



8  
2j  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA DE ELISA  
PARA EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS**

**T E S I S**

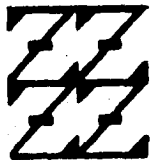
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**RAQUEL CARIÑO CORTES**

**U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A**



**LO HUBIERO EN  
SU BUENAS DEFENSION**

**ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA**

**MEXICO, D. F.,**

**1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **SINODALES**

**Dr. Rubén Marroquin Segura**  
**Dr. Oscar Velasco Castrejón**  
**Q.F.B Ma. de las Mercedes Zamudio Durán**  
**Q.F.B Luz Margarita Chávez Martínez**  
**Q.F.B Yolanda Flores Cabrera**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Rubèn Marroquin Segura.**

**Por su gran valor humano, su experiencia  
compartida y ayuda desinteresada.**

**Al Dr. Oscar Velasco Catrejon**

**M en C. Betariz Rivas**

**M. Martha Mercedes Garcia**

**Por su amabilidad y ayuda incondicional para que se llevarà a buen término el  
presente trabajo.**

**A todos mis profesores y muy especialmente a Yolanda Flores y Javier Parada  
por su motivación y ayuda brindada durante la realización de este trabajo.**

## *AGRADECIMIENTOS*

**A mis padres Fernando y Raquel por su gran motivación y apoyo incondicional.**

**A mis hermanos Carlos y Fernando por estar siempre conmigo.**

**A mi abue Soco por ser tan grande.**

**A mis amigos: Guadalupe A., Lilia, Adriana, Eunice, Liz, Bety, Miguel, Araceli, Armando, Karina, Lucy, Hilda, Patro y muy especialmente a Reyna Flores y Armando Ramirez por su motivación, ayuda y momentos compartidos.**

## GLOSARIO

IL	Interleucina
D.O.	Densidad òptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimàtico ligado a enzima
Fc	Fracciòn cristalizabile
FNR	Receptor de fibrinectina
gp63	Molècula de superficie de <i>Leishmania sp.</i>
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IgG	Inmunoglobulinas de clase G
IgM	Inmunoglobulinas de clase M
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IV	Intravenosa
LC	Leishmaniasis cutànea
LMC	Leishmaniasis mucocutànea
LV	Leishmaniasis visceral
LCD	Leishmaniasis cutànea diseminada
ml	mililitros
Th1	Linfocitos Th1
Th2	Linfocitos Th2

## INDICE

INTRODUCCION

FUNDAMENTACION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

I. MARCO TEORICO

1.1 Definición

1.2 Agente etiológico

1.3 Antecedentes históricos

1.4 Distribución geográfica y epidemiología

1.5 Vector

1.6 Reservorio

1.7 Ciclo de vida

1.8 Formas clínicas

1.9 La respuesta inmunológica en la Leishmaniasis

1.10 Diagnóstico clínico

1.11 Diagnóstico diferencial

1.12 Diagnóstico de laboratorio

1.13 Tratamiento

1.14 Control

2. OBJETIVOS



### **3. MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1 Parásitos**

#### **3.2 Purificación de IgM**

#### **3.3 Preparación de los inmunoabsorbentes**

#### **3.4 Preparación de la Seph 4B-Con A**

#### **3.5 Titulación de anticuerpos por ELISA indirecto**

#### **3.6 Determinación de la propiedad secretora**

#### **3.7 Determinación de títulos de anticuerpos por ELISA competitivo**

#### **3.8 ELISA con antígeno particulado de *Leishmania mexicana mexicana***

#### **3.9 Materiales y equipo**

#### **3.10 Esquema de trabajo**

### **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **4.1 Análisis de Varianza de un Factor**

#### **4.2 Prueba de Student Newman Kuels**

### **5. RESULTADOS**

### **6. DISCUSION DE RESULTADOS**

### **7. CONCLUSIONES**

### **8. PERSPECTIVAS**

### **APENDICES**

- GLOSARIO

- REFERENCIAS

## INTRODUCCION

Las Leishmaniasis son enfermedades cutáneas, mucocutáneas y viscerales causadas por protozoarios intracelulares del género *Leishmania*. Según la OMS son 80 países donde se presentan casos de Leishmaniasis humana, y pocos cuentan con los adelantos tecnológicos y capacitación del personal para manejar la mayoría de los métodos de diagnóstico debido a que es un problema fundamental de países subdesarrollados. Normalmente para llegar a la identificación de *Leishmania* se sigue una secuencia que inicia con el criterio clínico-epidemiológico, bases parasitológicas (comportamiento *in vivo* e *in vitro*); así como la aplicación de métodos serológicos. En México el diagnóstico depende de las manifestaciones clínicas, la aplicación de técnicas inmunológicas como la Intradermorreacción (IDR) con leishmanina, técnicas parasitoscópicas como improntas y biopsias (punch o quirúrgico) y aspirados en medios específicos así como de métodos serológicos en los cuales se determina la respuesta al agente, identificando los anticuerpos antileishmania por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se han realizado pruebas por inmunoensayo enzimático (ELISA); sin embargo la especificidad del ELISA no es del todo satisfactoria pues existe reactividad cruzada entre las isohemaglutininas de grupo sanguíneo y los antígenos de superficie (glicoconjugados) de *Leishmania mexicana mexicana* y probablemente de anticuerpos antiflora microbiana. En este trabajo se pretendió obtener un antígeno libre de reactividad cruzada para eliminar la inespecificidad en el serodiagnóstico de la Leishmaniasis.

## FUNDAMENTACION

El problema de la Leishmaniasis en México no se conoce con exactitud, se estima que puede haber hasta 10 mil casos nuevos cada año, con la aparición de nuevos focos endémicos en Nayarit, Jalisco, Veracruz, Oaxaca y Sinaloa. Es un importante problema de salud pública ya que en el caso de la forma cutánea diseminada conlleva problemas psicológicos y socioeconómicos desfavorables incapacitando a la persona afectada para llevar una vida normal. Se ha reportado que el diagnóstico serológico de la Leishmaniasis por el método de ELISA indirecto presenta problemas de inespecificidad en el suero de sujetos sanos con grupo sanguíneo B y en menor grado con A y O. Marcus expresó la posible interacción entre un antígeno parasitario y el antígeno de grupo sanguíneo del huésped de la siguiente manera: "Si el agente infeccioso posee un antígeno A, el anticuerpo anti-A poseído por personas de grupo sanguíneo B y O podrían contribuir con los mecanismos de defensa del huésped, así individuos de grupo sanguíneo A podrán ser parcialmente tolerantes al parásito y exhibir una respuesta inmune inefectiva; al respecto Balta y col. propusieron que los parásitos de *Leishmania* pueden utilizar un sistema de imitación de los antígenos de grupo sanguíneo del huésped para evadir los mecanismos de defensa del huésped. Además de que los carbohidratos constituyentes del parásito están inmunológicamente relacionados con los antígenos de grupo sanguíneo. Por lo que es importante su estudio.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el diagnóstico de la Leishmaniasis se basa en criterios clínico-epidemiológicos, parasitológicos y en el caso de las formas mucocutáneas, cutáneas diseminadas y viscerales confirmado con técnicas serológicas que utilizan microorganismos intactos: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y aglutinación directa o bien, proteínas provenientes de la ruptura del parásito como el enzimoimmunoensayo (ELISA), fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta, partículas de látex sensibilizadas e inmunoelectrotransferencia (immunoblotting). Sin embargo se ha encontrado falta de especificidad en la técnica de ELISA Indirecto cuando se procesan sueros de pacientes sanos con grupo sanguíneo B y en menor grado con A y O. Dado que los determinantes antigénicos reconocidos por las isohemaglutininas de los grupos sanguíneos son azúcares, se sugiere el estudio del antígeno que presenta reactividad cruzada con el grupo sanguíneo mediante su adsorción por cromatografía de afinidad, ya que es más fácil eliminar el carbohidrato del antígeno de *Leishmania* que adsorber sueros individuales con eritrocitos para eliminar la inespecificidad con las isoaglutininas; así como el corrimiento de los mismos sueros con antígeno extracto total de promastigotes de *Leishmania*.

## I. MARCO TEÓRICO

Sinonimia. Las Leishmaniasis reciben diversos sinónimos dependiendo de la forma de la enfermedad y de la zona geográfica donde ocurren (1,2,3):

Leishmaniasis Cutánea (LC): LC simple o localizada, úlcera de los chicleros, uta, botón de oriente, botón de Aleppo, botón de Briska, forúnculo de Jericó, enfermedad de Borovsky, Pian de la selva de Yucatán.

Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD): Leishmaniasis anérgica hansenoide, forma alérgica lepromatosa leproide, leishmaniasis tegumentaria difusa o diseminada.

Leishmaniasis Mucocutánea (LMC): Espundia, bubas brasileños.

Leishmaniasis Visceral (LV): Kala-azar, fiebre de Dum Dum, fiebre negra esplénica infantil.

1.1 DEFINICION. Las Leishmaniasis son enfermedades causadas por protozoarios del género *Leishmania*, hemoflagelados que atacan a la piel y vísceras del hombre y de diversos animales. Son transmitidas por la picadura de la hembra de un pequeño mosquito piloso de los géneros Phlebotomus (Viejo Mundo) y Lutzomyia (Nuevo Mundo) (4).

Constituye una de las seis enfermedades tropicales más importantes a nivel mundial y la segunda parasitosis de importancia en latinoamérica, las leishmaniasis se presentan de manera endémica, preferentemente en las zonas tropicales y subtropicales de los países subdesarrollados, afectando mundialmente a 12 millones de personas, de las cuales enferman cada año 400 mil y con 350 millones en riesgo

de contraer la enfermedad (1,4,5). Se estima que las epidemias recientes de Leishmaniasis en la India y Sudán cobraron 75 mil muertos tan solo en 1991 (6).

