishmaniasis. Estas especies se les conoce vulgarmente como flebotomos y pueden describirse como mosquitos de 3-5 mm de longitud, con cuerpo y alas muy pilosos las que mantienen erectas durante el reposo y cuando se alimentan. [2-4]

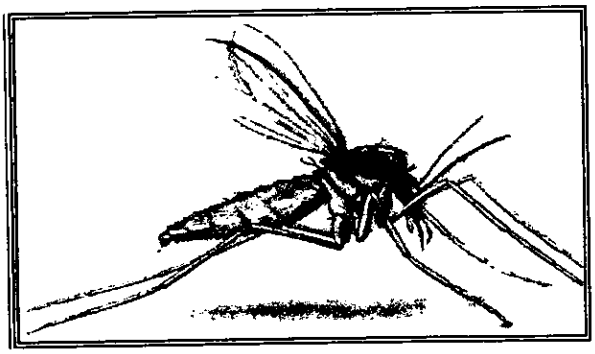


Figura 1. Lutzomyia sp[6]

Las hembras son las únicas hematófagas y después de haber succionado sangre depositan de 40 a 70 huevos en suelos húmedos, ricos en detritus orgánicos de los que se alimentan las larvas al eclosionar. Los adultos se refugian en cuevas, en rincones obscuros u húmedos o matorrales.

El parásito de leishmania durante su ciclo biológico pasa por dos estadios: amastigote y promastigote. [7-8]

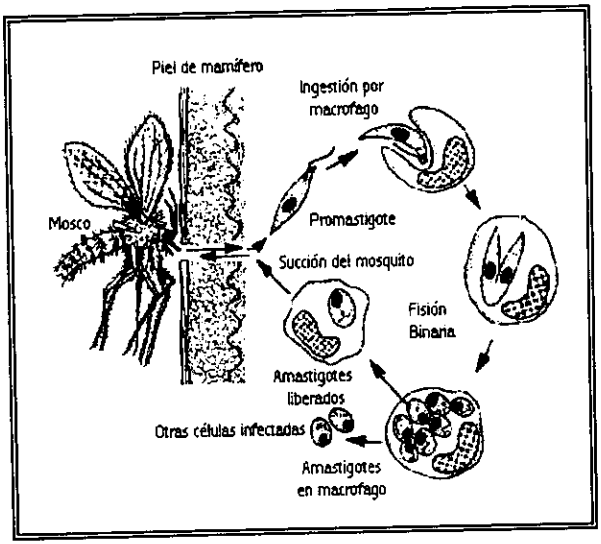


Figura 2. Ciclo Biológico de *Leishmania sp*[9]

El **amastigote** tiene forma redondeada u oval de 2.5 µm de diámetro con un gran núcleo excéntrico y un cinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal en donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote. Esta etapa sólo se observa en los tejidos de los vertebrados parasitados y algunas veces (y casi siempre en forma esporádica) en los medios de cultivo. [2, 3, 8]

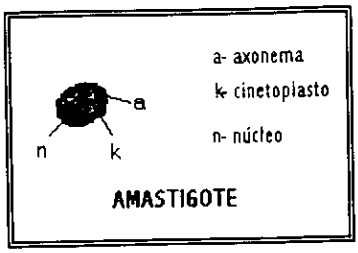


Figura 3. Estadio de amastigote[10]

El **promastigote**, que es la forma fusiforme, tiene proximadamente 15-20 µm de diámetro mayor, consta de un núcleo situado proximadamente en la parte central del parásito y un flagelo anteronuclear, que nace de un cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto y sale del cuerpo por el polo anterior, carece de membrana ondulante.[1, 2, 3]

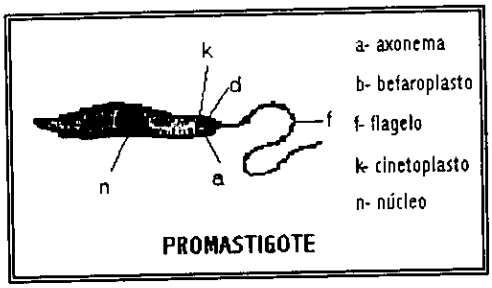


Figura 4. Estadio de promastigote[10]

En cuanto a sus posibles reservorios, en general se considera que los roedores silvestres lo son en la leishmaniasis tegumentaria y que los cánidos silvestres y domésticos, los de kala-azar. Sin embargo en ciertas regiones endémicas de leishmaniasis cutánea de Brasil, Argentina, Perú, Panamá y Costa Rica se han observado perros con lesiones típicas a las que se les ha aislado el agente etiológico.

3.5. DISTRIBUCION GEOGRÁFICA

Las leishmaniasis en México se distribuyen al menos en 20 entidades, desde Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas por el norte hasta la Península de Yucatán y Chiapas al sur-sureste. Por el Golfo involucra a los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y por el Pacífico los de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Nayarit, Sinaloa. También afecta estados mediterráneos como San Luis Potosí, Morelos, Puebla, Hidalgo, y Durango. [2, 3]

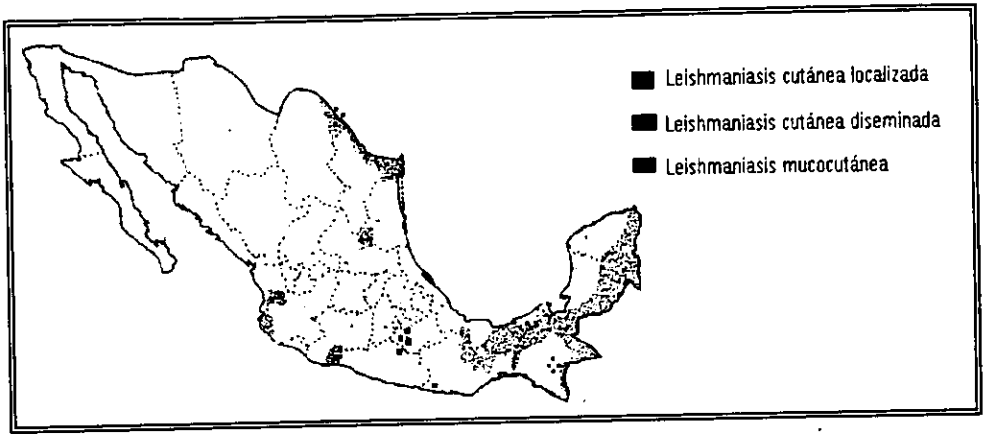


Figura. 5. Distribución geográfica de leishmaniasis en México[2]

3.6. FORMAS CLINICAS

Las formas clínicas causadas por *L. mexicana mexicana* son **la leishmaniasis cutánea localizada (LCL)** o úlcera de los chicleros, la **leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)** o leishmaniasis leproide y **la leishmaniasis mucocutánea (LMC)** o espundia.

Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros. Esta forma clínica, se caracteriza habitualmente por una ulceración pequeña y única aunque puede ser grande y múltiple, si el transmisor picó en forma repetida al ser ahuyentado durante su hematofagia o cuando el huésped fue simultáneamente picado por varios vectores. La ulceración es

generalmente redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e INDOLORA y aparece aproximadamente 15-20 días después de la picadura infectante. Al principio es un pequeño nódulo, pruriginoso, que evoluciona hacia la ulceración, aunque algunas veces la lesión continua siempre nodular y se transforma en una placa infiltrada o atrófica e inclusive se vuelve vegetante.

La LCL tiende a la curación espontánea en 6 meses a 2 años, excepto cuando se localiza en las orejas, donde es crónica y mutilante o si es causada por *L. braziliensis* que origina úlceras muy persistentes y más resistentes al tratamiento con antimoniales. Se distribuye desde la frontera de los Estados Unidos hasta la Península de Yucatán por el Golfo y desde Chiapas a Nayarit por el Pacífico. [2, 11-14]

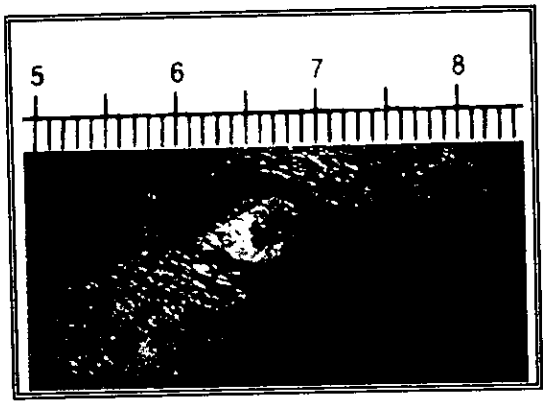


Figura 6. Leishmaniasis Cutánea Localizada (ulceración)[6]

Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD). Se inicia habitualmente por un nódulo que no se úlcera y se disemina por vía linfática, dando múltiples nódulos que simulan una esporotricosis. Esta diseminación es habitualmente lenta. De estos sitios los parásitos se diseminan por el líquido tisular, por la linfa o por la sangre llegando a colonizar prácticamente todo el tegumento con la excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos y palmas de

las manos y plantas de los pies, aunque en algunos enfermos mexicanos hemos encontrado lesionados los genitales externos, las plantas de los pies y con frecuencia la mucosa orofaríngea y nasal. De esta última hemos aislado *L. mexicana* incluso cuando el área no esta infectada. Es de presentación esporádica extendida desde el sur de Texas y Coahuila a Chiapas, no encontrada hasta ahora en Yucatán y en Quintana Roo.

Una de las características más importantes en la LCD es la alergia específica. En México es común que además exista alergia a antígenos ubicuos: candidina y PPD. También hemos observado que en ciertas épocas del año (las más calurosas), el enfermo tiene remisiones espontáneas y en esos momentos las IDR a leishmanina y a los antígenos ubicuos se vuelven positivas. Esta remisión también ocurre en pacientes que sufren dengue u otras enfermedades vírales, tal como fue observado por Bryuceson en Etiopía con el sarampión. [2, 11-14]

Figura 7. Leishmaniasis Cutánea Diseminada[15]

Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) ó Espundia. Se caracteriza por lesiones muy destructivas de mucosas nasales y orofaríngeas, que pueden entorpecer la fonación y la deglución e incluso

causan inanición, debido al intenso dolor. No cura espontáneamente y resisten a la quimioterapia específica. [2, 3]

Leishmaniais Visceral (LV) o kala-azar. Es causada por *L. donovani* y subespecies en el Viejo Mundo y por *L. chagasi* en el Nuevo Mundo, aunque para algunos autores ésta es una subespecie de *L. donovani* (*L. d. chagasi*) o incluso mejor, *L. infantum*. Esta forma de leishmaniasis puede presentarse en tres modalidades: endémica, esporádica y epidémica. La LV endémica es común en América Latina, afecta primordialmente a los niños entre 1 y 4 años y predomina en el sexo masculino (2:1) El periodo de incubación oscila de 10 días a más de un año y el cuadro clínico se inicia gradualmente. Los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, a veces con picos cotidianos dobles, malestar general, anorexia, pérdida de peso que puede progresar hasta caquexia, así como hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia y palidez de mucosas. El oscurecimiento de la piel, particularmente de cara y abdomen, es común en la India (kala-azar significa enfermedad negra en Sánscrito). En México la leishmaniasis visceral endémica afecta tanto a niños como adultos y es más común en el sexo femenino. La LV esporádica se observa en individuos no nativos que penetran en el área endémica. La LV epidémica se observa a veces en las áreas endémicas y puede involucrar a todos los grupos de edades particularmente del sexo masculino (4:3). Habitualmente cursa en forma crónica. [8-14]

3.7. SUPERFICIE DE MEMBRANA DE ESPECIES DE LEISHMANIA

Respecto a su superficie celular, estudios han llevado a la conclusión de que tanto en los promastigotes como en los amastigotes de *Leishmania*, existen moléculas ricas en carbohidratos, que son reconocidos específicamente por lectinas [18]

Las lectinas son proteínas de origen animal o vegetal, que reconocen carbohidratos específicos, y que pueden aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados. [18-19]

Muchos aspectos del ciclo de vida de *Leishmania sp.* son influenciados por glicoconjugados del parásito. Estos incluyen el ataque a los receptores del macrófago, interacciones con el intestino en la mucosa del vector y actividades enzimáticas en la superficie [20-23] Adicionalmente, la

expresión de dos glicoconjugados en la superficie del estadio de promastigote de este organismo y que es asociado con su virulencia. Estas son la glicoproteína de superfice gp63 y el lipofosfoglicano de superficie LPG. Este último consiste en una serie de sacáridos fosforilados repetidos y unidos a un lípido.

Se ha reportado en *Leishmania donovani* que el sistema manosa/N-acetilglucosamina es el principal mecanismo por el cual el promastigote interactúa con el macrófago. En *Leishmania donovani chagasi* la presencia de residuos de manosa en la gp63, se asocia directamente con el ataque al macrófago en el humano y a la virulencia del parásito.[19-25]

3.8. ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Leishmania es un parásito de vida intracelular obligada en el huésped vertebrado. Si el parásito evade la respuesta inmune podría, dada su virulencia, matar al huésped y consecuentemente moriría con él, o por el contrario si fuera un blanco fácil su eliminación seria inmediata, de ahí que su permanencia depende de una equilibrada relación huésped parásito.

El primer mecanismo de defensa al que se enfrenta el parásito es a los componentes del suero. Se ha demostrado que leishmania activa complemento por las vías clásica y alterna, siendo los promastigotes muy susceptibles a este sistema. [2, 24-25]

Al entrar en contacto el parásito con el macrófago, éste se une por medio de lectinas, receptores de la familia de las integrinas, receptores del complemento (CR1 y CR3),y el receptor de la fracción Fc de los anticuerpos; los cuales se unen a moléculas de superficie de leishmania, de las cuales las más importantes son la gp63 y la lipofosfoglicana y muy posiblemente el MFR.

Las lectinas poseen por lo menos dos sitios de unión a carbohidratos, no tienen actividad enzimática, pueden ser solubles o estar unidad a la membrana plasmática. Estas han sido empleadas para la detección, aislamiento y caracterización de carbohidratos que constituyen glicolípidos, polisacáridos y glicoproteínas del parásito. [18, 23-25]

Dentro del fagolisosoma, leishmania tiene que enfrenar mecanismos microbicidas dependientes e independientes de oxígeno. El promastigote es más susceptible a estos mecanismos que el

amastigote, por lo que su sobrevivencia dentro del macrófago va a depender de su rápida transformación de una fase a la otra (metaciclogénesis).

La infección por leishmania produce una estimulación de la respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T con la participación de las células presentadoras de antígeno, así como la respuesta inmune humoral mediada por linfocitos B. [26]

3.9. RESPUESTA INMUNE

La infección por *Leishmania sp*, induce en el hombre, respuestas de inmunidad humoral y celular, aunque el balance de cada una de ellas varía con la forma clínica de leishmaniasis.

En la LCL, la hipersensibilidad tardía se desarrolla en forma temprana. Las evidencias van desde la ulceración de la lesión, la imagen histopatológica, la positividad a la prueba cutánea con leishmania, la capacidad de los linfocitos del huésped para responder in vitro a ese antígeno y que con mucha frecuencia el individuo cura espontáneamente. Esta situación implica la existencia de un espectro inmunológico-patogénico, en uno de cuyos polos se sitúa la LCL benigna, que puede curar espontáneamente y en el otro la LCD y la LV, ambas de mal pronóstico. [26]

En la LCD, la respuesta celular in vivo e in vitro no existen, así las lesiones se diseminan ampliamente en forma de nódulos o placas, la intradermoreacción (IDR) y la transformación blastoide a la producción de linfocinas (MIF, LIF) serán negativos y el individuo es incapaz de curar espontáneamente haciendo una enfermedad difusa e incurable.

Como se ha observado, las leishmaniasis cutáneas son consideradas como enfermedades polares desde el punto de vista inmunológico. Así como los polos serán la LCD y/o la leishmaniasis cutánea recidivans, donde los enfermos que sufren tienen marcada respuesta a la IDR con leishmanina, que contrasta con la notable escasez de parásitos en las lesiones. Sin embargo estos enfermos no curan espontáneamente.

La LMC se caracteriza por la marcada respuesta cutánea a la leishmanina así como por la más fácil demostración de la presencia de anticuerpos circulantes en la relación con la LCL. Las

razones por las cuales la inmunidad celular no puede controlar la LMC y la leishmaniasis cutánea recidivans no son bien conocidas. En contraste, en la LCD no hay evidencia sobre la participación de linfocitos T, por lo que en los nódulos característicos hay regresión espontánea y la enfermedad es incurable. [26]

Después de la curación espontánea o terapéutica se manifiesta inmunidad a la reinfección con el parásito homólogo exclusivamente. Recientemente se han encontrado ciertas evidencias sobre el efecto protector de *L. braziliensis* contra *L. mexicana* y de *L. major* involucrados en esta inmunidad se sabe que son fundamentalmente mediados por la respuesta inmunológica celular, aunque no se descarta la participación de una inmunidad concomitante (premución). [2, 3]

Los pacientes con cualquiera de las formas clínicas de Leishmaniasis tegumentarias desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la enfermedad, que se mantiene durante el curso de la infección y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría de los parásitos. Aparentemente, estos anticuerpos no juegan un papel relevante en la protección frente a *Leishmania*. Algunos trabajos señalan que la respuesta de inmunidad humoral es principalmente el reflejo de la carga parasitaria. Por esta razón, los estudios serológicos en la leishmaniasis se han utilizado principalmente con fines de diagnóstico, para el seguimiento de los pacientes tratados y en estudios sobre los mecanismos inmunopatogénicos, lo cual indudablemente constituye un valioso aporte al conocimiento de la enfermedad. [27]

Los títulos de anticuerpos son más elevados en la LCD, siguiendo en orden de magnitud los pacientes con LMC y los pacientes con LCL, con cargas parasitarias más bajas. También se ha observado un descenso muy significativo en los niveles de anticuerpos parásitos-específicos después de tratamiento de pacientes con LCL con quimioterapia o inmunoterapia. Convit y col. correlacionaron los niveles de anticuerpos, con la prueba de Montenegro y el número de áreas del sistema respiratorio comprometidas en el proceso patológico en pacientes con LMC. Los resultados mostraron que a medida que el compromiso era más extenso y más severo, los niveles de anticuerpos estaban más elevados y la HT se hacía más débil o negativa.

Un aspecto más reciente y novedoso de la utilidad de los estudios serológicos en el conocimiento de la enfermedad, se ha desarrollado a partir de las evidencias acumuladas sobre la asociación entre la presencia de una respuesta Th1 y Th2 y los isotipos predominantes de las inmunoglobulinas específicas, durante el curso de infecciones y otros procesos patológicos. Esto también ha sido reportado en varios estudios múrinos y humanos, especialmente en las infecciones por helmintos y en la alergia. Ulrich y col. demostraron que IgG4 específicas para *Leishmania* predominaban en 19 de los 20 sueros evaluados de pacientes con LCD. Estos resultados sugieren que la evaluación de las subclases de inmunoglobulinas abre una nueva perspectiva para la evaluación de la respuesta humoral en la leishmaniasis, no sólo durante el curso de la enfermedad, sino también en la evaluación de respuestas en esquemas terapéuticos y en los procesos de re-infección o reactivación de la enfermedad. [28]

Estudios previos en la Leishmaniasis tegumentaria humana basados principalmente en reacciones de HT y evaluaciones clínicas e histopatológicas, han demostrado que en la infección humana la resistencia está claramente asociada al desarrollo de una respuesta de IMC específica en los pacientes con LCL, la cual parece estar ausente en los pacientes con LCD. Por su parte estas respuestas también están presentes en los pacientes con LMC, pero no parecen ser adecuadas para controlar la enfermedad, por el contrario se cree que contribuyen con su patología. [27-30]

3.10. DIAGNOSTICO

3.10.1. DIAGNOSTICO CLINICO

El diagnóstico clínico de la LCL es relativamente fácil para un individuo entrenado, ya que habitualmente sólo se observa una lesión ulcerada en la piel, INDOLORA, redondeada con bordes indurados y fondo limpio, en la piel del cuerpo. En las orejas, las lesiones aunque nodulares en un principio casi siempre se ulceran, dando lesiones destructivas, crónicas; que a veces se convierten en vegetantes.

Además de las lesiones ulcerosas en la piel, se observan otras de tipo infiltrativo nodular (placa infiltrada), placa atrófica e incluso lesiones vegatantes, que suelen confundirse con tumoraciones.

En cuanto a la **LCD** se inicia habitualmente en una lesión nodular que evoluciona lentamente para después diseminarse siguiendo el trayecto linfático, hemático y tisular, similar a una esporotricosis linfática o leishmaniasis esporotriciforme, dando nuevas lesiones nodulares grandes o pequeñas agrupadas en toda la piel, con excepción del cuero cabelludo, regiones axilares, palmares y genitales. En México se han reportado casos con afecciones en regiones plantares y genitales externos.

La **LMC o espundia** se manifiesta por lesiones desfigurantes de mucosas nasales y orofaríngeas, son generalmente irreversibles y destructivas, la infección secundaria es muy común, lo que vuelve más grave la enfermedad, la mutilación y el sufrimiento son muy severos, la muerte sobreviene habitualmente como resultado de la desnutrición debida a la inanición y/o neumonía.

En el **kala-azar o LV** el diagnóstico clínico no resulta tan sencillo como en las formas anteriores. La fiebre, la hepatoesplenomegalia y la pancitopenia pueden presentarse en muchos otros padecimientos, por lo que en el kala-azar el diagnóstico por el laboratorio es determinante.[2, 3]

3.10.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El laboratorio es esencial para establecer el diagnóstico definitivo de las leishmaniasis ya que el cuadro clínico puede confundirse con el de otros padecimientos y este se plantea de diversas formas:

3.10.2.1. IMPRONTA

La observación del parásito en forma de amastigotes intracelulares en frotis hecho de material obtenido por raspado de la base de la úlcera, luego de haber levantado la costra o bien en biopsia (punch o cirugía) o aspirado del borde de la úlcera. Debe tenerse precaución al obtener el material, ya que la toma superficial con frecuencia da falsos negativos, debido a la alta

frecuencia de infección secundaria de las ulceras, con la consecuente destrucción de macrófagos. El éxito depende principalmente del tiempo transcurrido entre el inicio de la lesión y la toma correcta de la muestra; en los dos primeros meses la positividad se acerca al 100%, disminuyendo a cifras inferiores al 25%. [2]

3.10.2.2. PRUEBA DE ALDEHIDO O FORMOL GEL

Esta es una prueba inespecífica pero muy simple y conveniente para el aprovechamiento en el trabajo en la detección de casos de leishmaniasis. Esta prueba es particularmente usada en LV. Consiste en adicionar una gota de formaldehído al 30% al suero del paciente sospechoso, obtenido a partir de 5 mL de sangre venosa. Un resultado positivo se indica cuando la mezcla cambia a un sólido blanco opaco, parecido al de un huevo cocido, en un tiempo de 20 min. [31]

3.10.2.3. CULTIVO DE MICROBIOPSIAS

Este se realiza a partir de lesiones cutáneas en medios específicos como NNN, Schneider, Diamond, Nakamura, etc. Son fáciles, pero su aislamiento por el cultivo durante el trabajo de campo es muy difícil, por la susceptibilidad a la contaminación. En este caso el cultivo no deberá considerarse negativo antes de los seis meses. [2]

3.10.2.4. INOCULACIÓN EN ANIMALES

Los parásitos también pueden aislarse por inoculación en animales, generalmente se inocula en hámster, inyectando el material de biopsia o microbiopsia en el cojinete plantar; el resultado en los casos positivos, es la aparición de lesiones características, lo cual puede sin embargo, tardar varios meses y sólo es de ayuda para la clasificación del complejo *Leishmania*. [2, 31]

3.10.2.5. REACCIÓN DE MONTENEGRO O PRUEBA CUTÁNEA DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA.

Esta prueba fue introducida originalmente por Wagner y posteriormente modificada por Montenegro. Se utiliza como una prueba de sensibilidad a los gérmenes tras el contacto previo. Es positiva en todos los individuos con lesiones cutáneas activas compatibles con leishmaniasis con evolución mayor de mes y medio a dos meses o que la hayan padecido. Consiste en la aplicación de 0.01 mL de una suspensión de 3 X 10^6 promastigotes de *Leishmania*/mL (destruidos por la acción de fenol al 0.5% o por calor a 60° C, o bien por congelación-descongelación, ultrasonido o ultravibrador), a partir de un cultivo de RPMI o MEM suplementado don suero fetal de ternera y hemoglobina al 10%, preferentemente con una jeringa tipo insulina y aguja # 26, por vía intradérmica , lo cual origina un levantamiento de piel de "naranja", se lee el resultado a las 48 horas y se interpreta de la siguiente manera: a)induración menor a 5 mm de diámetro, corresponde a una reacción negativa, b) induración mayor a 5 mm de diámetro, corresponde a una reacción positiva, donde el hallazgo morfológico del parásito no rebasa el 60% y se vuelve negativa por tolerancia inmunológica individual. [2, 31]

3.10.2.6. FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

La prueba de fijación de complemento es la primera verdadera prueba inmunodiagnóstica. En trabajos iniciales, un extracto con acetona de promastigotes lavados, fue utilizado como antígeno, el cual daba una reacción positiva en LV y LMC asi como en la enfermedad de Chagas. Esta prueba tiene reacción cruzada con otros parásitos (*Tripanosoma cruzi*) e infecciones micóticas. Esta prueba se considera muy útil en el diagnóstico temprano y en el monitoreo de los efectos del tratamiento. [31, 32.]

3.10.2.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es utilizada para diagnosticar LV sintomática (kala-azar) usando sangre periférica en lugar de aspirados de tejido, para la cual los límites de detección son de un macrófago infectado con

Leishmania en 8 mL de sangre, con 90% de sensibilidad, 100% de especificidad. Esta prueba es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN. En la PCR, la DNA polimerasa usa el principio de síntesis de la cadena complementaria de ADN en dirección 5' a 3' usando un ADN molde de cadena sencilla, empezando en una región de doble cadena . Por lo que en este caso se necesita conocer la secuencia necleotídica de los sitios que bordean a la región por amplificar y, con base en ella, sintetizar dos pequeños oligonucleótidos de aproximadamente 20 nucleótidos, cada uno complementario a cadenas opuestas de la región de ADN. [31]

3.10.2.8. PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Esta es una técnica histoquímica para la detección y localización de antígenos en cortes de tejido o la detección de anticuerpos contra antígenos previamente pegados a placas de vidrio, el anticuerpo específico es conjugado anti-IgG o anti-IgM con compuestos fluorescentes, resultando un trazador sensible. Es útil y reproducible pero da variaciones inespecíficas y para las formas cutáneas (LCL) es poco sensible y no es confirmatoria. De esta forma IFI satisface los requerimientos de especificidad y sensibilidad, pero no se adapta fácilmente a estudios seroepidemiológicos. [2, 31]

3.10.2.9. ELISA (ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY)

El inmunoensayo enzimático conocido como ELISA del inglés Enzyme Linked Immunosorbentent Assay, fue descrito en 1971 por S. Arameas y B. Guilbert en Francia, E. Engvall y P. Perlmann en Suecia, y por B. van Weemen y H. Schuurs en Holanda, estos fueron utilizados para la cuantificación de antígenos y posteriormente para la titulación de anticuerpos. Se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad del sistema indicador. [33, 34]
En este método se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima. El anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de una reacción oxido-reducción, en la cual el sustrato y un sistema indicador da un producto colorido. En este

sistema el antígeno o el anticuerpo se absorben a una fase sólida insoluble (microplacas de poliestireno, o bien membranas de nitrocelulosa).

Existen diversas variantes del ELISA, como son los métodos directos, indirectos, sándwich y competitivo. Estos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto con el que se detectan anticuerpos.

En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En cambio en los métodos indirectos se usan para medir la concentración de anticuerpos en muestras de fluidos biológicos; el antígeno inmovilizado reacciona con el anticuerpo de la muestra y posteriormente reacciona con un segundo anticuerpo unido a la enzima.

En los métodos competitivos se puede usar un conjugado antígeno-enzima o un anticuerpo-enzima, cuando el conjugado es anticuerpo-enzima el antígeno específico se absorbe física o covalentemente a una fase sólida después el conjugado es incubado en presencia de un anticuerpo estándar o la muestra a ser analizada y competirán por los sitios de unión del antígeno inmovilizado.

En está técnica la concentración de los productos del sustrato son inversamente proporcionales a la concentración del estándar o del antígeno de la muestra. Se aplica a una gran variedad de sustancias como IgG, gonadotropina coriónica y ATP. [33-36]

El RIA y el ELISA son probablemente los métodos inmunológicos más utilizados para detectar anticuerpos, puesto que permiten realizar gran número de pruebas en un tiempo relativamente corto. [35]

CARACTERÍSTICAS DE LOS ELEMENTOS QUE SE USAN EN LA TÉCNICA DE ELISA.

FASE SÓLIDA.

Se utilizan placas de poliestireno o nylon, las cuales se pueden irradiar con luz UV (durante 1 hora aproximadamente) con ello aumentando su adhesividad, tubos de polivinilo, policarbonato, partículas de agarosa y poliacrilamida.

La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por absorción continua de interacciones no covalentes, altas concentraciones del antígeno o anticuerpo reducen los enlaces no específicos y mejora los específicos.

Se debe determinar la concentración óptima de revestimiento para cada ensayo.

Etapas de lavado.

Se debe de realizar con una SOLUCIÓN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO-Tween 20 (PBS-Tween 20), después de revestir la fase sólida. Esta fase es importante ya que pueden quedar residuos de material que reaccionen y alteren los resultados.

Muestra a ensayar

Algunas muestras contienen sustancias de PM elevado, que pueden pegarse de manera inespecífica a la fase sólida. Este problema se puede reducir si la muestra se diluye en PBS conteniendo agente detergente.

Antígeno

Para cada ensayo es necesario determinar la concentración óptima del antígeno, la cual se establece por titulación en "tablero de ajedrez".

Conjugado

Para la obtención del conjugado se debe considerar lo siguiente:

Preparación de inmunoglobulina:

Tipo de inmunoglobulina

Espacie de animal usado en la inmunización (conejo, oveja u otro).

Tipo de enzima:

Ésta debe ser económica, de alto grado de pureza, elevada actividad específica, estable al almacenamiento, soluble y no dar reacción cruzada.

Las enzimas más empleadas en el ELISA son la peroxidasa de rábano (PR), la fosfatasa alcalina (FA) y la β-D-galactosidasa (BG), debido a su estabilidad y reproducibilidad de resultados.

Método de acoplamiento o conjugación:

Estos métodos se basan en la reacción entre los grupos amino presentes en el anticuerpo y los grupos carbohidrato de la enzima con ayuda de un reactivo bifuncional, como glutaraldehído, ó benzoquinona. [36-37]

SUSTRATO

Debe ser barato, soluble y de fácil uso. Los sustratos que se emplean para la enzima PR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos, los cuales al ser oxidados en la reacción enzimática desarrolan color. De estos los más frecuentemente empleados son: orto-fenilendiamina (OPD), diaminobencidina (DAB) y orto-dianisidina entre otros, estos continúan en forma soluble después de ser oxidados.

Los sustratos empleados para la FA son el para-nitrofenil fosfato, que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores a 30° C y el 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato que se puede emplear en las pruebas de ELISA en tubo o DOT ELISA.

Los sustratos empleados para la BG son el orto-para –nitrofenil-beta-D-galactósido y el 4-metil-umbeliferil-beta-D-galactósido. [38-39]

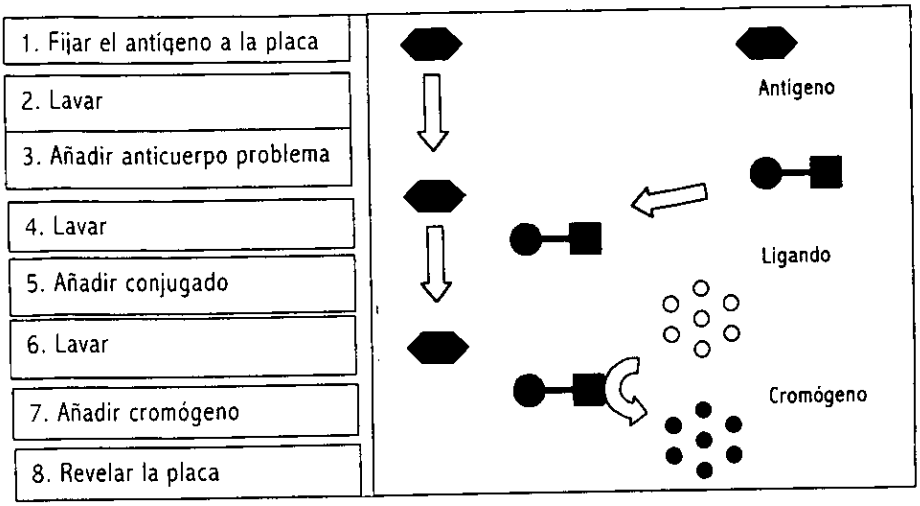


Figura 8. ANALISIS DE INMUNOABSORCION LIGADO A ENZIMAS (ELISA) INDIRECTO. *El antígeno, en solución salina, se incuba en un tubo o placa de plástico (1). La superficie de plástico absorbe pequeñas cantidades del antígeno. El antiígeno libre se elinima por el lavado (2).(La placa puede bloquearse después de un exceso de una proteína irrelevante, para evitar la posterior unión inespecífica de proteínas). Se añade la muestra de anticuerpo, el cual se une al antígeno (3). Las proteínas no unidas se eliminan por lavado (4).El ligando es una molécula que puede detectar el anticuerpo y se halla unida covalentemente a una enzima tal como la peroxidasa. Este anticuerpo se une al primer anticuerpo problema, y el que queda libre se elimina después por lavado (6); el ligando unido se visualiza mediante la adición de un cromégeno (7), es decir, una sustancia incolora que constituye el sustrato sobre el cual actúa la porción enzimática del ligando para dar finalmente un producto coloreado.*

El ELISA tiene aplicaciones muy variadas, lo cual lo hace muy versátil el diagnóstico de enfermedades infecciosas, virales o parasitarias, cuantificación de hormonas, haptenos, determinación de anticuerpos isotipo-específicos, titulación de anticuerpos, etc. [35-40]

La búsqueda de anticuerpos específicos para leishmania puede realizarse mediante métodos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y dot-ELISA, con resultados satisfactorios que varían según la forma de leishmaniasis presente y que no suelen presentarse en sujetos provenientes de áreas endémicas. Los títulos de anticuerpos son muy bajos en los casos de LCL, que infortunadamente son más frecuentes en nuestro país, resultan más altos en LMC y muy elevados en LCD y LV. Se ha informado en la literatura que hay resultados serológicos positivos

falsos en el suero de sujetos con grupo sanguíneo B. Los resultados obtenidos combinados de la intradermoreacción y del nivel de anticuerpos séricos son de enorme valor diagnóstico. En 200 enfermos con úlcera de los chicleros estudiados, en los estados de Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Nayarit con lesiones activas o cicatrizadas, el 88% fueron positivos a la prueba cutánea y el 92% lo fueron serológicamente con IFI y dot-ELISA. [11, 12] Estas dos pruebas correlacionaron muy bien entre sí, con la de Montenegro y aún con los resultados parasitológicos, ya que en todos los pacientes en los que se demostró la *leishmania* dieron pruebas inmunológicas positivas. Además de su importancia diagnóstica, ambas pruebas son útiles en el pronóstico así en la LCD, donde la reacción de Montenegro es negativa, los títulos serológicos de 1:512 o mayores indican progresión o agravamiento de la enfermedad, tanto que su disminución por la acción de un tratamiento o por efecto de la época del año, es congruente con la reaparición de la reactividad cutánea tardía y con la mejoría clínica.

Finalmente, este par de pruebas son de gran utilidad para reconocer los cambios que se suscitan en la epidemiología de las leishmaniasis cutáneas motivadas por la migración de individuos a las ciudades situadas en áreas endémicas, donde el desmonte de su periferia o el asentamiento humano en viejos sembradíos suelen ser causa de la diseminación de la enfermedad. [2, 35]

3.10.2.10. ELECTROFORESIS

FUNDAMENTO

El término electroforesis se puede definir como una técnica en la cual una partícula cargada se hace desplazar a través de un medio aplicando un campo eléctrico. Las velocidades de migración son función de la densidad de carga por lo que se podrán separar unas partículas de otras con arreglo a esta propiedad. A su vez, la densidad de carga de la partícula será función de una serie de parámetros que marcan las condiciones experimentales de la electroforesis: pH, fuerza iónica, gradientes de voltaje, interacciones con el soporte, etc. [41]

Preparación de la muestra

Actualmente se llevan acabo análisis mediante electroforesis sobre diferentes líquidos biológicos (suero, plasma, sangre total, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.).

La muestra a emplear y el tratamiento previo al que puede ser sometida dependen de los compuestos que se pretende analizar electroforéticamente.

Selección y preparación del soporte

Hoy en día los procedimientos electroforéticos se llevan a cabo **sobre soportes**, tomando el nombre de electroforesis de zona. El proceso lleva a la obtención de un <mapa> en el cual se pueden visualizar las distintas fracciones separadas.

Los principales soportes utilizados son de dos tipos:

NO RESTRICTIVOS: Las partículas colocadas sobre ellos se separan únicamente en función de su carga eléctrica, y pueden moverse libremente en los mismos.

Los principales soportes de este tipo son:

Papel. Fue el primer soporte empleado en la electroforesis de zona, en 1950. En la actualidad ha sido prácticamente sustituido por el acetato de celulosa.