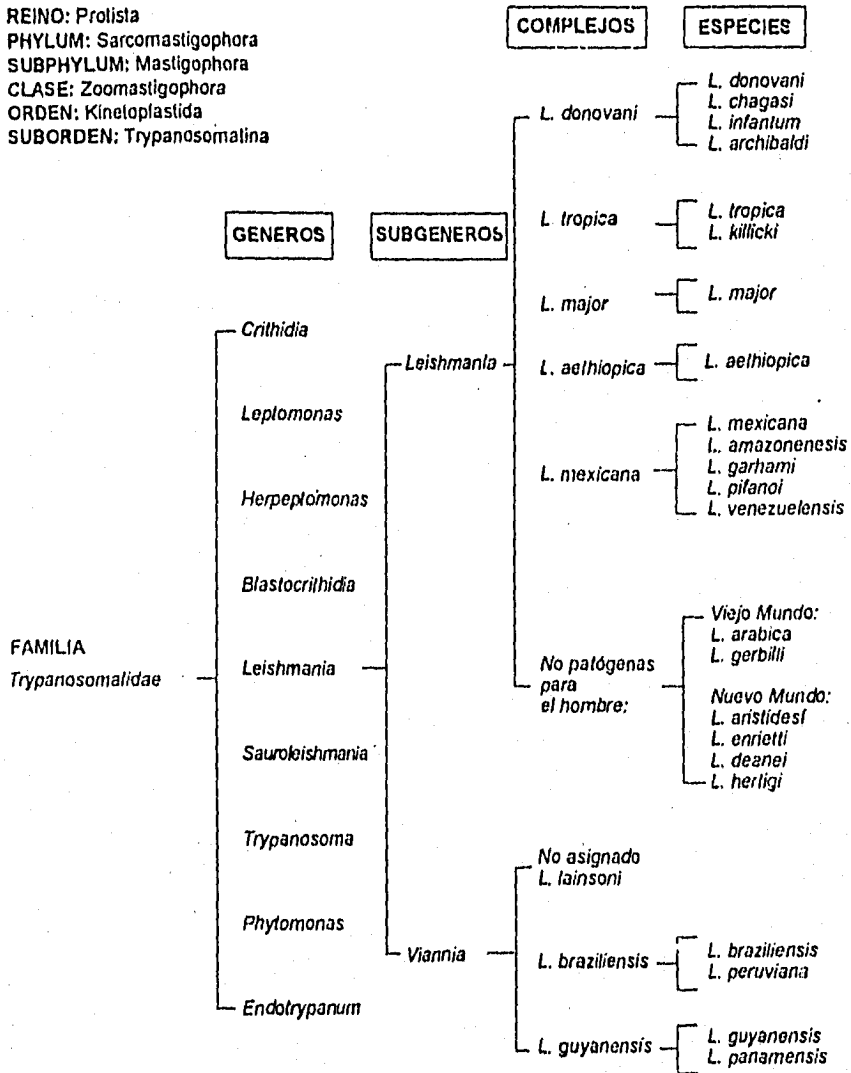
## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Las Leishmanias son protozoarios representativos de la familia *Trypanosomatidae*, lo que implica que su ciclo de vida transcurre en dos formas: Una forma flagelada extracelular o promastigote, que se encuentra en el tubo digestivo del insecto vector o experimentalmente en medios de cultivo acelulares, teniendo en estos casos una forma piriforme de 12 a 20µm de longitud y 1.5 a 3.5µm de ancho, consta de un núcleo central 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. En el hospedero humano se encuentran en células del sistema fagocítico en forma aflagelada, intracelular obligada o amastigote los cuales son de forma redonda u oval, de 2 a 5 µm de diámetro con un gran núcleo excéntrico y un cinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote. Para observarse al microscopio de luz, a pesar de que estos parásitos son visibles con las coloraciones de rutina, ya que su núcleo es relativamente grande y muy basofílico, se ven mejor cuando se emplea Giemsa, Gallego, Wright y Feulgen. Con el Giemsa el núcleo se tiñe rojo brillante y el cinetoplasto morado (2,3,4,7,8).

El metabolismo de *Leishmania* se caracteriza por utilizar carbohidratos sobre todo dextrosa, por presentar fermentaciones aeróbicas, con la excreción de productos finales parcialmente oxidados: su respiración probablemente es catalizada por metales pesados, pero no se sabe si poseen un sistema funcional completo tipo citocromo (9).

Originalmente las clasificaciones se basaron en criterios de distribución geográfica, enfermedad producida en el hombre, diferencias en reservorios, virulencia en roedores, termosensibilidad y diferencias en el vector. En la actualidad los métodos más extendidos utilizados para la identificación de las especies se basan en métodos bioquímicos principalmente en el patrón de isoenzimas. Sin embargo, debido a sus limitaciones se han desarrollado técnicas basadas en la utilización de la biología molecular que a través de la caracterización de las secuencias del ADN del parásito permiten la diferenciación de especies. Sin embargo estas metodologías se hallan restringidas aun a laboratorios seleccionados (4,7). La clasificación taxonómica del género *Leishmania* fué modificada por la OMS en 1990, de acuerdo a la posición del parásito en el tubo digestivo del vector, dividiendo al género *Leishmania* en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*. El primero se desarrolla en la parte anterior al píloro (desarrollo suprapilórico), en el punto de unión del intestino medio y posterior. *Viannia* por su parte lo hace, tanto en el intestino medio como el posterior (4,10,11) (Cuadro 1.2.1).

Cuadro 1.2.1 Taxonomía del género *Leishmania*





### 1.3 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 Cunningham 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 redescubrió en el mismo padecimiento y Wright crea el género *Leishmania* en honor a Leishman.

La historia de la existencia de la leishmaniasis en América data desde 1788, cuando Hipólito Ruiz 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 fué Seidelin en 1912 quién le llamó "úlceras 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 (4).

En 1953, Biagi en Escarcega, Campeche, observó que la úlcera de los chicleros se comportaba en forma más parecida a la leishmaniasis cutánea 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

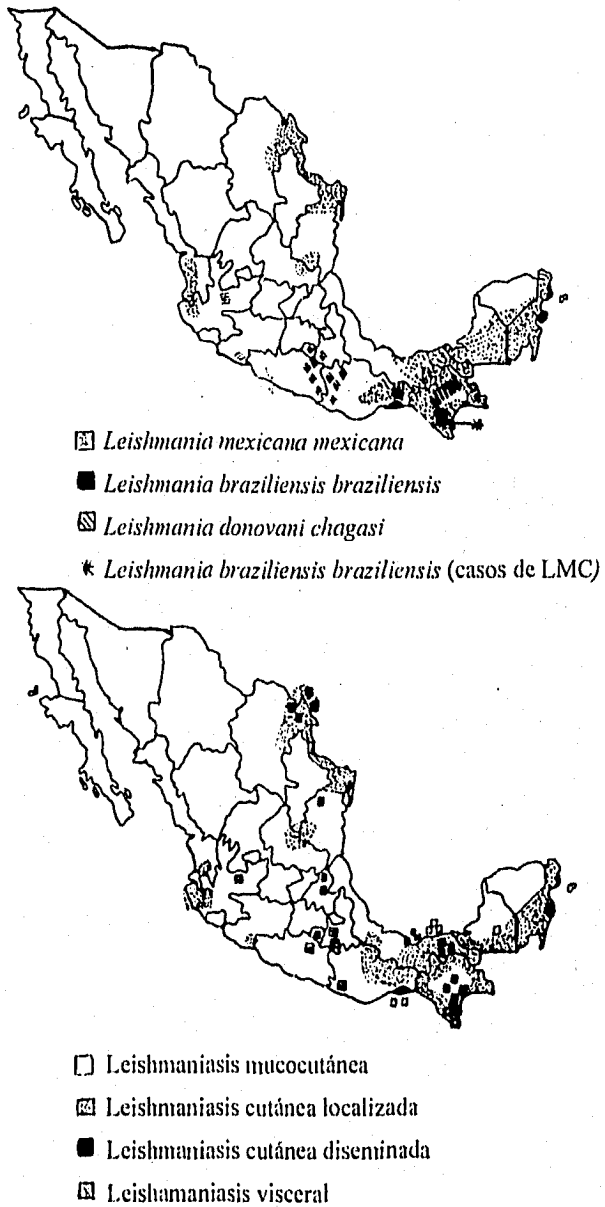
de aquella, la llamó *L. tropica mexicana*. Este criterio fué avalado por Grarnham y Adler quienes la convirtieron en una nueva especie: *Leishmania mexicana*.

#### 1.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA Y EPIDEMIOLOGIA

Actualmente se sabe que las zonas de endemia afectan por lo menos 17 estados En primer lugar por su frecuencia y extensión están los estados del sureste, que comprenden desde el sur de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y SO de Yucatán. Otra zona corresponde a la llanura del Golfo y faja que se inicia en la costa tamaulipeca y penetra hasta Coahuila y Nuevo León, abarcando una porción al Sur de Texas. Así mismo, se han detectado casos en los estados Mediterráneos como S.L.P., Morelos, Puebla e Hidalgo (Huasteca). Por el pacífico se encuentran los estados de Nayarit, Michoacán, Jalisco y recientemente también en Sinaloa (Fig. 1.4.1).

Generalmente la ecología en las áreas endémicas de esta parasitosis son las zonas selváticas, donde prevalece la selva tropical, siempre verde o perinnifolia y también en la pseudoperennifolia, los cuales se desarrollan a altitudes de 0 a 1000m. y en algunas zonas hasta 1500m., s:n.m., con temperatura media anual generalmente no inferior a 20 °C, con precipitación pluvial que oscila entre 1500 a 3000 mm de Hg. Por esto en algunas áreas en las que aún no se han detectado casos de la enfermedad, son sospechosos por reunir las condiciones ecológicas similares a las áreas de endemia conocidas. Sin embargo, el área endémica del Norte, la ecología es muy diferente y corresponde a zonas semidesérticas (12).

Fig. 1.4.1 Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* y de las leishmaniasis en México.



La época del año en que ocurre mayor incidencia de la enfermedad es el periodo de lluvias debido probablemente al aumento considerable de densidad de población del insecto transmisor. La ocupación que se considera más relacionada con la enfermedad es la agricultura, aunque también se observa en personas que se dedican a la caza, explotación de maderas preciosas, en los que laboran en la construcción de vías de comunicación, en profesionistas que se encuentran en zonas de endemia, por actividades de explotación y agrimensura, es común en arqueólogos que trabajan en la zona maya (2,13).

El sexo masculino es el más afectado, aunque ambos sexos sean igualmente susceptibles a padecer la enfermedad, la mayor incidencia en hombres se debe a la mayor exposición por razones ocupacionales.

#### 1.5 VECTOR.

Los vectores invertebrados son pequeños dípteros pilosos de la subfamilia Phlebotominae, con 600 especies y subespecies, con 70 transmisores de leishmaniasis, de los cuales, 38 están distribuidos por todo el territorio mexicano y el único transmisor comprobado es Lutzomyia (Nyssomyia) olmeca, se supone que Lu. diabólica transmite la leishmaniasis cutánea localizada y difusa en el norte de México y Lu. cruciata la úlcera de los chicleiros en Oaxaca y Nayarit (4).

Estos artrópodos se distribuyen por todo el país, pero son importantes sólo en la áreas de endemia de leishmaniasis. Lutzomyia se conoce vulgarmente como "papalotilla", del Náhuatl -papalotl-, que significa mariposa; recibe este nombre porque sus alas siempre descansan erectas como las de las mariposas, mide de 3 a 4 mm de longitud, el adulto es encorvado, de color atezado, con ojos negros conspicuos, cuerpo y alas pilosos. Sólo la hembra es hematófaga, aunque al igual que el macho también se puede alimentar de los azúcares de las plantas. Su hábitat

es la selva, descansando en madrigeras de roedores y en hendiduras de corteza de árboles. De 30 a 36 hrs. después de alimentarse, la hembra deposita de 30 a 50 huevos en agujeros oscuros y húmedos cercanos a desechos nitrogenados, los cuales después de 6 a 12 días, se transforman en larvas y de 20 a 30 días después en pupas para convertirse en adultos de los 6 a 14 días posteriores, los cuales viven de 2 a 3 semanas, aunque pueden vivir hasta 2 meses, teniendo un ciclo vital completo de 53 a 100 días, dependiendo de las características de humedad, temperatura y alimentación. El horario de actividad es crepuscular y nocturno, aunque ocasionalmente se le pueda ver por el día. Su vuelo generalmente es en tramos cortos de unos cuantos metros o a saltos y a un metro a dos de la superficie, aunque, se ha descrito que pueden viajar hasta 1.5 a 2 km (14).

#### 1.6 RESERVORIO

En la naturaleza se preserva la enfermedad en reservorios mamíferos domésticos y silvestres. En México, Velasco y Col., han comprobado que los reservorios son Canis familiaris (perro doméstico) en Oaxaca y Nassua narica (Tejón) en Chiapas.(4). La infección en los reservorios se caracteriza por presentar con mayor frecuencia en la parte dorsal de la cola y en su parte media, en las orejas o en las patas, pequeñas ulceraciones cubiertas por costras serosas.

Cabe señalar la probabilidad de que la leishmaniasis se incremente importantemente puesto que los enfermos mismos de leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) pueden funcionar como reservorios ya que conviven íntimamente con los reservorios (Velasco CO. Leishmaniasis Cutánea Difusa en México. Presentado en: Reunión de la Sociedad Mexicana de Parasitología, Abril 1995, México D.F.).

## 1.7 CICLO DE VIDA

La hembra de *Lutzomyia* es hematófaga e ingiere el parásito en forma de amastigotes, en el intestino medio se transforman en promastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria de modo que al cabo de 4 o 5 días se le encuentra en el intestino anterior y la proboscide como formas metacíclicas, que son el punto final del ciclo de vida en el insecto (7,10), pudiendo ser inoculados al picar a un vertebrado susceptible. En el mamífero, las leishmanias se transforman y multiplican como amastigotes en el interior de las células del sistema fagocítico mononuclear. Su distribución en la superficie del cuerpo o en las vísceras, dependerá de la especie de *Leishmania*, el tamaño del inoculo y posiblemente incluso factores existentes en la saliva del vector (como el maxadilán), capaz de potenciar virulencia y facilitar la difusión del parásito al inhibir la actividad de los macrófagos (15,16); así como de su virulencia y de las diferencias inmunitarias y genéticas del huésped (1,2,17). El ciclo se completará cuando otro flebotomo pique al individuo infectado (Fig. 1.7.1).

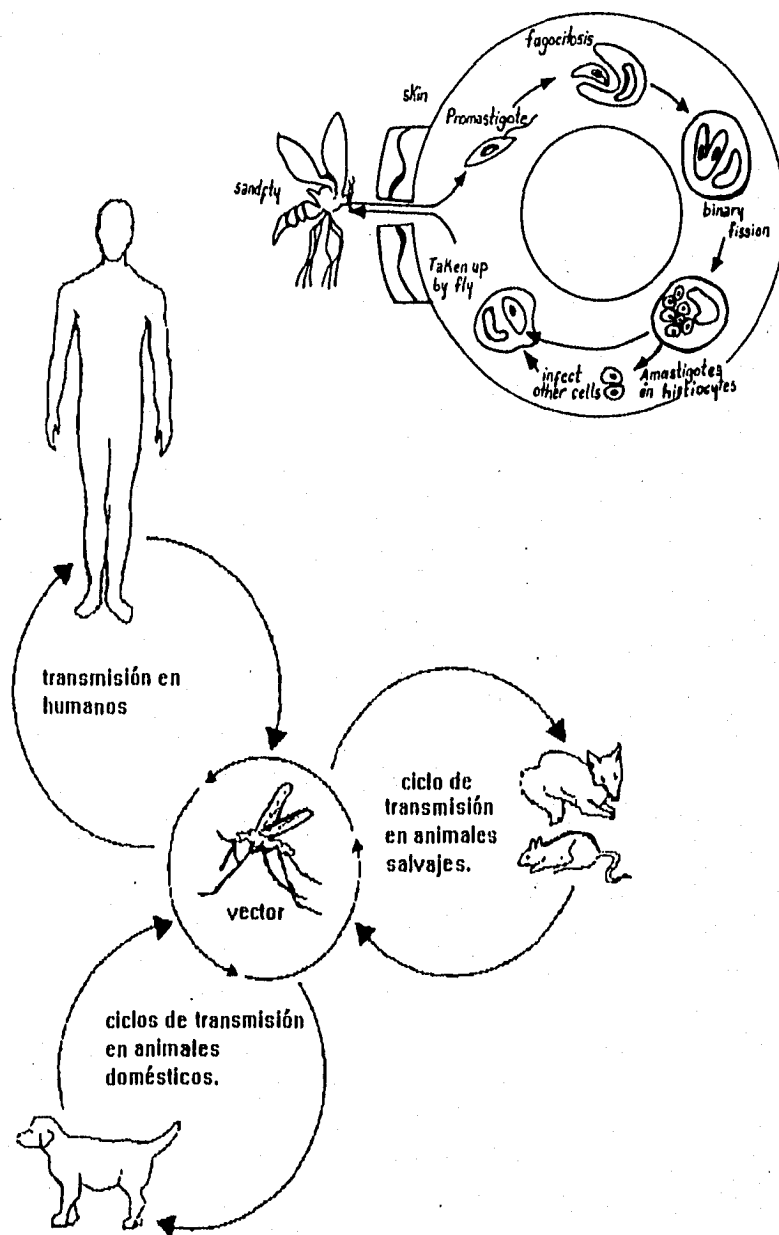


Fig. 1.7.1 Las moscas *Phlebotomus* sirven como vectores para las distintas especies de *Leishmania*, transmitiendo promastigotes en el momento de picar al huésped vertebrado. La invasión de las células tisulares locales, con la conversión del parásito en amastigotes, produce lesiones cutáneas de diversos tipos y grados. Las moscas *Phlebotomus* ingieren amastigotes al alimentarse, éstos se multiplican y transforman en promastigotes, que luego son transmitidos.

## 1.8 FORMAS CLINICAS.

Las manifestaciones clínicas dependen principalmente de las especies de parásito y de la constitución genética del huésped para desarrollar una respuesta inmune celular efectiva (18). En este sentido la infección en el hombre puede ser inaparente o subclínica, o bien presentar manifestaciones que varían desde úlceras cutáneas a compromiso extenso de piel y mucosas o presentar enfermedad sistémica, con afectación generalizada del sistema fagocítico mononuclear (8).

En México, el principal agente causal es la subespecie *Leishmania mexicana mexicana* que aunque no siempre genotípicamente idéntico, ocasiona tres formas clínicas diferentes: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros, ésta es la forma más frecuente y se caracteriza por un nódulo, pruriginoso que puede evolucionar hacia la ulceración o una placa infiltrada inclusive vegetante que puede durar meses o años en sanar excepto cuando se localiza en orejas, donde frecuentemente es crónica y mutilante (4). La leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) o leishmaniasis leproide, es incurable, deformante e incapacitante, se inicia por un nódulo no ulcerado en el sitio de la picadura del insecto que se disemina por vía linfática, tisular y hemática formando múltiples nódulos causando una afección generalizada grave que simulan una esporotricosis linfangítica o a graves lesiones en placas. Una característica importante es la anergia a leishmanina, PPD y candidina en el paciente con remisiones espontáneas en las épocas calurosas del año. La leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia, que se caracteriza por lesiones muy destructivas de mucosas nasales y orofaríngeas, que pueden entorpecer la fonación y la deglución e incluso causar inanición, debido al intenso dolor. No cura espontáneamente y resisten a la quimioterapia específica (19,20).