Acetato de celulosa. Se consigue por reacción entre los grupos hidróxido de la celulosa y el anhídrido acético. Las tiras de acetato de celulosa están formadas por fibras de este compuesto, que engloban aire entre ellas. Cuando se va a usar, la tira se sumerge en el amortiguador, y estos espacios de aire son sustituidos por amortiguador, que será el encargado de transportar la corriente a través de ella. Se emplea comúnmente el <cellogel>, o acetato de celulosa gelatinizado, que tiene como ventajas su fácil manejo, buena reproducibilidad, fácil lectura, y rapidez de ejecución.

Agarosa. La agarosa es uno de los componentes del agar (compuesto de agarosa y agaropectina). El componente de agaropectina contiene restos de sulfato y carboxilo que aportan cargas eléctricas no deseables en el soporte, las cuales crean problemas de endosmosis y captan el colorante dando colores de fondo no deseables. El componente de agarosa, sin embargo, carece de estos grupos cargados y no representa los problemas de la agaropectina.

Se emplea por ello como soporte el **gel de agarosa**, lo más purificada posible. Se utiliza a una concentración de 0.5 a 1 gramos por 100mL de amortiguador.

El tamaño de su poro es mayor que el de otros geles, y permite el paso a través de ellos de sustancias de peso molecular relativamente alto; por los cual las partículas migran tan sólo en función de su carga eléctrica.

Su aspecto es claro y transparente, por lo que se presta muy bien a la cuantificación por fotodensitometría.

RESTRICTIVOS: El soporte ejerce algún tipo de resistencia al desplazamiento de las proteínas de la muestra. La intensidad de esta resistencia vendrá determinada por el tamaño del poro del gel, y por el tamaño y características de las macromoléculas que deben desplazarse sobre el mismo.

Uno de los principales soportes de este tipo es :

Geles de poliacrilamida. Es el soporte ideal si se quieren conseguir más y mejores separaciones electroforéticas. Los geles se forman por polimerización de la acrilamida con un agente enlazante. El tamaño del poro del gel resultante depende de la concentración de cada componente de manera que se pueden conseguir geles con un tamaño de poro variable; así; las moléculas pueden ser separadas de acuerdo con las diferencias de sus cargas o, además de ello, según las diferencias de sus tamaños.

Sus ventajas son:

-Hidrófilos e insolubles en agua, químicamente inertes.

-Porosidad variable en función de los constituyentes.

-Transparencia de los geles, con densitometría fácil.

-Posibilidad de utilizar gradientes, consiguiendo mejores resoluciones aún y bandas más estrechas.

-Capacidad de filtración molecular.

-Posibilidad de introducir en el gel otros compuestos químicos para electroforesis especiales (dodecil sulfato sódico, urea).

Electroforesis en gel.

El gel es un estado de la materia intermedio entre el sólido y el líquido. Los geles están formados por un retículo de polímeros, constituyendo una red enmarañada, y por un líquido en el que se encuentra inmerso èsta red, que rellena los intersticios. Dependiendo de la composición química del líquido, entre otros factores, los geles varían de consistencia desde líquidos viscosos hasta sólidos rígidos.

El uso de geles de agarosa, almidón y poliacrilamida, como soportes de la electroforesis de zona, ha supuesto un avance importante, ya que con estos medios los geles no son solo meros soportes que evitan la difusión, sino que, modificando las concentraciones de los componentes que formarán el gel, pueden conseguirse diferentes porosidades de éstos. Así, la separación no se produce solo por las diferencias de carga de las moléculas, sino también por las diferencias de tamaño. La electroforesis en gel se aplica en el laboratorio clínico para la separación de proteínas, lipoproteínas e isoenzimas. [41]

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero acrilamida (CH_2 =CH – CO – NH_2) y el cromonómero de entrecruzamiento N, N'-metilén-bis-acrilamida (CH_2 = CH –CO – NH – CH_2 –NH – CO – CH = CH_2). Variando las concentraciones del monómero y del comonómero de entrecruzamiento, se consiguen geles de poliacrilamida con un nivel amplio de tamaño de poro, que puede ajustarse para optimizar la separación de los componentes de la muestra. La reacción de polimerización se inicia con un catalizador redox. El sistema de catális más utilizado es el TEMED (N, N, N', N''-tetrametilén-etilén-diamida) y persulfato amónico. Otro sistema muy habitual es la descomposición de la riboflavina por la luz. [42]

Permite la separación con arreglo a la carga neta de la partícula y al tamaño de está. Cuando transcurre el proceso electroforético, las partículas comienzan a migrar en función de su carga eléctrica, pero son frenadas en su migración según su tamaño si está es mayor que el tamaño del poro del gel en el que se realiza el proceso.

Como resultado de estos fenómenos, se consiguen separaciones más completas, y mayor cantidad de bandas en el espectro electroforético.

Tinción y lectura.

Hay que tener en cuanta que los distintos colorantes tienen la afinidad distinta sobre diferentes grupos químicos o moléculas. Esta se debe conocer, con el fin de emplear adecuadamente cada colorante para teñir las moléculas objeto de estudio.

Los procesos de coloración, fijación, transparentación, etc. Deben ser respetados minuciosamente, pues son reacciones químicas que requieren tiempo y condiciones de ejecución diferentes.

Se deben tener en cuenta así mismo la estabilidad y conservación de estos reactivos, para lograr procesos reproducibles.

En resumen, la electroforesis es una técnica separativa que, aunque estandarizada hoy día, es de compleja realización, de modo que para obtener buenos resultados hay que conocer su ejecución y repetir todos los pasos de que consta el proceso escrupulosamente. Solo así lograremos buenas separaciones de los compuestos de interés. [41-45]

3.10.2.11. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) o Western Blott, fue descrita por Towbin et al. En 1979, es uno de los métodos más útiles con que se cuenta en la actualidad para el análisis antigénico. [45]

Este método combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia o ausencia de detergentes como el duodecil sulfato de sodio (SDS), con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida. [46-49]

Esencialmente, Western-blot involucra la separación de polipéptidos en geles por una variedad de medios, seguido por la transferencia electroforética de los polipéptidos separados por una matriz inmovilizante o membrana, la más comunmente usada es la membrana de nitrocelulosa. En este paso, una " replica" de la separación de polipéptidos previa, a partir del del paso de

electroforesis en gel es creado en la membrana, que puede ser probado con antisuero u otros ligandos, tales como oligonucleótidos o lectinas para identificar polipéptidos especificos. [50-54]

Existen muchas ventajas en transferir los polipéptidos a una membrana:

La membrana es más facilmente manejable que el gel original (especialmete las membranas a base de nylon).

Los polipeptidos inmobilizados sobre la membrana son más accesibles a probar con varios reactivos (por ej. Anticuerpos).

La membrana con estos polipeptidos inmovilizados pueden ser almacenados por algún tiempo previo a su uso, y en algunos casos, puede ser posible reusar la misma membrana varias veces con diferentes reactivos.[46-55]

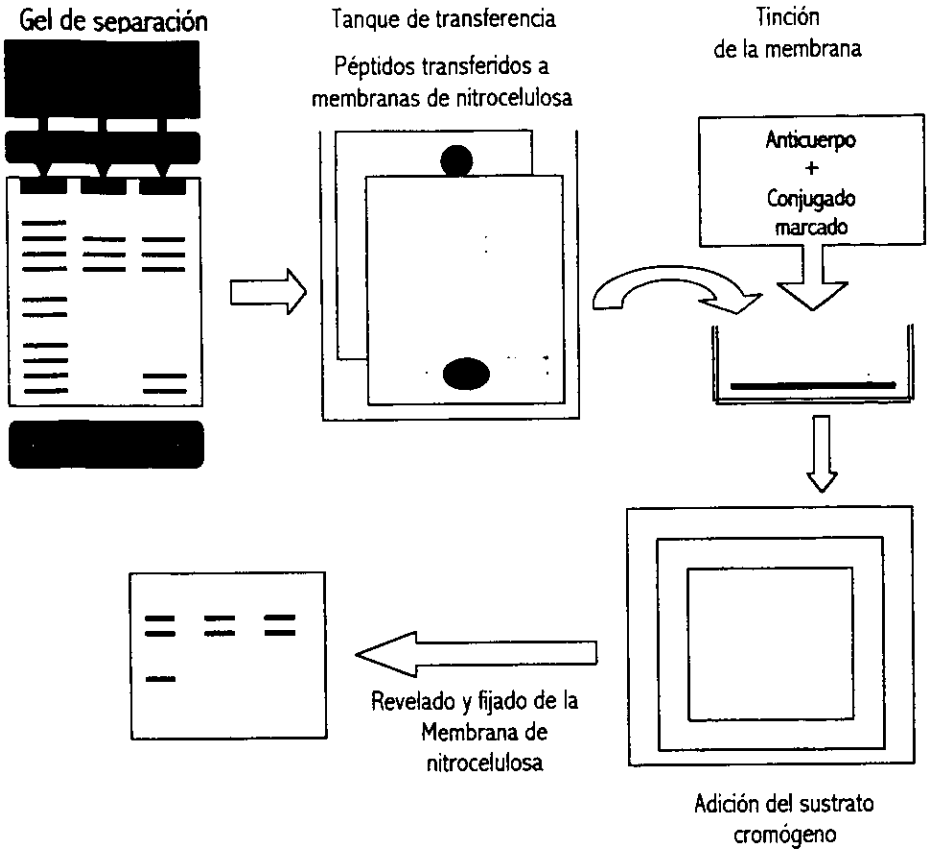


Figura 9. INMUNOTRANSFERENCIA SOBRE MEMBRANAS (inmunoblotting). *Las muestras de antígeno se separan en un gel analítico, por ejemplo, un gel SDS poliacrilamida, o un gel de isoelectroenfoque. Las moleculas resueltas se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se trata luego secuencialmente con anticuerpo frente al antígeno específico, se lava y luego se fija a un conjugado radiomarcado y luego se fija un conjugado radiomarcado para detectar anticuerpos, el principio en que se basa es similar al del radioinnmunoanálisis o ELISA. Después de un nuevo lavado, la membrana se coloca en contacto con una placa radiográfica en un casete; se revela la autorradiografía y se hacen visibles las bandas del antígeno que se haya unido al anticuerpo. La técnica puede modificarse para su empleo con un conjugado unido a enzimas, y el material fijado puede detectarse mediante tratamiento con un cromógeno, que deposita un reactivo insoluble diractamente sobre el secante.*[38]

El método de IET tiene un gran número de aplicaciones en diversos campos de la inmunología y áreas afines, por su alto poder analítico permite identificar qué antigenos pueden ser útiles para el diagnóstico. [54]

3.11. TRATAMIENTO

Desde el descubrimiento de la efectividad del tratamiento con tártrato emético de la leishmaniasis cutánea por Vianna en 1912, los antimoniales han constituido el medicamento de elección en todas las formas clínicas de leishmaniasis.

En la actualidad los más usados por poseer mayor eficacia y menor toxicidad son los antimoniales pentavalentes entre los cuales se cuenta la metil glucamina-antimoniato (Glucantime®) y el gluconato de antimonio y sodio (Pentostam®) aunque a la fecha no está bien establecido su mecanismo de acción.[2]

Ambos medicamentos se utilizan por vía parenteral a la dosis de 20 mg de antimonio por kg de peso por día durante 20 días (dosis recomendadas por la OMS) y poseen la misma efectividad y similar toxicidad. A las dosis de 25-50 mg/kg peso día y administrados 2-3 series de 15 días, no producen signos de intoxicación miocárdica. El tratamiento puede repetirse a intervalos de 15 días hasta 3 veces.

La anfotericina B, el nifurtimox, la rifampicina, el ketoconazol y alopurinol, muestran cierta efectividad. [2, 17] La paramomicina, aplicada localmente, se ha mostrado efectiva en la terapia de lesiones cutáneas causadas por *L. tropica* y ha dado resultados excelentes contenida en liposomas, inyectados por vía IV, al igual que los antimoniales. De éstos últimos, se dice que en esta presentación son 700 veces más activos que cuando se usan en forma libre.

La pentamidina, es otro medicamento útil en la terapia de leishmaniasis particularmente en el kala-azar resistente a antimoniales; se utiliza a dosis de 2-4 mg por kg de peso por día, vía intramuscular (IM) por 10-15 días de este medicamento, a la dosis total de 360-489 mg en infusión venosa basta para producir la curación, por los que la recomienda para aquellos enfermos que vivan en lugares apartados. [2, 3]

Los agentes físicos, particularmente el calor aplicado localmente sobre las lesiones ha mostrado durante mucho tiempo de uso, grandes efectos benéficos. [2, 14, 46.]

3.12. BIOQUIMICA

3.12.1. PROTEÍNAS

Las proteínas son un grupo de sustancias de gran importancia (protos = primario) y diversidad tanto estructural como funcional. Al grupo de las proteínas, pertenecen las enzimas o catalizadores biológicos, algunos transportadores como las lipoproteínas y la hemoglobina, los compuestos estructurales y de contracción como son los que forman parte de los músculos, las moléculas de reconocimiento celular del tipo de las inmunoglobulinas, algunas hormonas como la insulina, etc. Toda esta variedad de funciones es posible por la gran diversidad estructural que estructural que existe en las proteínas.

Todas las proteinas son polipéptidos de peso molecular (PM) elevado. Aunque en forma arbitraria, la línea divisoria entre polipéptidos grandes y proteínas pequeñas se acostumbre colocar en un PM entre 8,000 y 10, 000 las proteínas simples contienen sólo aminoácidos (aa) y las complejas contienen además materiales diferentes como derivados vitamínicos, lípidos o carbohidratos.

Las proteínas están compuestas de 20 aminoácidos distintos, que forman parte de ellas en proporciones variables, en un orden bien definido para cada proteína, que es determinado por un código genético o memoria biológica. Las proteínas tienen funciones específicas gracias a su estructura que es dictada por la información genética. Las proteinas son polímeros de aminoácidos, que forman cadenas polipeptídicas.[56]

3.12.2. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Puesto que no existe un sistema universalmente satisfactorio de clasificación de proteínas, varios sistemas que se contradicen persisten en la actualidad. Todos tienen un valor comparativamente limitado para ayudar a la comprensión de muchas propiedades esenciales de

las proteínas. Sin embargo, la persistencia de estos sistemas y términos hacen necesaria una breve consideración. Las que se describen adelante son características sobresalientes de los sistemas de clasificación de las proteínas basados en su solubilidad, forma, función, propiedades físicas y estructura tridimensional. [57]

3.12.3. ENLACES RESPONSABLES DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

La estructura primaria de las proteínas deriva del enlace covalente de los L-α-aminoácidos por enlaces peptídicos α. Si bien esto se dedujo desde hace mucho tiempo por múltiples líneas de evidencia, la prueba más convincente fue la síntesis química de la insulina y la ribonucleasa enlazando únicamente aminoácidos mediante uniones peptídicas.

Las estructuras de las proteínas son estabilizadas por dos clases de enlaces fuertes (peptídicos y disulfuros) y tres clases de enlaces débiles (de hidrógeno hidrófobos y electrostáticos o salinos).

Los enlaces peptídicos. Un péptido está constituido por dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El enlace peptídico se forma entre el grupo amino de un aa y el grupo carboxilo de otro aa. La formación de la unión peptídica se lleva a cabo con la constitución de una molécula de agua y el gasto de cuatro equivalentes de ATP por cada enlace.

Un péptido recibe el nombre de dipéptido si esta formado por dos aa, tripéptido si tiene tres, decapéptido si tiene 10, etc. También se le llama oligopéptido si lo forman pocos aa (menos de 50) y polipéptido si tiene muchos aa. Los aa que forman la cadena polipeptídica se llaman residuos. En una cadena polipeptídica el aa 1 es aquel que quedó con su grupo α-amino libre por que no fue usado para formar enlace peptídico y el último aa de esa cadena será el que tenga el grupo α-carboxilo libre, tampoco formó enlace peptídico; se denominan grupo N-terminal y C-terminal respectivamente. Ambos están ionizados a pH 7.0

Rigidez del enlace peptídico. A pesar de que los péptidos son representados con un solo enlace que une los átomos α-carboxilo y α-nitrógeno, la unión carbono nitrógeno tiene, en parte las características de un doble enlace. No hay libertad de rotación alrededor del enlace

que conecta los átomos de C y N y por lo tanto los cuatro átomos que lo rodean se encuentran en el mismo plano. En cambio, existe una gran libertad de rotación en torno a los enlaces restantes de la cadena peptídica. Esta semirigidez tiene consecuencias importantes en la disposición de la estructura de las proteínas.

Enlaces cruzados inter e intracatenarios de los polipéptidos con puentes disulfuro. El puente disulfuro formado entre dos residuos de cisteína interconecta dos porciones de cadenas polipeptídicas a través de residuos de cisteína. El enlace de cisteína es resistente a las condiciones usuales para la desnaturalización de las proteínas. El ácido perfórmico (oxida los enlaces S-S) o el β-mercaptoetanol (reduce los enlaces S-S generando dos residuos de cisteína) separan las cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro sin afectar la estructura primaria.

Estabilización inter e intracatenaria de los polipéptidos por los enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno que se forman entre residuos de las cadenas laterales de aminoácidos, los que se forman entre átomos de hidrógeno y oxígeno de los propios enlaces peptídicos, y los formados entre residuos polares en la superficie de contacto entre las proteínas y el agua, desempeñan papeles importentes en la conservación de la estructura proteínica.

Interacciones hidrófobas. Las cadenas laterales no polares de los aminoácidos neutros tienden a ligarse en las proteínas. La relación no es estequiométrica, de aquí que no se pueda decir que existe un verdadero enlace. Sin embargo, estas acciones recíprocas desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la proteína.

Enlaces electrostáticos. Estos son enlaces salinos formados entre grupos de carga opuesta de las cadenas laterales de los aminoácidos. Por ejemplo, el grupo amino de la lisina porta una carga neta de +1 a pH fisiológico y el no-carboxilo del aspartato y del glutamato una carga neta de −1. Por lo tanto, estos pueden interactuar electrostáticamente para estabilizar una estructura proteínica.

Estabilidad de los enlaces. Durante la desnaturalización de las proteínas (por acción de reactivos como la urea, dodecil sulfato de sodio [SDS* y leve H^+ u OH^-), los enlaces de

hidrógeno, hidrófobos y electrostáticos se rompen, pero no los enlaces disulfuro ni los peptídicos. [58]

3.12.4. NIVELES DE LA ESTRUCTURA PROTEINICA

Primaria. La estructura primaria de una cadena polipeptídica se refiere a la secuencia lineal de los residuos de aminoácidos, y a la ubicación de los enlaces disulfuro, si están presentes.

Secundaria. La estructura secundaria se refiere a las relaciones espaciales de los aminoácidos, esto es, a la conformación que se repite en la cadena polipeptídica y que permite formar hélices α o placas β pegadas.

Terciaria. La estructura terciaria de una proteína consiste en su conformación tridimensional. Esto abarca el ordenamiento global y la inter-relación de las diversas regiones o dominios de los residuos individuales de aminoácido de una cadena polipeptídica sencilla.