Las secuelas de la enfermedad están constituidas por lesiones cicatrizales como placas atróficas, deprimidas, en ocasiones discrónicas y con telangiectasia (dilatación de vasos capilares de pequeño calibre). En orejas se observan



mutilaciones que aparecen como muescas en el hélix y en mutilaciones mayores solo se observa la concha, lóbulo y parte del hélix. La afección ganglionar regional afecta aproximadamente al 2% de los pacientes que cursan con el padecimiento (13).

### 1.9 LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad que presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales regularmente inducen a la expresión de un tipo de inmunidad característica, que dependen de la capacidad de respuesta del huésped contra el parásito (Fig. 1.9.1).

Las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis dependen de una variedad de mecanismos inmunológicos que a su vez están condicionados por las características genéticas de cada individuo y por las diferentes especies de *Leishmania* que lo afecten (4,8,22).

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. Al entrar en contacto el parásito con el macrófago, éste se une a varios receptores sobre los macrófagos, incluyendo los receptores del complemento (CR1 y CR3), receptores de manosa-fucosa (MFR), receptor de fibronectina (FNR), receptor de manosa N-acetilglucosamina y el receptor de la fracción Fc de los anticuerpos entre otras; los cuales se unen directa o indirectamente a moléculas de superficie de *Leishmania*, las más importantes son la gp63 y la lipofosfoglicana (LPG) (4,21,23,24,25).

Dentro del fagolisosoma, *Leishmania* tienen que enfrentar mecanismos microbicidas dependientes e independientes del oxígeno. Los productos secretados por macrófagos son dos grupos de compuestos inorgánicos altamente reactivos, el primero incluye iones superóxido, peróxido de hidrógeno, y en algunas poblaciones

de fagocitos mononucleares, los productos de la mieloperoxidasa, y el segundo grupo incluye nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y los óxidos reactivos relacionados tales como óxido nítrico y dióxido de nitrógeno. Investigaciones recientes han demostrado que hay una gran correlación entre la actividad leishmanicida de macrófagos murinos y la producción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) derivados del metabolismo de la L-arginina (26). El óxido nítrico es sintetizado a partir de un átomo de nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina y un precursor de nitritos puede eliminar la ruta enzimática dependiente de hierro vital para la supervivencia de amastigotes dentro de macrófagos (27). 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 promastigotes a amastigotes (metacicloogénesis). *Leishmania* entra, sobrevive y se multiplica dentro de fagocitos mononucleares (4,23,26).

Las 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 de la respuesta inmune humoral, mediada por linfocitos B (19,20,22,28).

La respuesta inmune celular es la principal responsable del control o eliminación de la infección. Dentro de los linfocitos T existen poblaciones heterogéneas con fenotipo diferente expresado en la superficie como marcadores moleculares, dentro de estos tenemos las poblaciones  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ . Dentro de las  $\text{CD4}^+$  existen dos subpoblaciones: Th1 y Th2, las cuales se diferencian en su patrón de secreción de citocinas y el balance de estas determina el curso de la infección. Se sabe que las líneas celulares que transfieren protección pertenecen a la subclase Th1, en tanto que las que exacerbaban la enfermedad son Th2. Además, los ratones susceptible BALB/c responden a la infección con *Leishmania* preferentemente con linfocitos Th 2, lo cual deriva en la progresión de la enfermedad. En tanto que los ratones

resistentes C57B1/6 o C3H/HeN presentan inmunidad protectora mediada por linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1. La resolución de infecciones por leishmania requiere de la expansión de células Th1 que secreta o expresa sobre su membrana linfocinas capaces de activar macrófagos (IFN $\gamma$ , TNF e IL-2). Mientras que la producción de IL-4 e IL-3 no solo por los linfocitos Th2, sino también por células cebadas, exacerbaban las lesiones ya que dichas linfocinas pueden inhibir en forma indirecta la activación de macrófagos que se logra con el IFN- $\gamma$  producido por Th1 desviando la respuesta hacia la producción de anticuerpos, los cuales no son protectores. La IL-4, IL-5 e IL-6 juegan un papel muy importante en la producción de anticuerpos (Fig. 1.9.1). Los macrófagos, por su parte, al ser activados por citocinas como el IFN $\gamma$  o el Factor Estimulador de Colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) secretado por células Th1 y Th2 en diferentes proporciones, adquieren in vitro habilidad citotóxica contra *Leishmania*. Aún más la resistencia a la diseminación del parásito parece estar controlada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La IL-12 secretada por células mononucleares, neutrófilas, células B y células dendríticas, suprime a las células Th2 y promueve la respuesta de Th1, en una forma dependiente de IFN $\gamma$  (29-34).

El macrófago es la célula central de la respuesta inmune y llena una triple función en la leishmaniasis: es la célula huésped para el parásito, es la célula presentadora de antígeno inductora de la respuesta inmune y además es la célula efectora que finalmente debe eliminar el parásito (35,36).

Se demostró que las células Th1 y Th2 difieren en su modo de auxiliar a las células B para la síntesis de anticuerpos. El incremento de anticuerpos está asociado con infecciones crónicas, mientras que su disminución con la curación de la enfermedad, el suero no transfiere protección (22,28).

En la LCL, la hipersensibilidad tardía se desarrolla en forma temprana. Las características van desde la ulceración de la lesión, la imagen histopatológica

constituida por una reacción granulomatosa organizada, una baja producción de anticuerpos, la positividad de la prueba cutánea con leishmanina, la capacidad de los linfocitos del huésped para responder in vitro a ese antígeno con la producción de IFN $\gamma$ , TNF, e IL-2 y con mucha frecuencia la cura espontánea (4,25,37).

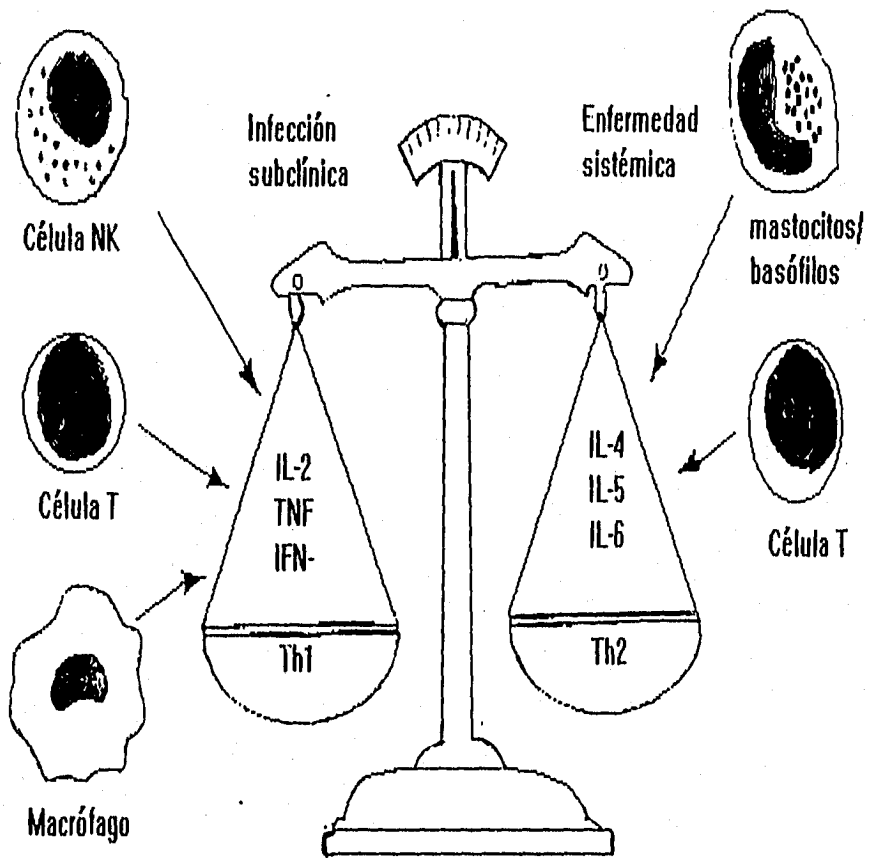
La LCD se caracteriza inmunológicamente por la ausencia de respuesta tardía al antígeno de *Leishmania* y la presencia de títulos altos de anticuerpos específicos circulantes. La inmunosupresión no es específica ya que se ha demostrado que los pacientes no reaccionan normalmente a antígenos no relacionados como son la lepromina y tuberculina (son anérgicos) (4). La imagen histopatológica está constituida por una reacción granulomatosa desorganizada, no es autocurable y se desarrolla una enfermedad difusa e incurable que se caracteriza por la aparición de lesiones que se diseminan ampliamente en forma de nódulos o placas. Estos pacientes presentan una disminución en la producción de linfocinas como IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . El granuloma de estos pacientes muestra predominantemente una respuesta mediada por Th2, es decir, la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 es elevada (4,38).

En un estudio hecho en la República Dominicana, se informó que los individuos con LCD no responden a la leishmanina, pero sí al PPD y a la candidina. También se observó que la proliferación de células T se logra restaurar cuando las células linfocíticas se pasan a través de una columna de lana, con la cual se eliminan las células adherentes o cuando se agrega indometasina. Por estos hallazgos se propuso que existe una población de células supresoras adherentes que son responsables de la anergia específica en la LCD (39).

En la LMC parece haber ciertos trastornos en los mecanismos de protección en individuos aparentemente inmunocompetentes, pues los pacientes responden bien a la intradermoreacción, desarrollan una buena respuesta celular, pero también se encuentran elevados niveles de anticuerpos circulantes en relación a los pacientes

con LCL (38); y se ha demostrado la presencia de complejos inmunes además de anticuerpos específicos anti-IgG, particularmente en casos que exhiben múltiples lesiones en las mucosas. Es posible que estos complejos inmunes determinen la severidad de la infección, debido a que se encuentra activada la vía del complemento y éste producir necrosis del tejido donde se depositan los complejos inmunes. No hay regresión espontánea y la enfermedad es incurable. El granuloma de éstos pacientes muestra una mezcla de citoquinas producidas por células Th2 y Th1, caracterizada por la abundancia de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10.