Cuaternaria. Esta estructura, se refiere al ensamble de dos o más cadenas polipeptídicas iguales o diferentes, unidas por las fuerzas diferentes a los enlaces covalentes (es decir, no son enlaces peptídicos). Las fuerzas que estabilizan estos agregados son enlaces de hidrógeno y los enlaces electrostáticos o salinos formados entre residuos sobre las superficies de las cadenas polipeptídicas. Estas proteínas se denominan oligómeros y las cadenas polipeptídicas individuales de las cuales están compuestos son denominadas de diversas maneras: protómeros, monómeros o subunidades.

Muchas proteínas oligómericas contienen dos o cuatro protómeros y se les denomina dímeros o tetrámeros, respectivamente. Los oligómeros que contienen más de cuatro protómeros también son comunes, particularmente entre las enzimas reguladas. Las proteínas oligómeras desempeñan papeles especiales en la regulación intracelular, ya que los protómeros pueden asumir diferentes orientaciones espaciales una de otra en relación con los cambios correspondientes en las propiedades del oligómero. El mejor ejemplo estudiado es la hemoglobina.

El quinto nivel estructural es el biológico y se refiere al orden que guardan algunas proteínas en las estructuras celulares. La desnaturalización de una proteína es la alteración de sus niveles

estructurales secundario, terciario y cuaternario, sin ruptura de enlaces peptídicos. Una proteína desnaturalizada pierde sus características funcionales. [59]

3.13. GLICOPROTEÍNAS

Las glicoproteínas (GPs), son proteínas que tienen cadenas de oligosácaridos (glicanos) unidas por covalencia a sus esqueletos polipeptídicos. Los glucosaminoglucanos, son polisacáridos constituidos de unidades repetidas de disacáridos, compuestas generalmente de un aminoazúcar (sea glucosamina o galactosamina, que pueden estar o no sulfatado) y un ácido urónico (ácido glucorónico o ácido idurónico). Los glucosaminglucanos se denominaron inicialmente mucopolisacáridos. Por lo general se encuentran unidos por covalencia a proteínas; el complejo de uno o más glucosaminoglucanos con proteínas se conoce como proteoglucano. Glicoconjugado y carbohidratos complejos son términos equivalentes usados para denotar moléculas que contienen una o más cadenas de carbohidratos anlazadas por covalencia a una proteína o un lípido; las glicoproteínas, los proteoglucanos y los glucolípidos pertenecen a estas categorías. [59]

3.13.1. OCURRENCIA Y FUNCIONES

Las glicoproteínas existen en la mayor parte de los sistemas biológicos, desde las bacterias al hombre. Numerosas proteínas con funciones diversas son glicoproteínas; su contenido de carbohidratos oscila de 1 a más de 85% en peso. Todavía no se esclarece enteramente el papel preciso de las cadenas de oligosacáridos en las funciones de las glicoproteínas a pesar de la extensa investigación. En el caso de los parásitos hay muy poca información. Pero se sabe que la glicosilación de las proteínas se encuentra asociada a la estabilidad de la estructura, a la protección en la interacción huésped-parásito y algunas otras funciones que aún están en estudio.

3.13.2. IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS GLICOPROTEÍNAS.

Identificación. Las glicoproteínas pueden separarse de mezclas complejas (por ejemplo, membranas celulares) por el método de SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida) e identificarse por tinción con el reactivo de Schiff y ácido periódico (SAP), que detecta en azúcares a los grupos aldehído producidos por el ácido periódico. También pueden identificarse por observación de la radiactividad, mediante el uso de autorradiografía-SDS-PAGE. Ya que incorporan esa radiactividad cuando las células o tejidos se incuban con azúcares apropiados marcados.

Purificación y análisis estructural. Al igual que con otras moléculas, es necesario purificar primero las glicoproteínas antes de intentar la determinación de sus estructuras. Por lo general puede hacerse por métodos convencionales de purificación de proteínas. También las columnas de afinidad que usan lectinas han probado su valor en la purificación de ciertas glicoproteínas. Su composición de carbohidratos es determinada después de la hidrólisis ácida, por medio de espectrometría de masas y cromatografía gas-líquido (EM-CGL). En el pasado se emplearon diversos métodos para determinar la estructura detallada de sus cadenas de oligosacáridos. En la actualidad, el uso combinado de la EM-CGL y de la espectrofotometría de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución, a menudo hace posible la determinación completa de estructuras (es decir, la composición de azúcares, los tipos de enlaces y sus naturalezas anoméricas. De las cadenas de glicanos en la mayor parte de glicoconjugados. Los tipos de enlaces entre azúcares de las glicoproteinas son de importancia fundamental en la determinación de las estructuras y funciones de estas moléculas. [59]

3.13.3. AZÚCARES PRESENTES EN LAS GLICOPROTEÍNAS

Aunque en la naturaleza existen aproximadamente 200 monosacáridos, solo cerca de una docena están presentes en las cadenas de oligosacárido de las glicoproteínas (Cuadro 2). El ácido N-acetineuramico (NeuAc) se encuentra en el extremo de los oligosacáridos, adherido por

lo general a los residuos subterminales de la galactosa (Gal) o de N-acetilgalactosamina (GalNac). Los demás azúcares enumerados, por lo general se encuentran en posiciones internas. [59]

Azúcar	Tipo	Abreviatura
Galactosa	Hexosa	Gal
Glucosa	Hexosa	Glc
Manosa	hexosa	Man
N-acetil galactosamina	Aminohexosa	GalNac
N-acetil glucosamina	Aminohexosa	GlcNac
Fucosa	Desoxihesa	Fuc
Arabinosa	Pentosa	Ara
Xilosa	Pentosa	Xil
Ácido N-acetil neuramínico	Ácido siálico (9 atomos de C)	NeuAc

Cuadro 2. azúcares principales de las glicoproteínas humanas[59]

3.13.4. LECTINAS

Las lectinas son proteínas de origen vegetal que se unen a uno o más azúcares específicos. Sus funciones precisas en los vegetales están aún bajo investigación. Se han podido purificar muchas de ellas y en el comercio se dispone de más de cuarenta. Las lectinas tienen diversos usos en la investigación bioquímica, que incluyen:

La purificación y análisis de las glicoproteínas. Lectinas como la Concanavalina A (Con A) pueden ser adheridos covalentemente a medios de sostén inertes como sefarosa. El complejo entre sefarosa Con A, puede utilizarse para la purificación de glicoproteínas que contengan cadenas de oligosacáridos que interactúan con la Con A.

Como medios para probar las superficies celulares. Dado que las lectinas reconocen azúcares específicos, pueden utilizarse para analizar, a un nivel general los residuos de azúcares expuestos en la superficie de las membranas celulares.

Para generar células mutantes que carezcan de ciertas enzimas para la síntesis de oligosacáridos. Cuando las células de mamífero en los cultivos de tejido son expuestas a concentraciones apropiadas de ciertas lectinas (por ejemplo, Con A), la mayor parte de ellas mueren, pero unas cuantas células resistentes sobreviven. Con frecuencia se ha observado que estas últimas carecen de ciertas enzimas que intervienen en la síntesis de oligosacáridos. Se presume que las células resisten debido a que no producen una o más de las glicoproteínas de superficie con las que podría interactuar la lectina utilizada. El empleo de estas células mutantes ha permitido dilucidar algunos aspectos de la biosíntesis de glicoproteínas. [59]

LECTINA	ABREVIATURA	AZÚCARES
Concanavalina A	Con-A	Manosa y Glucosa
Lectina de frijol de soya		Galactosa y N-acetilgalactosamina
Aglutinina de germen de trigo	WGA	N-acetilgalactosamina y ácido N-acetil enuramínico

Cuadro 3. Tres lectinas y los azúcares con los que inteactúan[59]

3.13.5. CLASIFICACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS

Las glicoproteínas pueden dividirse en cuatro clases basándose en la naturaleza del enlace entre cadenas polipetídicas y sus cadenas de oligosacáridos:

1. las que contienen un enlace Ser (o Tre)-GalNac;
2. los proteoglucanos, que poseen un enlace Ser-Xil;
3. los colágenos, que contienen un enlace hidroxilisina (Hil)-Gal y
4. las glicoproteínas que poseen un enlace Asn-GlcNac.

Las clases 1, 2 y 3 su unen a los aminoácidos correspondientes por medio de enlaces O-glucosídicos (es decir, se unen un OH de la cadena lateral de un aminoácido y un residuo de azúcar). La cuarta clase, contiene un enlace N-glucosídico (es decir, se enlaza el N del grupo amino de la asparagina con un residuo de azúcar). Debido a que las clases 2 y 3 son relativamente raras, el término glicoproteínas con enlace O- u O-glucosídicas se usa con frecuencia para referirse solo a los miembros de la clase 1. Los miembros de la clase 4 se

llaman glicoproteínas con enlace N- o N-glucosídicas. Existen otras clases menores. El número de cadenas de oligosacárido unidas a una proteína, puede variar desde 1 a 30 o más, con cadenas de carbohidrato que oscilan entre dos y tres residuos de longitud, a estructuras mucho mayores. Algunas glicoproteínas contienen los dos tipos de enlace, tanto N-glucosídico como O-glucosídico. [59]

3.14. CROMATOGRAFÍA

PRINCIPIOS GENERALES

La característica que distingue a los métodos cromatográficos de otros métodos físicos y químicos de separación, es la presencia de dos fases mutuamente no miscibles (una móvil y otra estacionaria) que se hallan en contacto. Una muestra introducida en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna, que contiene una fase estacionaria homogéneamente distribuida. Los diferentes componentes de la muestra experimentan repetidas interacciones entre la fase móvil y la estacionaria. Al final del proceso, los componentes separados eluirán en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente que menos interactúa (el menos retenido) eluirá primero, el retenido más fuertemente eluirá al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los componentes de una muestra dada. Una separación óptima entre dos componentes de una muestra se obtiene cuando el pico que eluye en segundo término es lo suficientemente retenido como para impedir su superposición con el pico que eluyó en primer término.

La columna de separación es el centro del cromatógrafo ya que proporciona una gran versatilidad para los distintos tipos de análisis. Esta característica debida a las posibilidades de selección de materiales para la fase móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades fisicoquímicas. En un sentido amplio la distribución de un soluto entre las fases móvil y estacionaria es el resultado de balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase.

La resolución cromatográfica de macromoléculas biológicas, en todos los casos excepto en la cromatográfia por exclusión molecular, es un proceso mediado por la adsorción diferencial de

solutos a la superficie del material de empaquetamiento de la columna. La optimización de una separación cromatográfica depende fundamentalmente de dicha adsorción.

Las macromoléculas biológicas difieren en sus características fisicoquímicas: tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y arreglo de sus grupos funcionales dentro de su estructura tridimensional. Es lógico, por lo tanto, que los métodos cromatográficos mas comunes para el fraccionamiento de estas moléculas sean: cromatografía por exclusión molecular (discriminación por tamaño y forma), cromatografía por intrecambio iónico (discriminación por carga), cromatografía por interacción hidrofóbica (superficie hidrofóbica), cromatografía en fase reversa (hidrofobicidad total), cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (histidinas accesibles en la superfice), y cromatográfia de afinidad (distribución de aminoácidos específicos en la superficie de las proteínas). [58]

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad las pruebas diagnósticas van desde improntas, cultivos del parásito, la reacción de Montenegro, IFI, biopsias y ELISA, sin embargo se ha observado que estas presentas reacción cruzada con isotipos del sistema de grupo sanguíneo "ABO", como en ELISA y en algunas ocasiones dan falsos positivos como en el caso de la reacción de Montenegro o bien son un poco costosas y no muy sensibles, por ello se pretende realizar la purificación de los antígenos de *Leishmania mexicana mexicana*, tratando a este antígeno que presenta reactividad cruzada con grupos sanguíneo, [60] mediante su adsorción por cromatografía y confrontando este antígeno por las técnicas de ELISA y Western-blot lo cual nos permitan realizar un diagnóstico más eficiente de esta enfermedad.

5. OBJETIVOS.

5.1. Obtener un antígeno específico para Leishmaniasis sp. que no muestre reactividad cruzada con las isoaglutininas del sistema de grupo sanguíneos "ABO".

5.2. Purificar los antígenos solubles de *Leishmania mexicana mexicana* que muestran reactividad cruzada con grupo sanguíneos usando una columna de Sepharosa4B-Concanavalina A.

5.3. Caracterizar inmunológicamente estos antígenos mediante las técnicas de ELISA y Western blot, utilizando sueros de pacientes con leishmaniasis (proporcionados por el departamento de parasitología del INDRE de la SSA y la UME de la UNAM).

5.4. Demostrar que al pasar el antígeno por una cromatografía de afinidad con Sepharosa4B-Concanavalina A, la reactividad cruzada se elimina, dando con ello una mayor especificidad a la pruebas de ELISA y Western-blot.

6. HIPÓTESIS.

La caracterización inmunológica del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana*, pasado por una cromatografía de afinidad con Sepharosa4B-Concanavalina A, mostrará que la reactividad cruzada se elimina, dando con ello una mayor especificidad a la pruebas de ELISA y Western-blot.

5. OBJETIVOS.

5.1. Obtener un antígeno específico para Leishmaniasis sp. que no muestre reactividad cruzada con las isoaglutininas del sistema de grupo sanguíneos "ABO".

5.2. Purificar los antígenos solubles de *Leishmania mexicana mexicana* que muestran reactividad cruzada con grupo sanguíneos usando una columna de Sepharosa4B-Concanavalina A.

5.3. Caracterizar inmunológicamente estos antígenos mediante las técnicas de ELISA y Western blot, utilizando sueros de pacientes con leishmaniasis (proporcionados por el departamento de parasitología del INDRE de la SSA y la UME de la UNAM).

5.4. Demostrar que al pasar el antígeno por una cromatografía de afinidad con Sepharosa4B-Concanavalina A, la reactividad cruzada se elimina, dando con ello una mayor especificidad a la pruebas de ELISA y Western-blot.

6. HIPÓTESIS.

La caracterización inmunológica del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana*, pasado por una cromatografía de afinidad con Sepharosa4B-Concanavalina A, mostrará que la reactividad cruzada se elimina, dando con ello una mayor especificidad a la pruebas de ELISA y Western-blot.

7. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS EMPLEADOS

MATERIAL BIOLÓGICO

- Sueros de pacientes con leishmaniasis proporcionados por el departamento de parasitología del INDRE.
- Sueros humanos como controles negativos obtenidos de donadores de la FES Zaragoza.
- Cepa de *Leishmania mexicana mexicana*, aislada de pacientes con LCD.

LISTA DE REACTIVOS

NOMBRE	FORMULA	PROVEEDOR
Acido cítrico	$H_3C_6H_5O_7 \bullet H_2O$	JT. Baker
Acrilamida (99.9%)O	C_3H_5NO	SIGMA
Albúmina sérica bovina (BSA)		JT. Baker
Azul de bromofenol	$C_{19}H_9Br_4O_5Sna$	SIGMA
Azul de coomassie	$C_{47}H_{48}N_3O_7S_2Na$	SIGMA
2-β-mercaptoetanol	$2SHCH_2CH_2OH$	SIGMA
Bis-acrilamida	$C_7H_{10}N_2O_2$	SIGMA
Carbonato de sodio anhidro	Na_2CO_3	JT. Baker
Citrato de sodio	$Na_3C_6H_5O_7 \bullet 2H_2O$	Técnica Química
Cloruro de potasio	KCl	Técnica Química
Cloruro de sodio	NaCl	JT. Baker
Colorante Ponceau S		SIGMA
Dextrana Azul 2000		Pharmacia Fine Chemical
Diaminobencidina (DAB)	$C_{12}H_{14}N_4 \bullet 4HCl$	SIGMA
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2H_2O$	SIGMA
Folin & Ciocalteu's (Agente de fenol)		SIGMA
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	MerK
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado	$NaH_2PO_4 \bullet 12H_2O$	JT. Baker
Fosfato de sodio monobásico	NaH_2PO_4	JT. Baker
Glicerol	$C_3H_8O_3$	JT. Baker

Continuación de reactivos:

NOMBRE	FORMULA	PROVEEDOR
Glicina	$C_2H_5NO_2$	SIGMA
Hidróxido de sodio	NaOH	Merk
Metanol	CH_3OH	JT. Baker
O-fenilendiamina (OPD)	$C_6H_8N_2$	SIGMA
Peróxido de hidrógeno al 30%	H_2O_2	Productos Químicos Monterrey
Persulfato de amonio	$(NH_4)_2S_2O_8$	SIGMA
Pesos moleculares		BioLabs
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	$C_{12}H_{25}O_4Sna$	SIGMA
Sulfato cúprico	$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	JT. Baker
Tartrato de sodio y potasio	$C_4H_4KnaO_6 \bullet 4H_2O$	Merk
TEMED	$C_6H_{16}N2$	SIGMA
TRIS base TRIS (hidroximetil)amino-metano	$C_4H_{11}NO_3$	SIGMA
Tween 20		Hycel de México

CONJUGADOS

CONJUGADO	PROVEEDOR
Anti-human IgG	Zymed Laboratories, Inc.
Anti-human IgM	Zymed Laboratories, Inc.