En la LV existe supresión de la inmunidad celular hacia el antígeno homólogo en la fase crónica, los niveles de anticuerpos específicos de las clases IgG e IgM están muy elevados (a diferencia de los bajos títulos existentes en la LCL), existen complejos antígeno-anticuerpo circulantes que involucran inmunoglobulinas de las clases IgG, IgM e IgA, estos complejos producen la activación del complemento y daño tisular (4).



1.9.1 Los linfocitos Th-1 secretan preferentemente IL-2 e IFN- $\gamma$ , las cuales estimulan la inmunidad mediada por células; en tanto que los linfocitos Th-2, producen IL-4,IL-5 e IL-6, linfocinas capaces de estimular la producción de anticuerpos.

#### 1.10 DIAGNOSTICO CLINICO DE LAS LEISHMANIASIS TEGUMENTARIAS

El diagnóstico clínico de la LCL consiste en la observación de una lesión ulcerosa, indolora, redondeada, de bordes indurados y fondo limpio, en la piel del cuerpo. Cuando afecta las orejas, las lesiones son inicialmente nodulares y después se ulceran, dando lesiones destructivas, muy crónicas; a veces se convierten en vegetantes. Anteriormente en zonas endémicas eran más frecuentes las lesiones persistentes en orejas y es posible observar en la actualidad algunas con más de 40 años de evolución. Además de las lesiones ulcerosas en la piel que son con mucho las más frecuentes, se observan otras de tipo infiltrativo nodular (placa infiltrada), placa atrófica e incluso lesiones vegetantes, acneiformes y herpetiformes, que se pueden confundir con tumoraciones u otras etiologías.

Con respecto a la LCD se inicia en una lesión nodular que evoluciona lentamente para 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 únicamente dos casos con afectación en genitales.

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 y la muerte sobreviene habitualmente como resultado de la desnutrición debida a la inanición y/o neumonía (4,8).

---

**FALTA PAGINA**

**No.** 23



cada uno a su antígeno correspondiente. Sin embargo, hay que tener presente que en el mismo paciente pueden ocurrir los dos padecimientos.

Otros padecimientos a tener en cuenta para hacer el diagnóstico diferencial son: xantomas tuberosos, queloides, lobomicosis, linfomas y sarcomas de células reticulares, aunque sólo clínicamente se pueda confundir con éstos.

Cuadro 1.11.1 Diagnóstico diferencial de las leishmaniasis

<b>Kala-azar:</b>	
<b>Agudo inicial:</b>	paludismo fiebre tifoidea atípica enfermedad de chagas
<b>Crónico:</b>	tuberculosis brucelosis mononucleosis infecciosa leucemia y otros padecimientos hematológicos
<b>Infantil:</b>	
<b>Formas cutáneas:</b>	enfermedad de Banti lepra cáncer esporotricosis sífilis pián tuberculosis paraococcidioidomicosis enfermedad de Jorge Lobo

## 1.12 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico de leishmaniasis se plantea de diversas formas (1,16.40,41,42):

A) 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 mucha precaución al obtener el material, ya que la toma superficial con frecuencia es negativa, debido a la alta frecuencia de infección secundaria de las úlceras, con la consecuente destrucción de macrófagos. El éxito depende principalmente del tiempo transcurrido entre el inicio de la lesión y la toma del material; en los primeros meses la positividad se acerca al 100%, disminuyendo a cifras inferiores al 25% en lesiones crónicas con excepción de la LCD; razón por la cual se requiere además de la intradermorreacción (IDR), el diagnóstico inmunológico.

B) Cultivo de microbiopsias a partir de lesiones cutáneas en medios específicos como NNN, Schneider, Diamond, Nakamura, etc. Son fáciles, pero su aislamiento por cultivo durante el trabajo de campo es muy difícil, porque son susceptibles a la contaminación. En este caso el cultivo no deberá considerarse negativo antes de los seis meses, teniendo el 50% de positivas.

C) Los parásitos pueden aislarse también por inoculación en Hámster, inyectando el material de biopsia o microbiopsia en el cojinete plantar; el resultado 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*, pero no es de ayuda práctica.

D) Cultivo de sangre, biopsia hepática, esplénica o de médula ósea en el caso de leishmaniasis visceral.

E) Reacción de Polimerización en Cadena (PCR). Para diagnosticar LV sintomática (LV o 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. Reduce la necesidad de pruebas invasivas, aunque habría que evaluar su factibilidad en zonas endémicas.

La cuantificación del perfil de respuesta inmune celular y de anticuerpos de la variedad IgM, IgG o ambas se ha determinado por pruebas como:

1. Prueba cutánea de hipersensibilidad tardía o reacción de Montenegro con el uso de leishmanina.

La cual se utiliza como base de 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 a mes y medio a dos meses o que la hayan padecido. Consiste en la aplicación de 0.1cc de una suspensión de  $3 \times 10^6$  promastigotes de *Leishmania*/cc (destruidos por la acción fenol al 0.5% o por calor a 60°C, o bien por congelación-descongelación, ultrasonido y ultravibrador), a partir de un cultivo de RMPI o MEM suplementado con suero fetal de ternera y hemoglobina al 10%, preferentemente con una jeringa tipo tuberculina y aguja No. 26, por vía I.D precisa, lo cual origina un levantamiento de piel de "naranja", se lee el resultado a las 48 hrs. y se interpreta de la siguiente manera: Induración menor a 5mm de diámetro, corresponde a una reacción negativa y una induración mayor a 5mm 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. Es positiva en el 99% de los casos de Leishmaniasis cutánea localizada (LCL). En zonas endémicas no discrimina adecuadamente infección de enfermedad.

2. Aglutinación Directa. Se basa en la capacidad de interacción del suero con los promastigotes de *Leishmania*, es económica, fácil de realizar pero no es tan sensible.

3. Hemaglutinación Indirecta. En la cual se utilizan soportes particulados para hacer reaccionar los anticuerpos séricos con el antígeno adherido previamente. Es útil para las formas viscerales.

4. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. Es una técnica histoquímica para la detección y localización de antígenos en cortes de tejido o 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 confirmativa.

5. Inmunoelectrotransferencia (Western blot). Permite identificar y caracterizar bioquímicamente antígenos anteriormente desconocidos, presentes en una mezcla compleja, las cuales se resuelven en geles de separación analítica y luego las moléculas se transfieren a membranas (secantes) para la identificación de los agentes individuales mediante antisueros específicos. Con el empleo de geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), de enfoque isoeléctrico o de "mapeo" peptídico, en la separación inicial es posible obtener datos sobre el tamaño, el punto isoeléctrico y las relaciones moleculares de los antígenos investigados. Es específica ya que salva los obstáculos de las frecuentes reacciones serológicas cruzadas de la leishmania con otros parásitos, principalmente *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Mycobacterium leprae* (43). Pero en algunos casos el antígeno se desnaturaliza tanto por el gel separador y los procesos de aislamiento, que algunos de sus epitopos son destruidos de forma que ya no pueden unirse a ciertos anticuerpos.

6. Prueba de ELISA (Linked Immunosorbent Assay). Con resultados satisfactorios, pero varían según la forma de leishmaniasis presente. Es más sensible que IFI y apropiada para estudios a gran escala así como fácil de realizar.

### 1.13 TRATAMIENTO

Los antimoniales son los medicamentos de elección en todas las formas clínicas de leishmaniasis. Los más utilizados son los antimoniales pentavalentes como son la metil glucamina-antimoniato (Glucantime) y el gluconato de antimonio y sodio (Pentostam) aunque hasta la fecha no esté bien establecido su mecanismo de acción. Ambos medicamentos se utilizan por vía parenteral con dosis de 20 mg de antimonio por kilogramo de peso por día durante 20 días (dosis recomendadas por la Organización Mundial de la Salud). El uso de glucantime en forma intralesional ha dado mejores resultados lo cual disminuye la dosis administrada y los efectos tóxicos que estos pudieran ocasionar. También la anfotericina B, el nifurtimox, la rifampicina, el ketoconazol y el alopurinol, muestran cierta efectividad. La paramomicina contenida en liposomas inyectados por vía intravenosa, al igual que los antimoniales ha dado buenos resultados. De éstos últimos, se dice que en esta presentación son 700 veces más activos que cuando se usan en forma libre. La pentamidina y la anfotericina B es otro medicamento útil particularmente en la terapia de Kala-azar resistente a antimoniales a dosis de 2-4 mg por kg de peso por día, vía IM por 10-15 días. En las LC la aplicación una sola vez de este medicamento, a la dosis total de 360-480 mg en infusión venosa basta para producir la curación. El calor local puede utilizarse como coadyuvante de la quimioterapia en la LCD. La inmunoterapia con factor de transferencia (FT) preparado a partir de linfocitos de sujetos positivos a la intradermoreacción de Montenegro también ha demostrado beneficios. También se han obtenido buenos resultados tratando pacientes con una "vacuna" de leishmanias muertas y BCG vivos aplicada cada 7 a

15 días por 3 a 5 veces. Otra terapia es la regulada y localizada con ondas de radio o termoterapia, de una frecuencia de 6.7 mHz que alcanzan una temperatura de 50 a 52°C con gran éxito (en publicación).

#### 1.14 CONTROL

El control epidemiológico de la leishmaniasis depende de la eliminación de los vectores y reservorios así como de la detección y tratamiento de enfermos. Sin embargo, existen razones de orden técnico y social, que dificultan el adoptar medidas efectivas que rompan la cadena de transmisión en estos aspectos (45). En el medio oriente, los programas de vacunación contra la leishmaniasis, han consistido en la inoculación de cepas atenuadas de leishmania en lugares del cuerpo no visibles, para evitar que la infección natural deje cicatrices desfigurantes, sobre todo en la cara. Esta clase de inmunización, llamada leishmanización, es una infección controlada, que sin embargo, puede ser tan severa como la infección natural en algunos individuos (46). Aunque se han logrado avances importantes en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis, todavía no hay un inmunógeno cuya aceptación sea general (47). Las vacunas de parásitos muertos se tienen que administrar por vía intramuscular y han dado resultados muy variables (48) ( cuadro 1.14.1).

Cuadro 1.14.1 Productos inmunogénicos probados en la Leishmaniasis

PROBADO EN:			
PRODUCTO VACUNAL	HUMANO	ANIMAL	PROTECCION
Promastigotes atenuados	+ En Medio Oriente	Ratón	Parcial
Promastigotes no virulentos	-	Ratón	Parcial
Macrófagos infectados muertos	-	Ratón	Parcial
Glicoproteína gp63	-	Ratón (resistente) Ratón (susceptible)	>95% Parcial
Lipofosfoglicano (LPG)	-	Ratón (resistente) Ratón (susceptible)	100% Parcial
Proteína p14	-	Ratón	?
Glicolípidos (GIPLs) 3 y 5	-	Ratón	?

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES

Obtener un antígeno específico para *Leishmania sp.* que no de reactividad cruzada con isoaglutininas del sistema de grupos sanguíneos ABO.

### OBJETIVOS PARTICULARES

Eliminar glicoproteínas de *Leishmania mexicana mexicana*, antígenos de reacción cruzada para grupo sanguíneo usando una cromatografía de afinidad con Sepharosa-Concanavalina A (Con A) y un inmunoabsorbente de Sepharosa 4B-isoaglutinina anti A y anti B.

Montar un método útil de ELISA con antígeno particulado que determine anticuerpos contra *Leishmania mexicana mexicana*



### 3. MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1 PARASITOS

Las cepas de *Leishmania mexicana mexicana* fueron proporcionadas por el Dr. Oscar Velasco y la M.en C. Beatriz Rivas del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E). Fueron aisladas de las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada y mantenidas en cultivo en medio NNN.

#### PROCEDIMIENTO.

Se realizó un pase al medio RPMI (sigma), suplementado con hemoglobina al 10% y se mantuvieron a temperatura de 22 °C, hasta su crecimiento a fase estacionaria, aproximadamente 7 días.

##### 3.1.1. OBTENCION DEL ANTIGENO SOLUBLE

El cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 20 min., se tiró el sobrenadante. El botón obtenido se lavó dos veces con PBS a 6000 r.p.m. durante 20 min., se decantó el sobrenadante, se llevó a 10 ml con PBS. Se realizó 10 veces la congelación del antígeno en una mezcla de hielo seco-etanol y descongelación en baño maría a 37 °C. Lo obtenido se centrifugó a 10,000 r.p.m., dur. 1 hr., el sobrenadante se colectó en una botella estéril. El antígeno se estabilizó con formalina al 0.1% y tinerozal al 0.01%

### 3.1.2. OBTENCION DEL ANTIGENO PARTICULADO

El cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m. dur., 20 min., se desechó el sobrenadante. El botón obtenido se lavó dos veces con PBS a 6000 r.p.m. dur. 20 min., se desechó el sobrenadante y se llevó a 10 ml. con PBS con formalina al 0.1% y timerozal al 0.01%.

### 3.2. PRECIPITACION DE IgM

Los anticuerpos anti-A y anti-B son generalmente de tipo IgM, conocidos también como naturales o aglutinantes, los cuales se desarrollan regularmente después de que el individuo ha sido expuesto a la inmunización ambiental; por lo que se llevó a cabo su purificación a partir de plasma fresco congelado, por precipitación en agua boricada (ácido bórico al 0.7% en agua destilada) en una proporción de 1:10 a 4 °C dur. 24 hs., se separó el sobrenadante y el precipitado se centrifugó a 6000 r.p.m dur. 30 min. Se disolvió el precipitado en 3 ml de PBS, pH 7.4 a 37 °C y se centrifugó la solución a 3000 r.p.m, 10 min.

#### 3.2.1 PURIFICACION DE IgM

La cromatografía en columna emplea el principio de intercambio de iones en tamices moleculares. Las sustancias empleadas en la separación de proteínas son polímeros de gel de dextrán (Sephadex), gel de poliacrilamida y derivados de celulosa; el primero de los dos polímeros permite que penetren macromoléculas a los gránulos de la sustancia; de este modo se aumenta la capacidad de la misma; el grado de penetración de las macromoléculas dentro de los gránulos del gel depende del peso molecular de la sustancia. Las matrices de gel son muy hidrofílicas y el mayor volumen de la columna está sujeta a contracción y expansión dependiendo de la fuerza iónica y del pH del buffer adicionado. El Dextran (Sephadex) tiene un rango de tamaño del poro adecuado a la separación de moléculas con pesos

moleculares de varios cientos, arriba de 200,000. Las moléculas con peso elevado, no penetran al poro y aparecen en el volumen vacío, las moléculas más pequeñas, que el poro penetran al gel dependiendo de su tamaño y forma y aparecen más tarde en la muestra procesada. Sephadex G-200 excluye proteínas por arriba de PM 800,000 y es útil para el aislamiento de IgM.

### PROCEDIMIENTO

Se calentaron 17 g (peso seco) de Sephadex G200-40 en aproximadamente 750 ml de PBS, en un baño de agua hirviendo durante 5 hs. Esto proporcionó un abastecimiento de gel suficiente para una columna de 100 por 2.5 cm. Se enfrió el gel a temperatura ambiente y se desgasificó al vacío ya que las burbujas de aire en el gel deforman las bandas de proteína durante el corrimiento. Se vació el gel dentro de la columna a lo largo de una columna de vidrio para evitar la formación de burbujas, teniendo cuidado de que la columna estuviera vertical, dejando destapada la columna durante el empaqueo. La columna de 100 por 2.5 tarda generalmente 5 hs. para su sedimentación. Se empacó la columna haciendo pasar por lo menos dos volúmenes de solución amortiguadora. Se colocó la muestra con una pipeta Pasteur teniendo cuidado de no remover la superficie del gel, ya que puede causar la distorsión de las bandas. Se corrió la columna con PBS libre de azida de sodio y finalmente se colectaron muestras de 2 ml .

### 3.2.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS ELUATOS OBTENIDOS

La aglutinación es una reacción inmunológica que se efectúa cuando se combinan antígenos particulados con sus anticuerpos específicos. Es altamente sensible y fácil de realizar, comparada con la precipitación, sin embargo, no permite la

cuantificación exacta de anticuerpos y los resultados solo pueden expresarse en función de la dilución mayor del suero que aun permite la observación de un aglutinado. Permite detectar anticuerpos cuando estos se hallan a concentraciones por arriba de 1µg/ml.

#### PROCEDIMIENTO

A los eluatos obtenidos se les determinó su actividad biológica por microaglutinación frente a eritrocitos de grupo A para el plasma de grupo B y eritrocitos de grupo B para el plasma de grupo A, de la siguiente manera: Se colocó una gota de solución de PBS a cada uno de los pozos de la placa de microaglutinación con una pipeta de 50 µl, con otra pipeta se agregaron 50 µl de la solución de anticuerpo (eluatos) en el pozo 1 haciendo diluciones al doble con los microdilutores hasta el pozo 12. Finalmente se agregaron 50 µl de eritrocitos humanos (antígeno) previamente lavados con PBS y resuspendidos al 1% a todos los pozos incluyendo el 12. Se taparon las placas, se agitaron dur, 5 min. y se incubaron 1hr. a 37 °C. El título leído fue la dilución mayor en la que todavía se observaba aglutinación macroscópica y así se reportó.

#### PREPARACION DE LOS INMUNOADSORBENTES

La cromatografía de afinidad es uno de los métodos de separación que facilita la purificación de cualquier biomolécula, basándose en su función biológica o en su estructura química individual. En este tipo de cromatografía se inmoviliza una sustancia (antígeno o anticuerpo) a un soporte insoluble y la molécula a separar se absorbe de manera específica y reversible; uno de los soportes más empleados es la Sepharosa 4B (D-galactosa,4-3.6-anhidro l. galactosa) que al ser tratada con bromuro de cianógeno sus grupos hidróxilo son activados para formar grupos imidocarbonato que reaccionan con sustancias con grupos amino primarios que dan

como resultado enlaces isourea. Otro de los soportes empleados es el gel formado por moléculas de antígeno polimerizadas con glutaraldehído.

## PROCEDIMIENTO

### 3.3.1 ACTIVACION DE LA SEPHAROSA

Se pesaron 10 g. de Sepharosa 4B en peso húmedo y se adicionaron 25 ml de agua destilada, lavándose seis veces con la misma cantidad de agua, se ajustó el pH a 11 con NaOH 2M agitando constantemente y se adicionó 1g de CNBr sólido con agitación. Finalmente se llevó a pH 11 por adición de NaOH 2M y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  0.1M.

### 3.3.2 ACOPLAMIENTO DE PROTEINAS ANTI-A Y ANTI-B A SEPHAROSA 4B ACTIVADA.

La sefárosa activada fué adicionada a la solución de proteína previamente preparada por disolución de 300 mg de proteínas en 50 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.1M a pH 10. La suspensión se agita suavemente a 4 °C por 16 hs. Se lavó hasta que no se detectó absorbancia en el filtrado.

### 3.3.3 ELUCION DEL ANTIGENO SOLUBLE

El inmunoabsorbente se empacó en una columna cromatográfica y el antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* se dejó reaccionar durante media hora y luego fué eluido hasta que no se observó absorbancia significativa. El inmunoabsorbente se regeneró con lavados con PBS para ser reutilizado. Se almacenó en refrigeración.