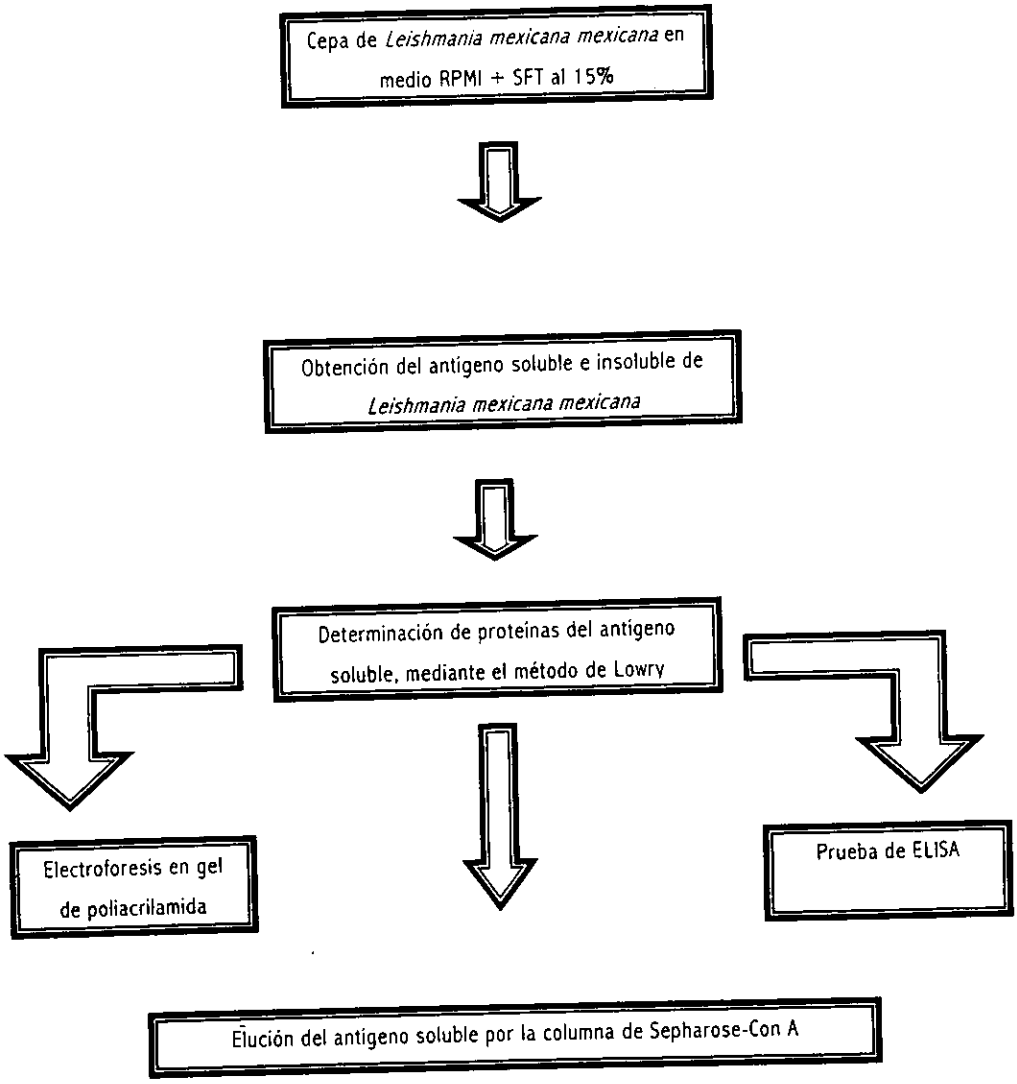
EQUIPO

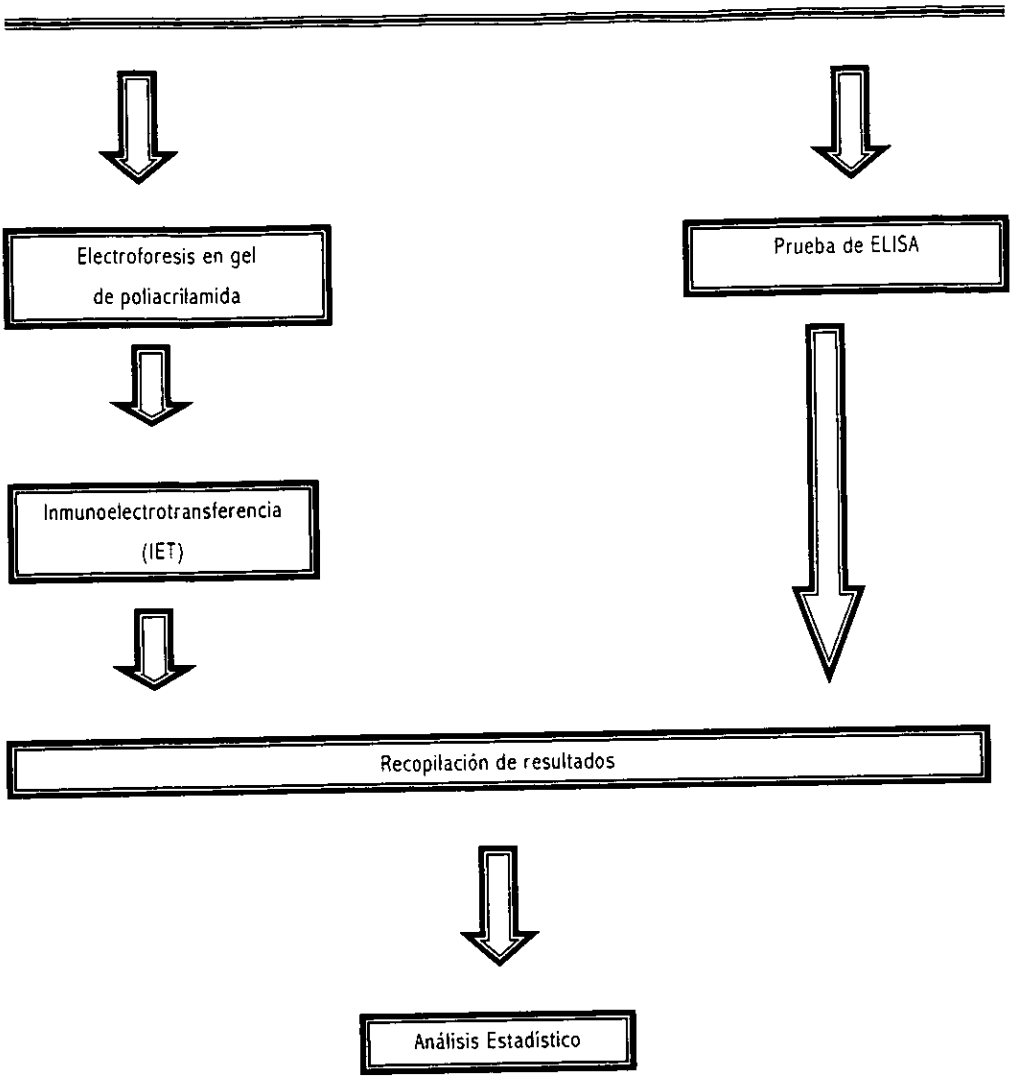
NOMBRE	MARCA
Agitador de placas de microtitulaión.	Bellco Glass Inc
Agitador vortex genie.	Scientific Industries Inc
Balanza analítica.	Mettler H 80
Centrifuga Damon	IEC Division
Centrifuga	Solbat
Espectrofotómetro para ELISA	Dynatech MR 250
Espectrofotómetro Spectronic 20.	Bausch & Lomb
Incubadora.	Riossa EC.
Refrigerador.	Philips 127 volts-VA
Cámara para electroforesis	Owl Scientifics, Inc
Cámara para electrotransferencia	BioRad.
Ultracentrifuga	Eppendorf 5415c
Fuente de poder	BRL
Potenciometro digital	Cole Palmer Ep500/15468

MATERIAL

MATERIAL	MARCA
Micropipeta de 20-100µL	Transferpette
Micropipeta de 200-1000µL	Transferpette
Vidrios para electroforesis	Owl Scientifics, Inc.
Separadores para electroforesis	BIO-RAD
Membrana de nitrocelulosa	BIO-RAD (0.45µm)
Placas para ELISA	Nunc

8. MÉTODOS


Cepa de *Leishmania mexicana mexicana* en medio RPMI + SFT al 15%
Obtención del antígeno soluble e insoluble de *Leishmania mexicana mexicana*
Determinación de proteínas del antígeno soluble, mediante el método de Lowry
Electroforesis en gel de poliacrilamida
Prueba de ELISA
Elución del antígeno soluble por la columna de Sepharose-Con A


Electroforesis en gel de poliacrilamida
Prueba de ELISA
Inmunoelectrotransferencia (IET)
Recopilación de resultados
Análisis Estadístico

8.1. PARÁSITOS

La cepas de Leishmania mexicana mexicana fueron proporcionadas por el Dr. Oscar Velasco Castrejon y la Dra. Beatriz Rivas Sánchez de la Unidad de Medicina Experimental (UME) de la UNAM, situada en el Hospital General de México. Fueron aisladas de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) y mantenidas en medio de cultivo NNN.

Promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* fueron cultivados en frascos para cultivo celular con medio RPMI, suplementado con suero fetal de ternera al 15%, se mantuvieron a temperatura de 22°C, hasta su crecimiento óptimo a fase estacionaria, que fue de aproximadamente 14 días.

8.2. OBTENCIÓN DEL ANTIGENO SOLUBLE

El cultivo en medio RPMI se centrifugó en tubos Falcon de 50mL a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, se tiro el sobrenadante. El botón obtenido se lavó tres veces con amortiguador fosfato salino pH 7.2 (PBS), a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante, y se añadió 1 mL de PBS e inhibidores de proteasas hasta obtener un volumen de 1.5 mL de muestra.

Enseguida, se realizo el proceso de congelación en N_2 líquido y descongelación en baño maría a 56°C, durante 12 veces. Lo obtenido se centrifugó a 10000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos.

El liquido sobrenadante fue removido y distribuido en dos tubos Eppendorf, y se guardo en congelación a –20°C hasta su uso. El contenido que quedo en el tubo, al remover el líquido sobrenadante es el antígeno INSOLUBLE, el cual se uso en una electroforesis.

8.3. ELUCIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE POR LA COLUMNA (SEPHAROSE 4B-CONCANAVALINA-A)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS EMPLEADOS:

Amortiguador de carbonato de sodio (0.05M):

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)	3.18 g
Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)	5.86 g
Agua bidestilada	2 L

Amortiguador de Urea 2M (pH=9.6):

Urea	200 g
Amortiguador de carbonato de sodio	1.5 L

Dextrana azul al 1%:

Dextrana Azul	0.005 g
Amortiguador de carbonato de sodio	0.05 mL

PROCEDIMIENTO PARA EL PASO DEL ANTÍGENO POR LA COLUMNA

Se colocó 1.5 mL de antígeno en una membrana de diálisis y fue dializado toda la noche en 600 mL del amortiguador de urea 2M. [61, 62] Antes de pasar el antígeno se procedió a calcular el volumen vacío, es decir, el volumen en el cual comienza a salir la muestra, esto se realizó colocando 0.05 mL de dextrana azul al 1% a la columna y cuantificando por medio de una probeta de 10 mL la cantidad exacta en la cual la primera gota de color azul salía de la columna. Una vez que terminó de salir toda la dextrana azul se dejo lavar la columna con el amortiguador de urea durante 10 min. Fue colocado el antígeno dializado en la columna con 5 mL de Sepharosa 4B-Concanavalina-A, que previamente fue equilibrada durante toda la noche con el mismo amortiguador de urea 2M pH=9.6, para remover del antígeno residuos de manosa, y nuevamente se comenzó a cuantificar el volumen vacío con una probeta de 10 mL. Se

colectaron fracciones de 0.5 mL, las cuales posteriormente fueron leídas en un espectrofotómetro UV a 280 nm.

8.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL ANTÍGENO SOLUBLE POR EL METODO DE LOWRY.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS EMPLEADOS:

Reactivo A:

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)	5 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	1 g
Tartrato de sodio y Potasio ($KNaC_4H_4KnaO_6 \bullet 4H_2O$)	0.067 g
Agua bidestilada	250 mL

Reactivo B:

Sulfato de cobre anhidro ($CuSO_4$)	0.025 g
Agua bidestilada	50 mL

Reactivo de Lowry::

Reactivo A	50 mL
Reactivo B	1 mL

PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR PROTEÍNAS:

Se realizó la técnica de Lowry pero cabe señalar que existe también el de Bradford. [63, 64] Se agregó a cada tubo 1 mL del reactivo de Lowry, enseguida se colocó las cantidades de estándar (1mg/mL) y las cantidades de muestra de la siguiente manera:

Estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA): 1mg/mL

TUBO	CANTIDAD DE MUESTRA CUANTIFICADA	CONCENTRACIÓN DE BSA
BLANCO	000 µL	0.000 mg/mL
2	20 µL	0.020 mg/mL
4	40 µL	0.040 mg/mL
5	60 µL	0.060 mg/mL
8	80 µL	0.080 mg/mL
10	100µL	0.100 mg/mL

Muestra Problema:

TUBO	CANTIDAD DE MUESTRA CUANTIFICADA
Fracción I	10 µL
Fracción I	20 µL
Fracción II	10 µL
Fracción II	20 µL
Antígeno sin pasar por columna	5 µL
Antígeno sin pasar por columna	10 µL

Se taparon muy bien los tubos y mezclaron perfectamente con ayuda de un vortex, se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente, y se le agregaron 100 µL de una solución 1:2 del reactivo de Folin-Ciocalteu (también llamado reactivo de fenol) y agua. Finalmente, se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. y la lectura se realizó a 660 nm.

8.5. MICROHEMAGLUTINACION EN PLACA

Preparación de reactivos.

Glóbulos rojos de carnero al 1%.

Glóbulos rojos de Carnero	0.1 mL
PBS	10 mL

PBS (pH=7.2):

Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($NaH_2PO_4 \bullet 12H_2O$)	2.9 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	0.2 g
Agua bidestilada	1 L

PROCEDIMIENTO PARA LA MICROAGLUTINACIÓN EN PLACA.

Se colocó una gota de 50 µL de PBS en cada uno de los pozos de la placa de microtitulación. Con uno de los dilutores de 50 µL, el cual fue incinerado previamente a la flama como si fuera asa de siembra, se tomó el suero y se mezcló bien girando 10 veces empezando con el pozo 1 y se realizó diluciones hasta el pozo 11, se dejó el pozo 12 como testigo negativo de la prueba. Se agregaron 50 µL de la suspensión de los glóbulos rojos de carnero al 1% y se mezcló bien. Finalmente se incubo durante una hora a 37° C y se leyó el título de aglutinación, y se reportó el título como el inverso de la dilución.

8.6. ELISA

PREPARACIÓN DE REACTIVOS EMPLEADOS:

Amortiguador de Recubrimiento:

Carbonato de Sodio Anhidro (Na_2CO_3)	0.318 g
Bicarbonato de Sodio ($NaHCO_3$)	0.586 g
Agua bidestilada	200 mL

PBS-TWEEN 20 al 0.05%

PBS	1 L
Tween 20	0.5 mL

PBS (pH=7.2):

Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($NaH_2PO_4 \bullet 12H_2O$)	2.9 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	0.2 g
Agua bidestilada	1 L

Solucion Bloqueadora:

Leche descremada Sveltes	5 g
BSA	1 g
PBS	100 mL

Sustrato:

SOLUCION A:

Ácido cítrico ($H_3C_6H_5O_7 \bullet H_2O$) 0.1M	2.101 g
Agua bidestilada	100 mL

SOLUCIÓN B:

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \bullet 12H_2O$) 0.2M	7.163 g
Agua bidestilada	100 mL

Tomar 24.3 mL de la solución A, mezclarlos con 25.7 mL de la solución B.

Peroxidasa de Rábano

o-fenilendiamina	20 mg
Sustrato	50 mL
Peróxido de hidrógeno	20 µL

PROCEDIMIENTO PARA ELISA

Se emplearon 3 placas de fondo U de 96 pozos tipo Inmmulon y se colocaron a radiación con luz UV durante 30 minutos. Se realizó la dilución de los antígenos fracción I y II de 1:31.25 y de 1:375 para el antígeno que no paso por la columna, en el amortiguador de recubrimiento, se pegó el antígeno a los pozos de poliestireno adicionando 100µL de esta solución. Se incubó la placa de ELISA a 4°C durante 1 hora. Se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y enseguida haciendo 3 lavados con la solución de PBS-Tween al 0.05%. Se adicionaron 300µL de la solución bloqueadora a cada pozo, y se incubaron las placas durante 1 hora a 4°C, transcurrido este tiempo se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y realizando 3 lavados con PBS-Tween al 0.05%. Se preparó el 1er anticuerpo (sueros problema, control grupo sanguíneo A, control grupo sanguíneo B), en una dilución 1:100 y se adicionaron 100 µL en cada respectivo pozo, se tapó la placa y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Se repite el proceso de lavado anteriormente descrito y enseguida se prepara el 2do anticuerpo en una dilución 1:1000 (IgG, IgM e IgA), se le adicionaron 100µL del conjugado a cada pozo, se tapo la placa y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Nuevamente se vierte el contenido de los pozos y se realizan tres lavados con PBS-Tween al 0.05%, finalmente se adicionaron 100 µL del sustrato-cromógeno a cada pozo, y se incubó por 30 min. a 37°C.

Transcurrido este tiempo se leyó la densidad óptica en un lector para placas de ELISA a 490 nm.

8.7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Solución A: monómero de acrilamida.

Acrilamida	29 g
Bis- acrilamida	1 g

Llevar a 100 mL con agua desionizada, aforar hasta que la solución este a temperatura ambiente. Filtrar la solución después de aforar y guardar a 4°C, no más de 1 mes.

Solución B: Amortiguador del gel separador, pH= 8.8.

Trizma base	36.3 g
Ácido clorhídrico (HCl) 1N	40 mL
EDTA 0.2M, pH=8.0	5.3 mL

Se ajusta el pH con HCl 1N. Se afora a 100 mL. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución C: Amortiguador del gel concentrador, pH= 6.8.

Trizma base	5.98 g
Ácido clorhídrico 5N	6 mL
EDTA 0.2M, pH= 8.0	5.3 mL

Se ajusta el pH con HCl 5N. Se afora a 100 mL. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución D: SDS al 10% (dodecil-sulfato de sodio).

SDS	10 g
Agua desionizada	100 mL

Filtrar con papel filtro después de aforar. Guardar a temperatura ambiente.

Solución E: Persulfato de amonio (PSA) al 10%.

Persulfato de amonio	200 mg
Agua desionizada	2000 µL

Solución F: TEMED

TEMED	1000µL

Solución G: Amortiguador de muestra 4X.

Solución C	300 µL
Solución D	200 µL
Glicerol 100%	400 µL
2-β-mercaptoetanol	50 µL
Azul de bromofenol.	50 µL

Mezclar los componentes, colocar en un tubo eppendorf de 1.5 mL y almacenar a −20°C.

Solución H: Amortiguador de desarrollo (Tris-HCl 0.025M, pH=8.3, glicina 0.192M, SDS 0.1%)

Tris-base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	10 mL
Agua destilada	1 L

Solución I: Colorante azul de Coomassie R-250 al 1% (stock)

Azul de Commassie	1.0 g
Agua destilada	100 mL

Colorante:(Azul de Commassie R-250 0.125%, MeOH 50%, ácido acético 10%).

Azul de Commassie	62 mL de la solución stock
MeOH	250 mL
Ácido acético	50 mL
Agua destilada	500 mL

Solución decolorante 1. (MeOH 50%, ácido acético 10%).

MeOH	500 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	1000 mL

Solución decolorante 2. (MeOH 5%, ácido acético 7%)

MeOH	700 mL
Acido acético	500 mL
Agua destilada	10 L

Formacion del gel separador

Con dos cristales de 12X 11 y 12 X10 cm y dos empacadores de teflón de 0.5mm se montó el soporte, donde se formó el gel de poliacrilamida. Se sellaron los lados y la parte inferior con agarosa al 2% cuidando de que no quedará algún espacio sin cubrir, en vaso de precipitado de 40 mL se mezclaron las siguientes cantidades para un gel al 10%:

Agua bidestilasa	3.232 mL
Solución A	2.333 mL
Solución B	1.316 mL
Solución D	70 µL
Solución E	36 µL
Solución F	10 µL

Se mezcló bien cuidando que no se formarán burbujas, se vació la mezcla al armazón a nivel aproximado de 4 cm del borde superior y se agregó cuidadosamente agua por los extremos aproximadamente 0.5 mL (el agua formó una capa cuya interfase se observa cuando el gel esta polimerizando).Una vez polimerizado se inclinó el armazón para desalojar el agua, se lavó la superficie del gel con agua bidestilada y se dejó reposar el gel unos minutos.