### 3.4 PREPARACION DEL INMUNOADSORBENTE DE SEPH 4B-Con A

Los estudios en la superficie celular de promastigotes y amastigotes de *Leishmania*, han conducido a la conclusión de que existen moléculas ricas en carbohidratos, que son reconocidas específicamente por lectinas (49). Las lectinas son proteínas de origen animal o vegetal, que reconocen carbohidratos específicos, y que pueden aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados (50,51). Estas sustancias poseen por lo menos dos sitios de unión de carbohidratos, no tienen actividad enzimática, pueden ser solubles o estar unidas a la membrana plasmática (52). Estas han sido empleadas para la detección, aislamiento y caracterización de carbohidratos que constituyen glicolípidos, polisacáridos y glicoproteínas del parásito (53). Las lectinas representan una herramienta útil para investigar diferencias entre cepas de parásitos. Algunas de ellas como la Concanavalina A (Con A), la aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) y la aglutinina de cacahuete (PNA) se han utilizado para caracterizar la superficie celular del parásito. La única lectina que aglutinó y marcó la superficie de los promastigotes de *L. Mexicana* fué la Concanavalina A conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Esto indicó que esta lectina evidenció los grupos antigénicos que contienen residuos de manosa y glucosa expuestos sobre la superficie del parásito.

#### PROCEDIMIENTO

Se preparó una suspensión de 10g de Sepharosa 4B acoplada a Concanavalina A con 50 ml de agua destilada lavando durante 6 veces y desechando el sobrenadante. Se montó la columna cromatográfica (de 0.9 por 10 cm) con Con-A sefarosa (Pharmacia Fine Chemicals, Pisataway, N.J.) equilibrada con 0.01M de buffer salina de tris (hidroximetil aminometano), pH 7.2 conteniendo  $\text{CaCl}_2 \cdot 10^{-3}$  y  $\text{MnCl}_2 \cdot 10^{-3}$ . Se colocaron 3ml del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* dentro de la

columna y se dejó reaccionar durante toda la noche a 4 °C. Se colectaron las fracciones de 2 ml y se determinó la concentración de proteínas por el método de Folin-Lowry (51,54).

### 3.5 TITULACION DE ANTICUERPOS POR ELISA

Los inmunoensayos enzimáticos fueron descritos en 1971 por S. Avrameas y B. Guilbert en Francia, E. Engvall y P. Perlmann en Suecia, y B. van Weemen y H. Schuurs en Holanda. Estos fueron utilizados para la cuantificación de antígenos y posteriormente para la titulación de anticuerpos. Se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad del sistema indicador, utilizando para ello antígenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima (55,56). Pueden ser de dos tipos: Ensayo Inmunoenzimático Homogéneo (EMIT= enzyme-multiplied immunoassay technique) y el ensayo inmunoenzimático heterogéneo (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay). En los primeros una enzima es acoplada a un antígeno que al reaccionar con el anticuerpo hace que se altere la actividad enzimática, la ventaja de este tipo de ensayo es que no requiere de una fase sólida para la separación de reactivos que no reaccionaron, pero funciona únicamente para sustancias de bajo peso molecular como en la detección de niveles terapéuticos de fármacos. El ELISA por su parte se basa en la utilización de una fase sólida con el fin de separar el antígeno o el anticuerpo libre del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En éste el material que se utiliza como fase sólida para adherir el Ac o el Ag pueden ser tubos, microplacas, esferas, discos; los cuales pueden ser de celulosa, nylon, polivinilo, poliacrilamida, poliestireno y partículas de agarosa. La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por adsorción continua de interacciones no covalentes, altas concentraciones de antígeno o anticuerpo reducen los enlaces inespecíficos y mejora los específicos. Se debe determinar la concentración óptima de revestimiento para

cada ensayo. Los ensayos inmunoenzimáticos heterogéneos (ELISA) pueden ser 1)Directos, 2)Indirectos, 3)Sandwich o de doble anticuerpo y 4) Por inhibición Competitiva. Cada uno de los cuales se ilustra en la fig. 3.5.1

La calidad de un ensayo inmunoenzimático depende de la pureza de el antígeno o hapteno utilizado para la inmunización por tanto de la especificidad del anticuerpo y también de la enzima elegida. Esta última debe ser económica, de alto grado de pureza, elevada actividad específica, estable al almacenamiento y resistente a cambios de pH y temperatura, soluble y no dar enlace cruzado. Las más comúnmente empleadas son la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la  $\beta$ -D-galactosidasa; la actividad enzimática se mide principalmente por fotometría.

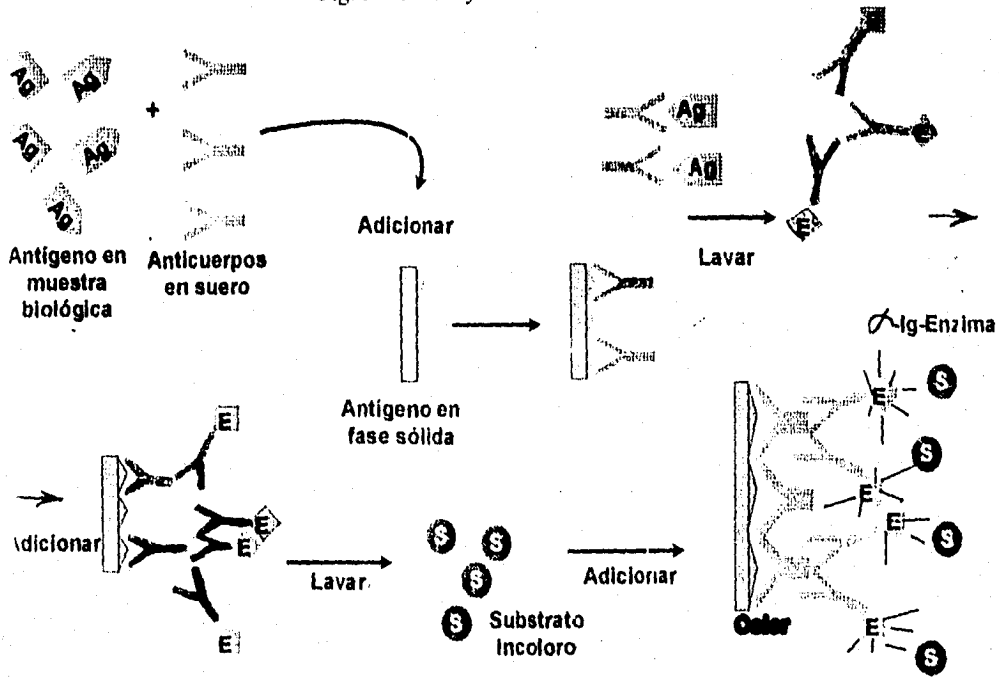
La enzima puede acoplarse a anticuerpos o antígenos por varios procedimientos. La reacción deberá ser altamente eficiente además de que el conjugado deberá ser estable, con un cambio mínimo en la inmunorreactividad y en las propiedades catalíticas de la enzima acoplada. El glutaraldehído es uno de los agentes más utilizados para la conjugación y ésta puede ser por el método de uno o dos pasos. El glutaraldehído reacciona con los grupos epsilon-amino de la proteína, los conjugados hechos por la conjugación de un paso, se polimerizan en exceso y sólo una pequeña porción de enzima se conjuga al anticuerpo o al antígeno y aunque la actividad del conjugado se retiene la afinidad del antígeno disminuye. Para evitar ésta desventaja, se utiliza el método de glutaraldehído en dos pasos, en el cual se deja reaccionar la enzima con el glutaraldehído y una vez activada la enzima, ésta reacciona con el grupo amino del antígeno o del anticuerpo.

El método del peryodato se basa en la oxidación de grupos OH, dado que enzimas como la peroxidasa contiene varios grupos oligosacáridos. La peroxidasa se trata primero con 1-fluoruro-2,4-dinitrobeneno para bloquear los grupos amino libres y así evitar la autoconjugación. Los grupos OH de la peroxidasa activada se dejan reaccionar con los grupos amino libres (alfa y épsilon) del anticuerpo formando una