PREPARACIÓN DEL GEL CONCENTRADOR

En un vaso de precipitado de 40 mL se agregaron las siguientes cantidades para un gel al 10%:

Agua bidestilasa	2.350 mL
Solución A	0.690 mL
Solución C	0.870 mL
Solución D	41.4 µL
Solución E	41.4 µL
Solución F	6 µL

Se mezclo bien evitando que se formen burbujas, se llenó el armazón y se insertó el peine cuidando de no generar burbujas bajo los dientes de este, se dejó reposar el gel 10 minutos.

TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Se combinaron tres partes de la muestra de proteína, con una parte del amortiguador de muestra 4X (solución G), en un tubo Eppendorf. De esta manera se colocaron 200µL de antígeno de Leishmania fraccción I en un tubo Eppendort y se le adicionaron 66µL de la solución G, de igual manera se procede con el antígeno de Leishmania fracción II, del antígeno que no fue pasado por la columna se colocaron 70µL y se adicionaron 23µL de la solución G. Estos tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo por 4 minutos y finalmente se centrifugaron a 2000 r.p.m. por 30 seg.

CORRIDO DE LOS GELES.

Se retiró el peine suavemente del gel cuidando de no destruir los pozos, se llenó cada pozo con agua, y se drenaron invirtiendo la cámara, esto de dos a tres veces para evitar que se formen redes de restos del gel en los pozos, se colocó el armazón en su posición dentro de la cámara de electroforesis y se llenó la cámara interna y cada pozo con amortiguador de corrimiento (solución H), en cada pozo se colocó la cantidad de muestra ya establecida, y en el carril uno se colocó el marcador de peso molecular.

Finalmente se llenó el compartimento inferior de la cámara de electroforesis con amortiguador de corrimiento (solución H), se condujo a la fuente de poder y se corrió la electroforesis a 80 V de corriente constante hasta que llegó al gel separador a partir del cual se corrió a 120 V de corriente constante, se suspendió el suministro de corriente cuando el colorante quedó a aproximadamente 0.5 cm del límite inferior de los cristales.

TINCIÓN, DECOLORACIÓN Y SECADO.

Se desensambló el armazón y el gel se colocó en solución J durante toda la noche, al día siguiente el gel fue transferido a solución K y durante 1 hora, nuevamente el gel fue transferido a solución decolorante II, solución L, hasta obtener la decoloración deseada.

Una vez decolorado, el gel se colocó sobre un papel filtro y se cubrió con un plástico resistente al calor, y fue llevado al secador de geles a 60°C durante 45 min.

Cuando se realizó la inmunoelectrotransferencia se omitieron los pasos de tinción, decoloración y secado.

8.8. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS EMPLEADOS

PBS (Solución Salina de Fosfatos)

Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($NaH_2PO_4 \bullet 12H_2O$)	2.9 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	0.2 g
Agua bidestilada	1 L

PBS-TWEEN 20 AL 0.1%

Adicionar 1 mL de Tween 20 por cada litro de PBS.

Solución Bloqueadora.

Leche descremada Sveltes	5g
EDTA	0.08g
PBS	100mL

Diaminobencidina (DAB) 0.3 mg/mL

12 mg en 40 mL de PBS. Mezclar durante 5 min. Preparar 10 min. antes de su uso.

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Tomar 132µL de una solución al 30% y adicionar inmediatamente antes de su uso a 40 mL de DAB en PBS.

PROCEDIMIENTO PARA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)

Se realizó la electroforesis como se describió anteriormente. Durante todo el proceso se usaron guantes para manejar la membrana y los sueros. Se cortó un trozo de membrana de nitrocelulosa de 7X9 cm y poro de 0.45µm, se colocaron juntos el papel, el gel sin teñir, y el papel filtro en amortiguador de transferencia a temperatura ambiente por 10 min. En un "casette" del aparato se colocó la esponja, sobre la esponja se colocó un papel filtro previamente humedecido y sobre este la membrana de nitrocelulosa, posteriormente se colocó el gel cuidando que no quedaran burbujas atrapadas entre el gel y la membrana, después se colocó un segundo papel filtro y otra esponja y se cerró el "casette". Este se colocó en la cámara de transferencia y se conectó a los electrodos de tal manera que la membrana de nitrocelulosa quedó orientada hacia el electrodo positivo. Se conectó el sistema a la fuente de poder y se realizó la transferencia durante toda la noche a 15V de corriente constante. Al día siguiente, el "casette" se sacó de la cámara de transferencia, y se separó la membrana de nitrocelulosa, la cual se tiño en una solución colorante de rojo de Ponceau S durante 5 min. para visualizar las bandas y se realizaron las marcaciones necesarias, se destiñó con agua bidestilada. El gel fue colocado en azul de Commassie para asugurar la transferencia total.

La membrana de nitrocelulosa se colocó en la solución bloqueadora, durante 1 hora a 4°C. Trancurrido el tiempo de incubación se eliminó la solución bloqueadora y se realizaron cinco

lavados con PBS-tween al 0.1%. Las tiras fueron cortadas y se colocaron en diferentes tubos. Se realizaron las diluciones de las muestras (sueros problema 1:25) y cada una de las tiras se colocó en el suero respectivo diluido en PBS y fueron incubadas 1 hora a 37°C. Se lavó cada tira por separado cincos veces con PBS-Tween al 0.1%. Se preparó la dilución del 2° anticuerpo o conjugado unido a peroxidasa en PBS.

IgG anti-humano 1:250

IgM anti-humano 1:250

Las tiras se colocaron en el segundo anticuerpo y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de este tiempo, las tiras fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween al 0.1% y se revelaron con el sustrato para transferencia DAB, hasta la aparición de las bandas se enjuagan muy bien con agua de la llave y se secan al aire. Se colocaron en acetato para su conservación.

8.9. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un análisis de varianza (ANAEVA), este se define como una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada uno de los cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total. [65]

9. RESULTADOS

La purificación del antígeno de Leishmania mexicana mexicana se realizó mediante la técnica descrita anteriormente (sección 8.2) obteniéndose aproximadamente 1.2 mL de antígeno soluble, dicho antígeno corresponde a la fracción previa a la cromatografía de afinidad, en la cual se empleó la columna de Sepharosa4B-Concanavalina–A (aglutinina de *Ricinus comunis*), la cual habia sido pre-equilibrada con la solución de urea 2M en amortiguador de carbonato de sodio 0.05M, pH= 9.6, al realizar el cálculo del volumen vacío mediante el uso de dextrana azul al 1%, se encontró lo siguiente:

MUESTRA	VOLUMEN VACIO
Dextrana azul al 1%	2.0mL

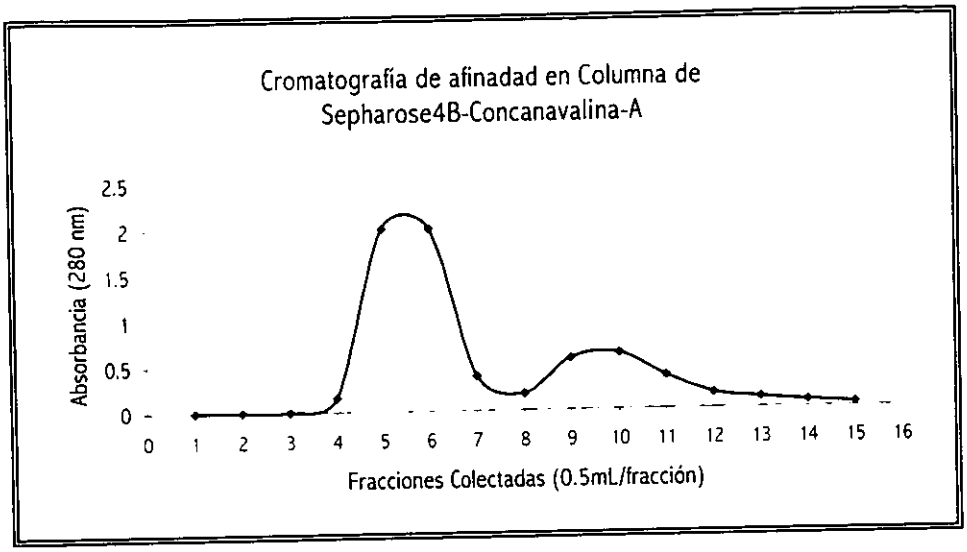
Este volumen medido con probeta de 10 mL y en las condiciones antes descritas.

El volumen de antígeno soluble que se empacó en la columna fue de 1.1 mL, el cual previamente había sido dializado con solución de urea 2M en amortiguador de carbonato de sodio 0.05M, pH= 9.6. inmediatamente después de colocar el antígeno soluble en la columna de Sepharosa4B-ConA se comenzó a medir con una probeta de 10 mL el volumen vacío y así no perder la muestra, para asegurar esto, se comenzaron a tomar alícuotas de 0.5 mL, a partir del mL 1.

Los resultados obtenidos se muestran enseguida:

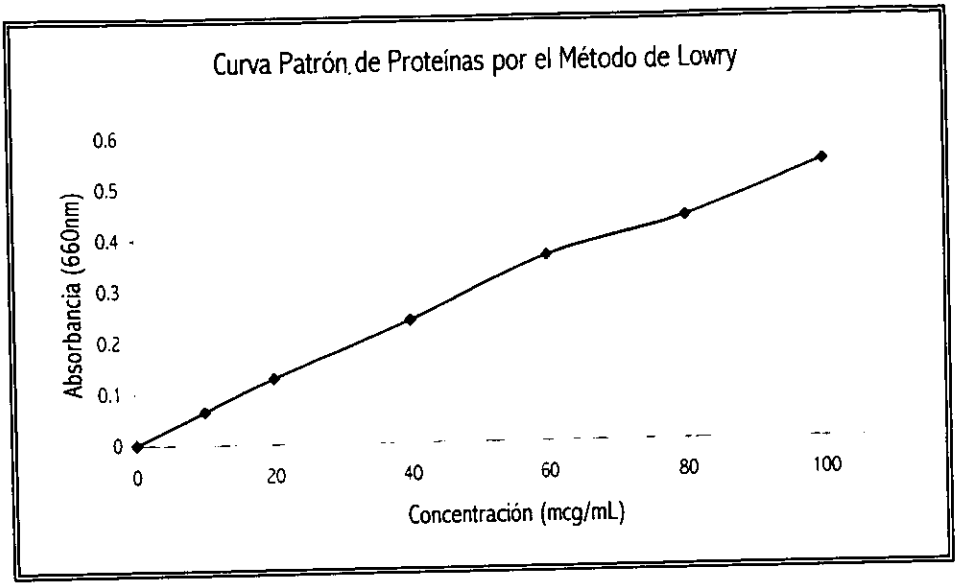
FRACCIONES COLECTADAS	ABSORBANCIA (280nm)
1	0.000
2	0.000
3	0.000
4	0.154
5	>2.00
6	>2.00
7	0.378
8	0.180
9	0.560
10	0.610
11	0.361
12	0.161
13	0.106
14	0.070
15	0.040

Tabla 1. Cromatografía en la columna de Sefarosa-4B-Concanavalina-A. La tabla muesta los datos de las fracciones obtenidas, al pasar el antígeno soluble cada fracción fue de 0.5 mL.



Gráfica 1. Patrón obtenido en la cromatografía de Afinidad con la Columna de Sefarosa4B-Concanavalina-A. Se colecto la fracción I del tubo 5 y 6 y la fracción II del 8 y 9.

Al finalizar la elución del antígeno por la columna, a las fracciones correspondientes se les realizó la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry, obteniendo los datos presentados en la tabla 2.



Gráfica 2. Curva patrón de proteínas por el método de Lowry, utilizando únicamente los valores del estándar de BSA 1mg/mL.

En base a lo anterior y por regresión lineales obtienen los siguientes valores de concentraciones:

FRACCIÓN COLECTADA	CONCENTRACIÓN
Fracción I	4.6355 µg/20 µL
Fracción II	7.0817 µg/20 µL
Antígeno sin pasar por columna	28.3450 µg/ 5 µL

[illegible]	CANTIDAD	ABSORBANCIA
Blanco	0	0.00
Patrón 1	10µL	0.065
Patrón 2	20µL	0.128
Patrón 3	40µL	0.239
Patrón 4	60µL	0.363
Patrón 5	80µL	0.417
Patrón 6	100µL	0.543
Muestra Antígeno Fracción I	10 µL	0.018
Muestra Antígeno Fracción I	20µL	0.040
Muestra Antígeno Fracción II	10 µL	0.027
Muestra Antígeno Fracción II	20µL	0.053
Muestra Antígeno Sin Eluir	5 µL	0.166
Muestra Antígeno Sin Eluir	10 µL	0.337

Tabla 2. la tabla muestra los datos de la determinación de proteínas por el método de Lowry, tanto del estándar de proteínas (BSA, 1mg/mL) como de las dos fracciones obtenidas al finalizar el proceso de purificación del antígeno, I y II, así como la muestra de antígeno que no fue pasada por la columna de Sepharosa4B-Concanavalina-A.

Los valores observados en la microhemaglutinación en placa de los antisueros comerciales y de los sueros de personas sanas se muestran en la siguientes tablas.

ANTISUERO	TITULO EN MICROHEMAGLUTINACION EN PLACA
Suero anti-B monoclonal	1:8
Suero anti-A monoclonal	1:16

Tabla 3. Título de antisueros comerciales por microhemaglutinación en placa.

SUERO	TITULO EN MICROHEMAGLUTINACION EN PLACA
Suero Grupo Sanguíneo "A"	1:128
Suero Grupo Sanguíneo "B"	1:128
Suero Grupo Sanguíneo "O"	1:64

Tabla 4. Título de sueros de humanos sanos por microhemaglutinación en placa.

Para la realización de las pruebas de ELISA, electroforesis e inmunoelectrotransferencia se requirieron tanto la concentración de los antígenos purificados y el antígeno sin pasar por la columna, como el título por microhemaglutinación de los sueros comerciales y los sueros humanos.

Para la prueba de ELISA indirecto se utilizó un factor de dilución de 31.25, partiendo de una concentración de 5.8536μg en 20μL, para obtener una concentración final de 8μg/mL de proteína, esto tanto para la fracción I y la fracción II.

Para la fracción sin purificar se utilizo un factor de dilución de 375, partiendo de una concentración de 28.3450µg en 5µL, para obtener una concentración final de 16µg/mL de proteína.

Se realizó la técnica de ELISA indirecto en tres placas, colocando en cada una las diferentes fracciones, así como los diferentes sueros comerciales y sueros humanos de grupos sanguíneos del sistema ABO. De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados:

NUMERACIÓN	SUERO	IgG	IgM	IgA
1	KA	1.257	0.289	0.076
2	LCD	1.210	0.780	0.196
3	LCD	1.129	0.261	0.075
4	LCL	1.217	1.217	0.078
5	LCD	1.155	0.603	0.154
6	LCD	1.195	0.504	0.170
7	LCD	1.217	0.629	0.168
8	LCD	1.188	0.592	0.149
9	LCD	1.117	0.387	0.312
10	LCD	1.182	0.374	0.177
11	LCD	1.129	0.693	0.141
12	LCD	1.195	1.057	0.228
13	LCD	1.111	0.578	0.208
14	LCD	1.177	1.041	0.194

Tabla 5. Valores obtenidos mediante la realización de la técnica de ELISA, utilizando antígeno sin purificar, diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis, sueros comerciales, sueros humanos sanos de grupo sanguíneo "A" y "B", y diferentes conjugados.

NUMERO DE MICROPOZO	SUERO	IgG	IgM	IgA
15	LCD	1.148	0.823	0.112
16	LCD	0.917	0.415	0.088
17	LCD	1.195	0.808	0.156
18	LCD	1.123	0.453	0.104
19	LCD	1.195	0.707	0.309
20	LCD	1.188	0.362	0.204
21	LCD	1.182	1.072	0.161
22	LCD	0.932	0.256	0.170
23	LCD	1.188	0.631	0.217
24	LCD	1.217	0.612	0.217
25	LCD	1.217	1.214	0.817
26	ANTI-A (COM)	0.040	0.023	0.025
27	ANTI-B (COM)	0.062	0.035	0.025
28	ANTI-A (HUM)	1.217	0.811	0.345
29	ANTI-B (HUM)	0.036	0.550	0.180

Continuación de tabla 5. Valores obtenidos mediante la realización de la técnica de ELISA, utilizando antígeno sin purificar, diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis, sueros comerciales, sueros humanos sanos de grupo sanguíneo "A" y "B", y diferentes conjugados.

NUMERACIÓN	SUERO	IgG	IgM	IgA
1	KA	1.213	0.751	0.126
2	LCD	1.195	1.077	0.308
3	LCD	1.139	0.021	0.141
4	LCL	1.210	1.195	0.372
5	LCD	1.188	0.999	0.178
6	LCD	1.203	0.854	0.239
7	LCD	1.188	1.041	0.176
8	LCD	1.182	0.841	0.201
9	LCD	1.161	0.578	0.274
10	LCD	1.129	0.641	0.204
11	LCD	1.067	1.021	0.194
12	LCD	1.155	1.168	0.333
13	LCD	1.117	0.877	0.221
14	LCD	1.172	1.161	0.235
15	LCD	1.168	1.151	0.190

Tabla 6. Valores obtenidos mediante la realización de la técnica de ELISA, utilizando antígeno Purificado fracción I, diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis, sueros comerciales, sueros humanos sanos de grupo sanguíneo "A" y "B", y diferentes conjugados.

NUMERACIÓN	SUERO	IgG	IgM	IgA
16	LCD	0.906	0.655	0.139
17	LCD	1.188	0.972	0.166
18	LCD	1.182	0.829	0.184
19	LCD	1.033	0.814	0.204
20	LCD	1.182	0.608	0.378
21	LCD	1.135	1.148	0.262
22	LCD	0.791	0.377	0.237
23	LCD	1.155	0.060	0.268
24	LCD	1.188	1.151	0.256
25	LCD	1.213	1.249	0.751
26	ANTI-A (COM)	0.029	0.029	0.018
27	ANTI-B (COM)	0.038	0.038	0.016
28	ANTI-A (HUM)	1.003	1.003	0.249
29	ANTI-B (HUM)	0.700	0.700	0.111

Tabla 6. Valores obtenidos mediante la realización de la técnica de ELISA, utilizando antígeno Purificado fracción I, diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis, sueros comerciales, sueros humanos sanos de grupo sanguíneo "A" y "B", y diferentes conjugados.

NUMERACION	SUERO	IgG	IgM	IgA
1	KA	1.213	0.751	0.126
2	LCD	1.195	1.077	0.308
3	LCD	1.139	0.021	0.141
4	LCL	1.210	1.195	0.372
5	LCD	1.188	0.999	0.178
6	LCD	1.203	0.854	0.239
7	LCD	1.188	1.041	0.176
8	LCD	1.182	0.841	0.201
9	LCD	1.161	0.578	0.274
10	LCD	1.129	0.641	0.204
11	LCD	1.067	1.021	0.194
12	LCD	1.155	1.168	0.333
13	LCD	1.117	0.877	0.221
14	LCD	1.172	1.161	0.235
15	LCD	1.168	1.151	0.190

Tabla 7. Valores obtenidos mediante la realización de la técnica de ELISA, utilizando antígeno Purificado fracción II, diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis, sueros comerciales, sueros humanos sanos de grupo sanguíneo "A" y "B", y diferentes conjugados.

NUMERACIÓN	SUERO	IgG	[illegible]	[illegible]
16	LCD	0.906	0.655	0.139
17	LCD	1.188	0.972	0.166
18	LCD	1.182	0.829	0.184
19	LCD	1.033	0.814	0.204
20	LCD	1.182	0.608	0.378
21	LCD	1.135	1.148	0.262
22	LCD	0.791	0.377	0.237
23	LCD	1.155	0.060	0.268
24	LCD	1.188	1.151	0.256
25	LCD	1.213	1.249	0.751
26	ANTI-A (COM)	0.029	0.029	0.018
27	ANTI-B (COM)	0.038	0.038	0.016
28	ANTI-A (HUM)	1.003	1.003	0.249
29	ANTI-B (HUM)	0.700	0.700	0.111

Tabla 7. Valores obtenidos mediante la realización de la técnica de ELISA, utilizando antígeno Purificado fracción II, diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis, sueros comerciales, sueros humanos sanos de grupo sanguíneo "A" y "B", y diferentes conjugados.

Se realizó un análisis electroforético empleando únicamente las muestras de antígeno separado en el proceso de obtención de este. De esta manera se emplearon cantidades conocidas de cada uno de estos antígenos.

[illegible]	[illegible]	ANTIGENO
1 y 6	5 µL	MPM
2	50µL	Antígeno soluble
3	20µL	Antígeno soluble concentrado
4	30µL	Antígeno insoluble
5	30µL	Antígeno total

Tabla 8. Cantidades empleadas para el análisis PAGE-SDS de los diferentes antígenos obtenidos, así como los carriles en donde se colocaron

Se tiño en azul de Commasie el gel y se observaron las siguientes bandas:

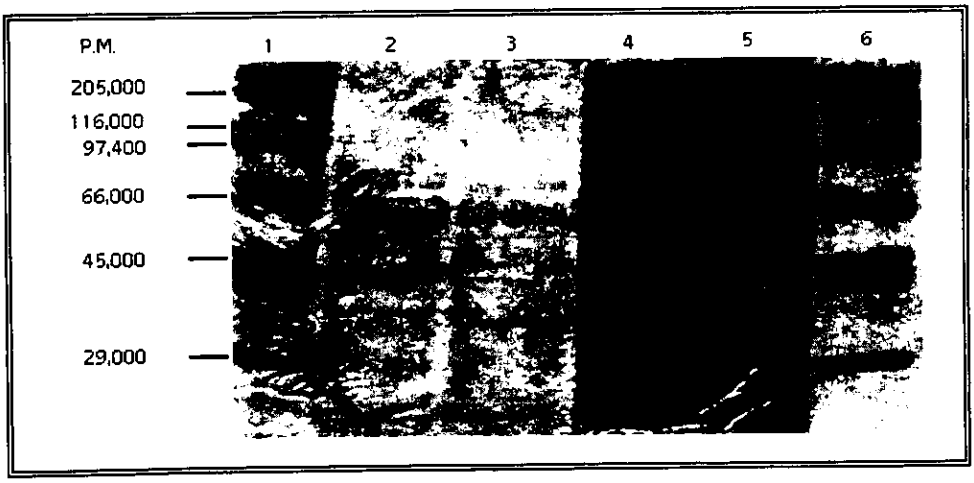


Figura 10. Análisis por PAGE-SDS, de los diferentes antígenos obtenidos.

Una vez realizadas las técnicas de microhemaglutinación y ELISA indirecta con las fracciones de antígeno purificado I y II, y la fracción sin purificar, todas estas se sometieron al análisis electroforético, empleando cantidades conocidas de cada una de estas fracciones (Tabla 8). Se realizó la tinción del gel con azul de Commassie y pudo observarse claramente la presencia de bandas alrededor de los 63 KD, lo cual nos indica la presencia de la GP-63, en las fracciones I y II (Figura 11).

CARRIL	CANTIDAD (VOL)	FRACCIÓN
1	15 µL	MPM
2	50 µL (32 µg)	Antígeno sin purificar
3	200 µL (80 µg)	Fracción I

Tabla 9. Cantidades empleadas para el análisis PAGE-SDS de los diferentes antígenos obtenidos, después por el paso por la columna de Sepharosa4B-Cocnanavalina-A, asi como los carriles en donde se colocaron

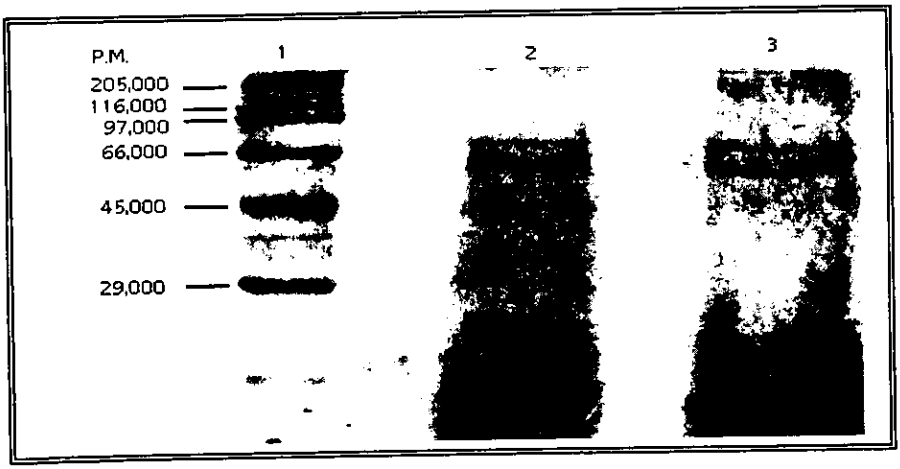
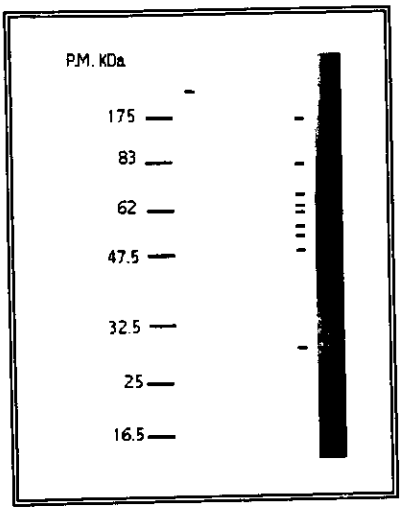


Fig 11. Análisis por PAGE-SDS, de los diferentes antígenos obtenidos después del paso por la columna de Sepharos4B-Concanavalina-A

Una vez realizadas las electroforesis antes mostradas se procedió a realizar la inmunoelectrotransferencia, para las diferentes fracciones I, II y antígeno sin purificar soluble de *Leishmania mexicanana mexicana.*

Los resultados obtenidos son los siguientes:



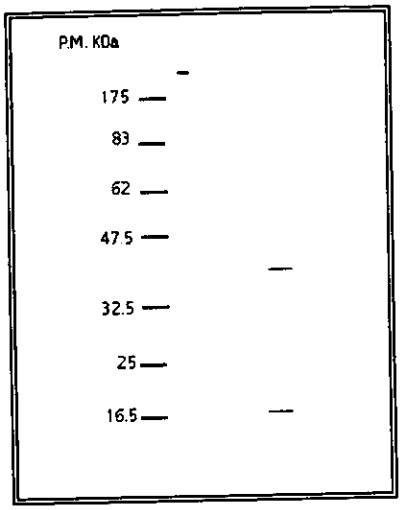


Fig.12. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción sin purificar, suero de paciente 1, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG (A) e IgM (B) en dilución 1:250.

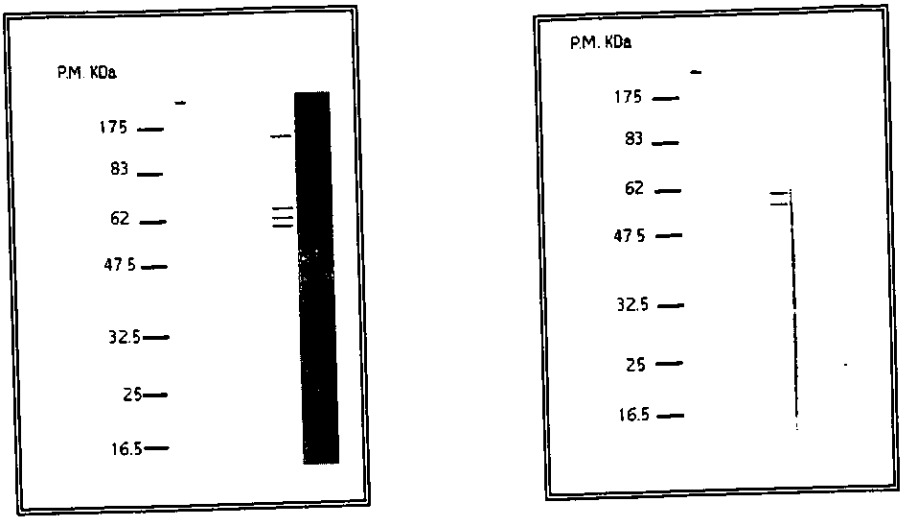


Fig.13. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción I, suero de paciente 1, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG (A) e IgM (B) en dilución 1:250.

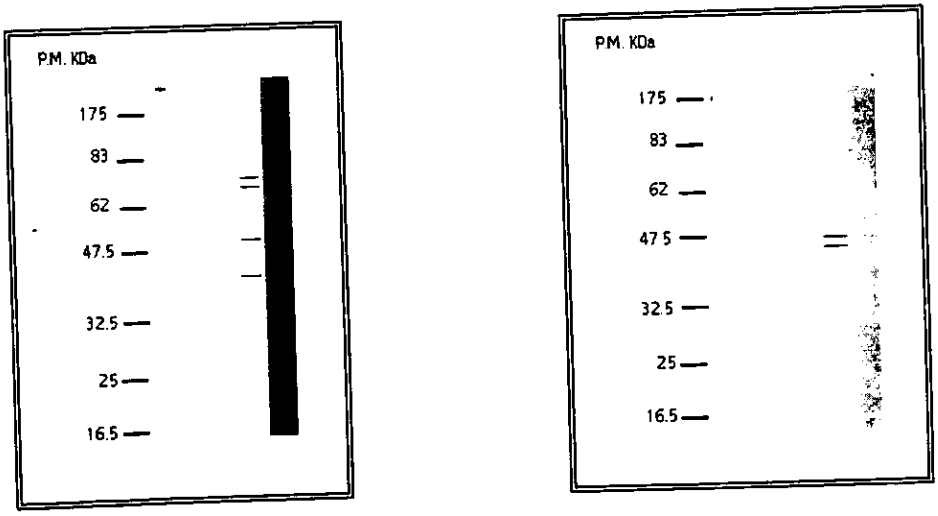


Fig.14. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción II, suero de paciente1, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG (A) e IgM (B) en dilución 1:250.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

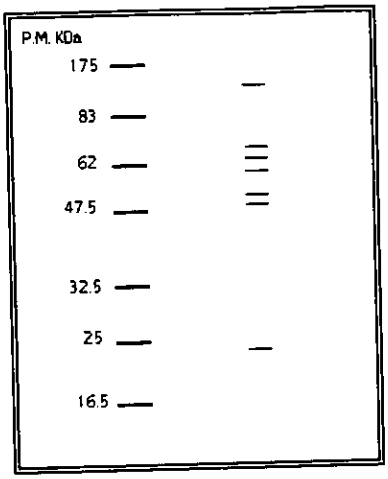
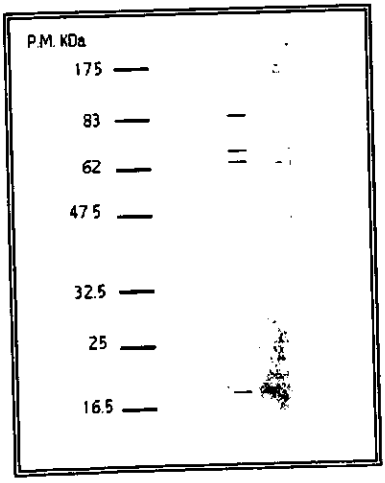


Fig.15. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción sin purificar, suero de paciente2, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG en dilución 1:250. (NO SE ENCONTRO BANDAS CON ESTA FRACCIÓN AL TRATARLO CON CONJUGADO IgM)



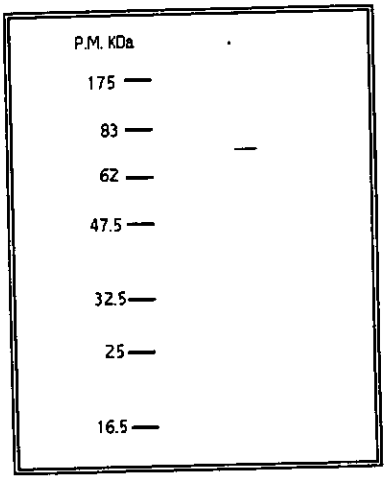


Fig.16. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción I, suero de paciente 2, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG (A) e IgM (B) en dilución 1:250.

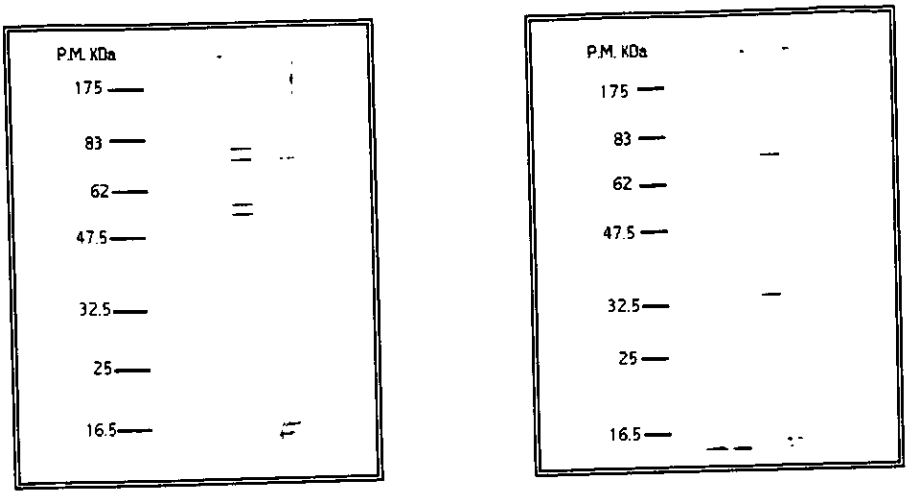


Fig.17. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción II, suero de paciente2, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG (A) e IgM (B) en dilución 1:250.

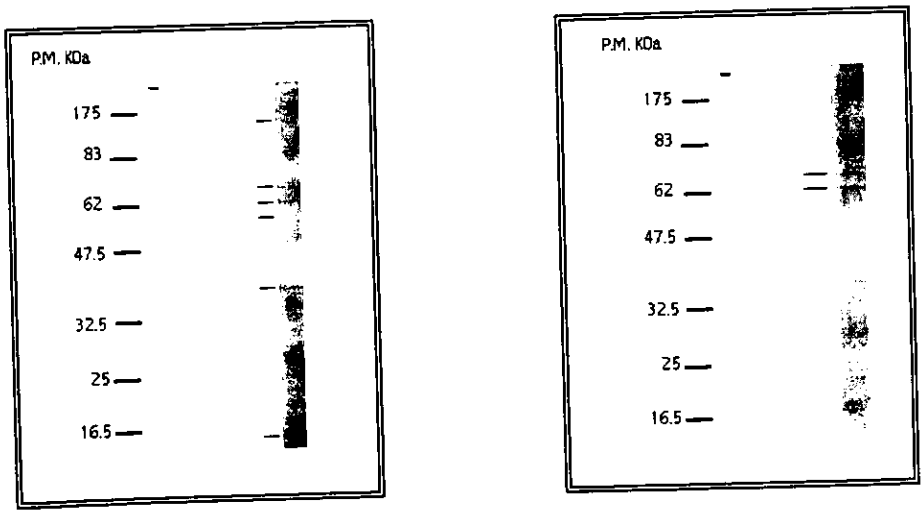


Fig.18. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción sin purificar (A) y la fracción I(B), suero de paciente 3, con LCD (dilución 1:25), y conjugado IgG (dilución 1:250).

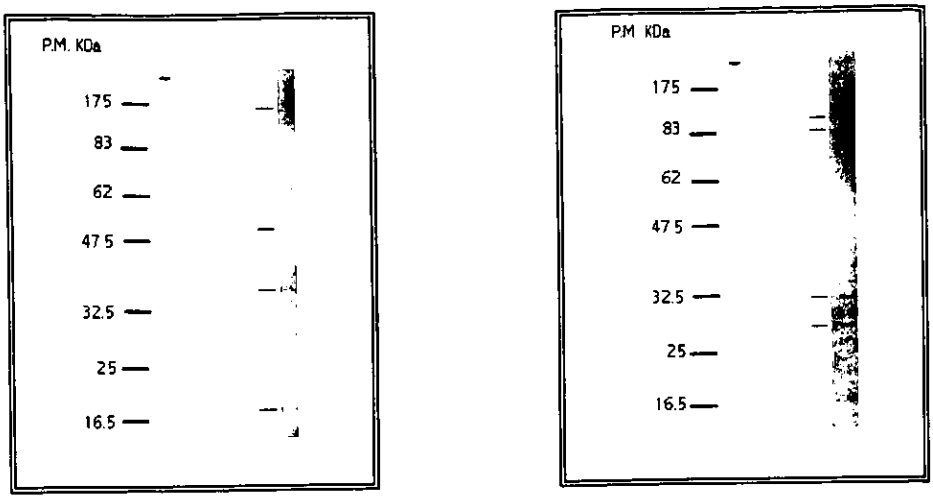


Fig.19. Inmunoelectrotransferencia. Utilizando la fracción II (A) y la fracción sin purificar(B), suero de paciente 3 con LCD (dilución 1:25) en A y el suero sano con grupo sanguíneo "B" en B, y conjugado IgG (dilución 1:250).

10. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó el paquete estadístico mutivariado de SPSS para la versión Windows 5.1. Utilizando para el diseño experimental ANDEVA. Todas determinaciones con un alfa del 0.05 y una confianza al 95%.

Inmunodobulina	Valor de P	CONCLUSIÓN
IgA	0.0512	NO existe diferencia significativa
IgG	0.9714	NO existe diferencia significativa
IgM	0.0406	SI existe diferencia significativa

El análisis estadístico se realizó comparando cada una de las inmonuglobulinas empleadas en la técnica de ELISA, contra cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía.

11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al pasar el antígeno por una columna de Sepharosa4B-Con-A, se obtuvieron dos fracciones antigénicas a las que se les denominó fracción I y fracción II. La fracción I salió inmediatamente después del volumen vacío, lo que indica que esta fracción no contiene residuos con manosa. La fracción II, que salió separada después de la fracción I, posee componentes antigénicos con manosas y fueron retenidos por la columna. A las tres fracciones: la fracción sin pasar por la columna, la fracción I y la fracción II, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Los resultados obtenidos con esta técnica nos muestran que la fracción sin pasar por la columna presenta mayor cantidad de proteínas, y que estas se encuentran entre 175, 130, 100, 83, 70, 63, 60, 56, 48, 33, 29 KDa y menores a este peso molecular. Mientras que la fracción I, solo se observó la presencia de proteínas con peso molecular entre 175, 130, 70, 63, 60, 56 y menores a 29 KDa. De esta manera, el paso por la columna retuvo las proteína de peso molecular aproximado a 100, 83, 48 y 33 KDa que deben contener manosa.

Los resultados de la técnica de ELISA , se sometieron a análisis en un programa estadístico SPSS para windows. La prueba de ANOVA de una vía, muestra que existe una diferencia significativa entre las fracciones de los antígenos, teniendo una respuesta mayor contra la fracción I, cuando se determinaron anticuerpos de tipo IgM. P= 0.0087. La respuesta de IgA contra las fracciones no discrimina entre una fracción y las otras P=0.0435 (no se considera significativa la prueba por estar en el límite de significancia 0.05). Tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos de fracciones cuando se determinó la respuesta de tipo IgG. P= 0.9714.

Al realizar la técnica de inmunoelectrotransferencia (IET)con las tres diferentes fracciones del antígeno y determinando dos diferentes inmunoglobulinas (IgG, IgM) y tres diferentes sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), se encontró que el paciente 1, con la fracción sin purificar y usando conjugados contra IgG, mostró bandas correspondientes a

175, 83, 70, 63, 60, 56, 50, 48 y 30 KDa de peso molecular. Bajo las mismas condiciones pero determinando IgM, solo se presentaron bandas entre 35 y 16.5 KDa. Para la fracción I determinando IgG, se revelaron bandas entre 175 y alrededor de 63 KDa, al determinar anticuerpos de tipo IgM, se observaron bandas 47 KDa. Para la fracción II en este mismo paciente utilizando IgG se observaron bandas de peso molecular aproximado a 70, 45 y 40 KDa, mientras que para IgM las bandas presentes estuvieron alrededor de 47 KDa

Al realizar la prueba de IET para el paciente 2, utilizando la fracción sin purificar e IgG, mostró bandas de peso molecular aproximado a 130, 83, 70, 63, 56, 50 y 48 KDa, con IgM no se observó ninguna banda.

Con la fracción I, y determinando IgG se presentaron bandas alrededor de 70, 63 y 18 KDa, cuando se determinó IgM se observó una sola banda con peso molecular aproximando de 70 KDa. En la fracción II, para el mismo paciente y utilizando IgG se mostraron bandas de peso molecular de 80, 70, 56 y 50 KDa; mientras que al medir IgM, ahí se encontraron bandas de 70 y 32 KDa.

Al realizar la prueba de IET con el suero del paciente 3, utilizando la fracción sin purificar e IgG como conjugado, mostró bandas de peso molecular aproximado a 175, 70, 63, 56, 40 y 16 KDa. En la fracción I se encontró un par de bandas alrededor de 63 KDa. Y en la fracción II se observaron bandas que corresponden a 175, 48, 34 y 17 KDa. Como puede observarse la banda específica de leishmania de 63 KDa esta presente en la fracción sin pasar por la columna y también en la fracción I; pero esta ausente en la fracción II, es decir, la Gp 63 no se pegó a la columna, lo cual nos sugiere que este antígeno no posee residuos de manosa.

La técnica de IET se realizó usando la fracción sin pasar por la columna, y sueros de sujetos sanos con grupos sanguíneos "A" y B". Los sueros del grupo sanguíneo "A" (isoaglutininas antiB) no mostró ninguna banda, mientras que el suero de grupo sanguíneo "B"(isoaglutininas antiA), presentó bandas de peso molecular aproximado a 100, 83, 33 y 30 KDa, antígenos que están en la fracción sin pasar por la columna . Los antígenos 175 y 70 KDa deben tener diferente grado de residuos de manosa, pues aparecen tanto en la fracción I como en la fracción II.

Cuando realizamos la técnica de IET observamos que las bandas de anticuerpos IgM van dirigidas contra antígenos que no corresponden a los 63 KDa, por lo tanto tenemos una respuesta contra antígenos no específicos inmunodominantes que pudieran tener epitopes con carbohidratos; pero sin presencia de manosa, ya que la fracción I no se unió a la columna. La presencia de IgM se podría explicar de dos formas: La posible mutación de la cepa de *Leishmania mexicana mexicana* dentro del huesped o la respuesta a epitopos de carbohidratos que no son reconocidos por el receptor de la célula T y no dejan memoria inmunológica, lo hace que la reinfección endógena o exogena con la misma leishmania genere una respuesta primaria como si por primera vez se tuviera el contacto.

La respuesta de IgG contra las fracciones nos muestran en la técnica IET que reconocen el antígenos 63KDa en la fracción de la mezcla de antígenos sin pasar por la columna y lo reconocen en la fracción I; pero este antígeno no se encuentra en la fracción II con esto podemos decir que el antígeno 63KDa de la cepa de *Leishmania mexicana mexicana* no tiene manosa en su composición, como se ha reportado en las cepas de *Leishmania donovani chagasi.* [20, 21] La respuesta de IgG también reconoce a otras proteínas que están en las tres fracciones probadas v.gr. la proteína 175, 70 KDa que esta en todos los sueros de pacientes, esta proteína por supuesto debe tener diferentes grados de manosas pues aparece tanto en la fracción I como en la II.

12. CONCLUSIONES

Usando una columna de sefarosa 4B-conA para separar antígenos crudos de *Leishmania mexicana mexicana* se obtuvieron los siguientes conclusiones: la fracción I contiene todas aquellas proteínas que carecen de residuos de manosa y dentro de estas se encuentra la proteína 63KDa específica de leishmania y se elimina el antígeno 100, 83, 48 y 30KDa. En la fracción II que se retiene en la columna, no se encontró el péptido 63KDa. La presencia de estos antígenos se reveló mediante la técnica de electroforesis y mediante la técnica de IET.

Cuando se efectuó la técnica de ELISA usando las tres fracciones. El análisis estadístico de los tres grupos nos mostró que la respuesta de IgM es diferente, siendo más alta en la fracción I que la respuesta que se presenta en la fracción sin pasar por la columna y en la fracción II, sin embargo, cuando se realizó la técnica de IET no se presentó respuesta contra la Gp 63 KDa. En la respuesta de IgG e IgA no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos; pero el isotipo IgG reconoce la 63 KDa usando la técnica de IET.

Los sueros del grupo sanguíneo B (isoaglutininas antiA) dieron valores altos en la técnica de ELISA con el isotipo IgG; pero en la técnica de IET usando el antígeno sin pasar por la columna la respuesta va dirigida contra los péptidos alrededor de 29 KDa y alrededor de 100 KDa y no se encontró banda contra el péptido 63 KDa; sin embargo, cuando la técnica de IET se realizó usando la fracción I no se observó ninguna banda, lo cual nos indica que el paso por la columna elimina varios antígenos reactivos a isoaglutininas de grupo sanguineo. Los sueros del grupo sanguíneo "A" y aquellos el grupo "O", determinando todos los isotipos IgA, IgG, e IgM en la técnica de ELISA, mostraron valores muy bajos, similares a los valores encontrados con los testigos negativos

13. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

a) Se propone utilizar la columna de Sefarosa4B-ConA como primer paso de purificación, sin embargo, se tendrían que emplear una o más columnas como segundo y/o tercer paso de purificación del antígeno soluble para lograr eliminar totalmente la reactividad cruzada con grupo sanguíneo "B".

b) Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de implementar otras técnicas para ser utilizadas en el inmunodiagnóstico de la leishmaniasis por *Leishmania mexicana mexicana*.

c) Se propone que se determine el grado de glicatación con manosa del antígeno realizando pases por una cepa de ratones susceptibles, para relacionarlo con la virulencia del parásito.

14. REFERENCIAS

1. Goldsmith R, Heyneman D. Parasitología y medicina tropical. México: Editorial El Manual Moderno, 1995: 361-393.
2. Velasco CO. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación técnica del INDRE 1992; 7: 1-48.
3. Valdespino GJL, Escobar GA, Del Río ZA, Ibáñez BS, Magos LC. Enfermedades tropicales en México: diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. México: Editorial INDRE, 1994; 4: 293-308.
4. Humer D. Leishmaniasis [en línea] [Londres] actualizado 1998. [Consultado 26 jun 2000] disponible en World Wide Web <http://www.homepages.uel.ac.uk/ 2738m>
5. Leishmaniases History [en línea] [USA] actualizado 2000. [consultado el 26 abril de 2000] Disponible en World Wide Web <http://www.travelhealth.com/leishman2.htm>
6. Atlas of Medical Parasitology: Skin Parasites. [en línea][Italia]. Actualizado 200. [consultado 13 mayo 2000]. Disponible en World Wide Web http://www.cdfound.to.it/HTML/leis1.htm
7. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW . Parasitología. 2ª de. México, Editorial Salvat. 1994: 67-88.
8. Medical Enciclopedy: Leishmaniasis [en línea] [USA]. Actualizado 1999. [consultado 25 abril de 2000]. Disponible en World Wide Web <http://www.drkoop.com/conditions/ency/article/001386.htm>
9. Life cicle of *Leishmania sp.* {en línea][USA]. Actualizado 1998. [consultado 15 mayo 2000] Disponible en World Wide Web http://web.missouri.edu/~mmiwww/s6s5.jpg
10. Frisby AJ. Protozoa: *Leishmania mexicana mexicana:* morphology. [en línea][USA]. Actualizado 1995. [consultado 30 mayo 2000]. Disponible en World Wide Web http://jeffline.tju.edu/CWIS/OAC/microweb/parasitology/protozoa/protozoa10_morph.html.
11. Cariño CR. Implementación de una técnica de ELISA para el diagnóstico de leishmaniasis. México, Impresiones Perla, 1996: 4-74.

12. The Leishmaniases and *Leishmania*/HIV co-infection. [en línea] [internacional] Actualizado, May 2000 [consultado 24 abril de 2000]. Disponible en World Wide Web < http://www.who.int/inf-fs/en/fact116.html>

13. Lopes Costa JM. Resumo de Tese [en línea] [SP, Brasil]. Actualizado 1998. [Consultado 24 abril de 2000]. Disponible en World Wide Web <http://www.mednet.com.br/instpub/rsbmt/v31(4)/401-403.htm>

14. Cordova UC, Albertos AN, Andrade NF, Canto LS. Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del Estado de Tabasco [en línea]. Actualizado 1993. [Consultado 26 abril de 2000]. Disponible en World Wide Web <ttp://www.insp.mx/salud/35/354-3s.html>

15. Monroy OA, Sosa CT, Rivas SB, Ruíz TR, Mendoza GA, Favila CL. Seroepidemiological studies of cutaneus Leishmaniasis in Campeche State of Mexico [en línea]. Actualizado 1992. [consultado 25 abril 2000]. Disponible en World Wide Web <http://iris.dbbm.fiocruz.br/www-mem/92(1)/3031.html>

16. *Leishmania mexicana and tropica*-Images. [en linea][USA]. Actualizado 1998. [consultado 28 mayo 2000]. Disponible en World Wide Web http://medstat.med.utah.edu/parasitology/lmexim.html.esion

17. Leishmaniasis (kala-azar). [en línea][internacional]. Actualizado 2000 [Consultado 16 mayo de 200]. Disponible en World Wide Web <http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis.htm>

18. Colomer-Gould V, Galvao QL, Keitly J, Nogueira N. A common major duperface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. J. Exp. Med; 162: 902-916.

19. Dalaney JT. Binding interactions of glycoproteins with letins. Mol. Cell. Biochem 1979; 21: 43-63

20. Wilson ME, Hardin KK. The major *Leishmania donovani chagasi* Surface glycoprotein in tunicamycin-resistant promastigotes. J.of Immunol, 1990; 144 (12): 4825-34.

21. Wilson ME, Hardin KK. The major Concanavalin A-binding surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes is involved in attachment to human macrophages.

22. Chakraborty P, Das PK. Role of mannose/N-acetilglucosamine receptors in blood clearance and cellular attachment of *Leishmania donovani*. Molecular and biochemical parasitology, 28 (1988) 55-62

23. Handman E, Ng K. *Leishmania* Glicolipids: Structure and Funtion [en línea] [Austria].Actualizado 1999. [Consultado 25 abril 2000]. Disponible en World Wide Web <http://www.plantcell.unimelb.edu.au/leishmania.html

24. MendonÇa SCF, Russell DG, Coutinho SG. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). 1991; 83 (3): 472-78.

25. Decker-Jackson JE, Honigberg BM. Glycoproteins released by *Leishmania donovani:* Immunologic Relationships with Host and Bacterial Antigens and Preliminary Biochemical Analysis. J. Protozool. 1978, 25 (4):514-525.

26. Dawidowicz AK, Hernandez G, Infante RB, Convit J. The surface membrane of *Leishmania*. The effects of lectins on different stages of *Leishmania braziliensis*. J. of parasitol. 1985; 61 (5): 950-53.

27. Dillon RJ, lane rp. Deetection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sandfly vector. Parasitology, 118 (1): 27-32.

28. Tapia FJ, Castes M. Inmunología de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. [en línea][Venezuela] Actualizado 1998. [consultado 15 mayo 2000]. Disponible en World Wide Web http://www.biomedicina.org.ve/publicaciones/Leishma.html.

29. Leishmania [en línea] [Canadá]. Actualizado 1999. [Consultado 26 mayõ 2000]. Disponible en World Wide Web http://martin.parasitology.mcgill.ca/jimspage/biol/leish.htlm

30. Greenblatt CL, Schnur LF. Immunology, epidemiology and biochemestry of *Leishmania*. [en línea] [Israel]. Actualizado 1998. [consultado 30 mayo 2000]. Disponible en World Wide Web <http://www.md.huji.ac.il/depts/parasitology/p-3-3.html>

31. Immunology (*Leishmania*) [en línea] [Brasil]. Actualizado 1996. [Consultado 20 abril de 2000]. Disponible en World Wide Web <http://iris.dbbm.fiocruz.br/www-mem/96caxambu/im1.html>

32. Kalipada K. Serodiagnosis of leishmaniasis.Critical Reviews in Microbiol. 1995; 21 (2): 123-152.

33. Blackwell, Ezekowitz MB, Roberts JY, Channon RBS and S Gordon. Macrophage complement and lectin-like receptor bind Leishmania in the absence of serum. J. Exp. Med. 1985; 162:324-29.

34. Rabin p, Enguall E. Perlmann P. Enzyme-Liked inmunoabsorbent assay (ELISA). Inmunochemestry (1971) vol. 8: 874-9.

35. Engvall E, Perlmann P. Enzyme--Liked inmunoabsorbent assay (ELISA) III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. of Immunol, 1972; 109 (1): 129-135.

36. Avrameas S. Guesdon. Brief general review of inmunoenzyme techniques united d'inmunocytochimie, Intitute Pasteur (France), 1-25

37. Wisdom Erlan. Enzyme inmunoassay. Clin Chemestry 1976; 22 (8):1243.

38. Venkateson P, Waqkelin D. ELISASs for parasitologist or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today 1993; 9 (6):228-32.

39. Aníbal Margni R. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5ª. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1997: 798-820, 869-922.

40. Nakamura RM, Voller A. Enzyme inmunoassay heterogeneus and homogeneos systems. inmunochemestry in handbook of experimental inmunology, 1986, Charper 27, Blakwell Scientific Publication.

41. Wright EP, Kager PA, Laarman JJ, Pondman KW, Mohammed EE. ELISA using intact promastigotes for inmunodiagnosis of kala-azar. Transactions of the royal of tropical medicine and hygiene (1985) 79, 344-350.

42. Prieto HS, Amich OS, Salve MM. Laboratorio clínico: principios generales. Madrid: Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1995: 394-412.

43. González de Buitrago JM. Tecnología y métodos del laboratorio clínico. México: Editorial Salvat, 1992: 227-36.

44. Janson JC, Rydén L. Protein purifications. Usa, Editorial VCH publishers, 1990: 349-76.

45. Cannon DL, Winkelmun JW, Henry RJ. Química clínica, Principios y técnicas. 2ª ed. España: Editorial JIMS, 1980, Tomo II: 1200-1202.

46. Zambrano SA. Inmunología. México: Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1995:92.

47. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Inmunología. 2ª ed. Barcelona: Editorial Salvat, 1991: 25.1-25.36.

48. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2ª ed. Madrid: Editorial Interamericana, 1995: 63-69

49. Donal M, Stewart J. Inmunología. 2ª ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1995: 312

50. Towin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76 (9): 4350-54.

51. Burnette NW. "Western Blotting": electrophorethic transdfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection wiht antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem, 1981; 112: 195-203.

52. Towin H, Gordon J. Inmunoblotting and Inmunobinding-Current Status and Outlook. J. of Immunol Methods, 1984; 72: 313-340.

53. Harris VE. Protein purification methods. Oxford University Press, first reprinted, England: 14-18, 1992.

54. Erickson PF, Minier LN, Lasher RS. Lasher RS. Quantitative electrophoretic transfer of polypentides from sds polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoautorediographic detection of antigens. J. of Immunol Methods, 1982; 51: 241-49.

55. María ID, Restrepo M, Mosca W. Inmunoblot análisis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American cutaneous leishmaniasis. J. of Clin. Microbiol. 1997; 35 (12): 3043-3047.

56. Walker JM. Methods in Molecular Biology Inmunochemical Protocols. USA. Editorial Human Press, 1993: 221-33, 268-72.

57. Lehninger AL. Bioquimica, las bases moleculares de la estructura y función celular, 2ª ed. . Barcelona España Ediciones Omega, 1990: 78-82.

58. Voet V, Voet JG. Bioquímica. España. Editorial Omega, 1992:100-106, 182, 273.

59. Stryer L. Bioquímica. 4ª ed. España: editorial Reverté, 1995: tomo 1:60-65.

60. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodweel VW. Bioquímica de Harper. 12ª ed. México: El Manual Moderno, 1988: 12-35, 591-608.

61. Weller BI, Simmons PD, Ivanyi L. Identification of inmunodominant antigens of Candida albican in patients with superficial candidosis. Clin inmunol . Inmunopath. 1990; 54: 347-53.

62. Poliquin L, Shore GC. A method for efficient and selective recovery af membrane glicoproteínas from Concanavalin A-Sepharose using media containing sodium dodecyl sulfate and urea. Anal. Biochem; 1980; 109: 460-465.

63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem 193, 265-275 (1951).

64. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitie of protein utilizaing the principle of protein dye binding. Analitical Biochemestry 72, 248-254 (1976).

65. Marques de Cantú MJ. Probabilidad y estadística: Para ciencias químico-biológicas. Ed. MacGraw-Hill. México 1990: 361-413.