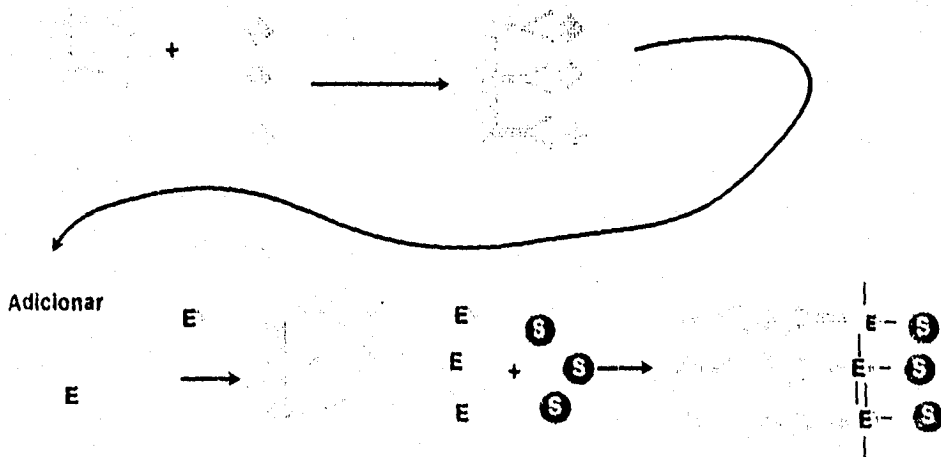


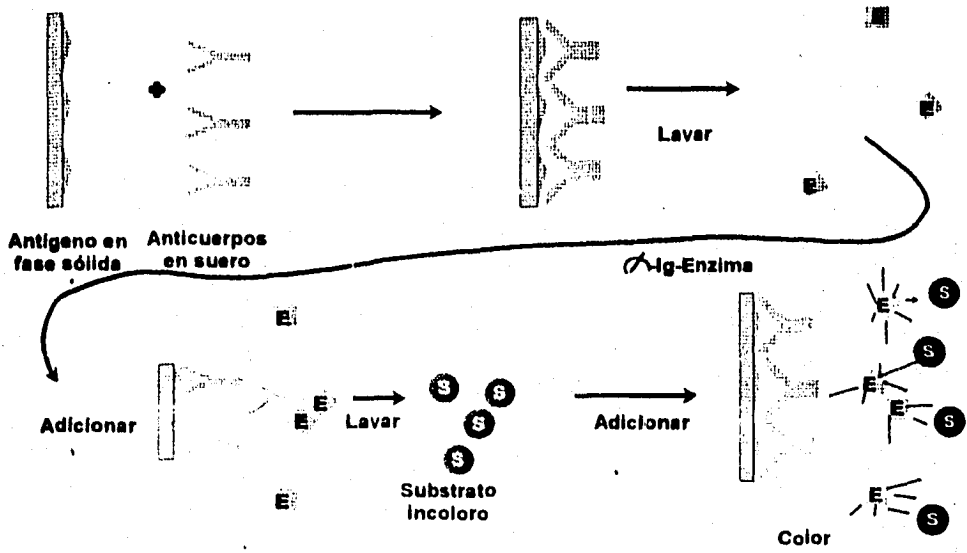
base de Schiff, las cuales se reducen con borohidruro de sodio para dar enlaces estables. Los derivados de maleimida (N,N-O-fenilendiamineimida) y la(m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) que reaccionan con grupos sulfhidrilo de la enzima, se utilizan principalmente para acoplar a beta-D-galactosidasa, debido a que esta enzima posee un gran número de grupos sulfhidrilo. La purificación de los conjugados se realiza por precipitación con sulfato de amonio o por filtración en gel (Sephacryl 200, Ultrigel Ac-A-44). El sustrato debe ser barato, soluble y de fácil uso. Para la peroxidasa hay una amplia variedad de sustratos oxidados por peróxido de hidrogeno pero presentan problemas de solubilidad, siendo la mas usada y adecuada la O-fenilendiamina (OPD).

Fig. 3.5.1 Ensayos inmunoenzimáticos.

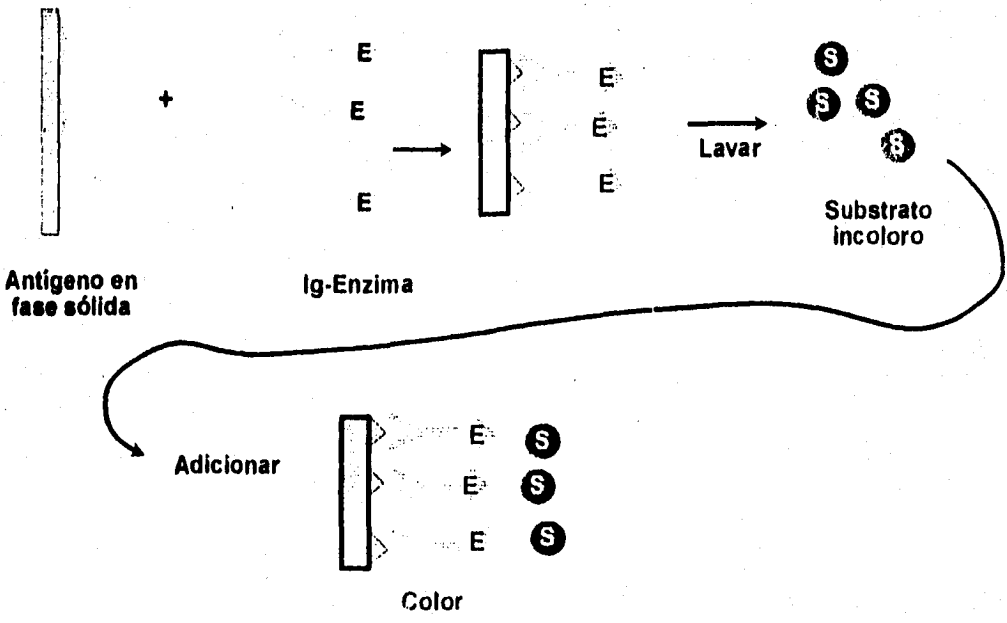


Inmunoensayo enzimático de tipo competitivo





Método de ELISA indirecto. Es un ensayo heterógeno útil para la detección de anticuerpos séricos



ELISA directo

## PROCEDIMIENTO

La titulación de anticuerpos se realizó en 46 sueros positivos a leishmaniasis y 49 sueros control negativos de grupo sanguíneo A,B y O mediante el ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (ELISA). Se sensibilizaron las placas de microcultivo de 96 pozos con 100 µl de antígeno a 8 µg/ml en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6, 18hrs a 4 °C. La placa se bloqueó con PBS-OA 1%-leche al 5% por 1 hr. a 37 °C. El suero se agregó por a dos diluciones (1:200 y 1:400), y se incubó 1hr. a 37°C. Posteriormente se agregaron 100 µl del conjugado anti IgG o anti IgM-peróxidasa de rábano picante en PBS, se incubó durante 1 hr. a 37°C. Se agregó el sustrato OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se estabilizó el color con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5N y se leyó la D.O a 490 nm. Entre las incubaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01%.

### 3.6 DETERMINACION DE LA PROPIEDAD SECRETORA

Los antígenos eritrocitarios también pueden presentarse en forma soluble en las secreciones tales como la saliva y el jugo gástrico, hasta en un 78% de los individuos. A estos individuos se les denomina "secretores", ya que poseen el gen "Se" en forma homo o heterocigota. Los antígenos solubles (sustancias) pueden ser del tipo "A", "B", o "H" y se pueden detectar aun cuando existan en concentraciones muy bajas, porque reaccionan con los anticuerpos correspondientes e inhiben la capacidad del anticuerpo de aglutinar a los glóbulos rojos que poseen el antígeno aglutinante. La reacción es de inhibición de la hemoaglutinación y es una forma de medir la actividad o la relativa potencia de estas sustancias solubles de tipo "ABH" en la saliva. Se aplican los mismos principios generales para las pruebas de hemaglutinación. Se debe estandarizar la suspensión de eritrocitos y los antígenos a

titularse .En cada prueba deben incluirse controles positivos y negativos y los resultados se leen de la siguiente forma:

Aglutinación positiva. Esta indicada por un revestimiento rojo, granular y difuso en el fondo del tubo.

La falta de aglutinación esta indicada por la formación de un botón rojo en el fondo del tubo.

La aglutinación parcial esta indicada por un aspecto intermedio entre el revestimiento difuso del fondo del tubo y el botón rojo (toma la forma de un anillo con el centro vacío).

### 3.6.1 TITULACION DE ANTISUEROS COMERCIALES

Se adicionaron 50 µl de PBS a cada pozo de microtitulación, luego se colocaron 50 µl del suero correspondiente al primer pozo mezclando 5 veces y diluyendo al doble sucesivamente hasta el pozo No. 11, dejando el pozo No. 12 como testigo negativo. Se adicionaron 50 µl de una suspensión de eritrocitos homólogos al 1% a todos los pozos y se incubó a 37 °C durante 20 min. finalmente se leyó visualmente.

### 3.6.2 TITULACION DE SUEROS TESTIGO NEGATIVOS POR INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

De acuerdo al título obtenido anteriormente se diluyó el suero hasta tener cuatro unidades hemaglutinantes (4 UHA). Se adicionaron 50 µl de PBS a todos los pozos de la placa. Después se adicionaron 50 µl de saliva al pozo No. 1 y 2, haciendo diluciones al doble y sucesivamente del pozo 2 al 11 con 50 µl de la muestra, dejando el No. 12 como testigo positivo. Se adicionaron 50 µl de suero homólogo con 4 UHA a todos los pozos. Finalmente se incubaron a 37 °C durante 20 min., y

se adicionaron 50 µl de eritrocitos homólogos a todos los pozos. Se leyeron los resultados visulamente.

### 3.7 DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS POR ELISA COMPETITIVO

La determinación de anticuerpos se realizó en los sueros controles negativos a leishmaniasis por el ensayo inmunoenzimático competitivo de ELISA; utilizando saliva de individuos secretores de grupo A,B, y O como fuente de antígeno de competencia. Se sensibilizaron las placas de microcultivo de 96 pozos con 100 µg/ml de antígeno no eluido (A1) en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6, el antígeno eluido en el inmunoadsorbente de Seph4B-antiA (A2), el antígeno eluido con el inmunoadsorbente de Seph4B-antiB(A3) y el eluido con Seph4B-ConA (A4) a una concentración de 8 µg/ml, durante 18 hrs a 4 °C. La placa se bloqueo con PBS-OA 1%-leche 5% durante 1hr, a 37 °C. En los pozos testigo se agregaron 100 µl de suero diluido 1:200, en los demás pozos se colocó la mezcla siguiente: en un tubo pequeño, se colocaron 100 µl de una dilución 1:100 del suero y se le adicionaron 100 µl de saliva (antígeno de competencia) para tener una dilución final de suero de 1:200. se incubó a 37 °C durante 30 min. Se tomaron 100 µl y se adicionaron a los pozos donde ya se tenía pegado el antígeno. Una vez agregado el suero la placa se incubó a 37 °C durante 1 hr. Después de agregó el conjugado anti IgM o IgG unido a peróxidasa de rábano picante, la placa se incubó 1 hr. a 37°C. Posteriormente se agregó el substrato OPD-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se estabilizó el color con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5N y se leyó la D:O. a 490nm. Entre las incubaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween20 al 0.01%.

### 3.8. TECNICA DE ELISA CON ANTIGENO PARTICULADO.

Los promastigotes usados para cubrir los pozos fueron cepas tipificadas de *Leishmania mexicana mexicana*, cultivadas en medio RPMI (sigma) suplementado con hemoglobina al 10%, mantenidos a 22 °C hasta su crecimiento a fase estacionaria, aproximadamente 7 días. Los promastigotes se cosecharon por centrifugación a 500 g durante 10 min. y se lavaron tres veces con PBS. Se les adicionò formalina al 4% y se ajustaron a  $5 \times 10^7$  promastigotes/ml en buffer de carbonato/bicarbonato, pH 9.6 (donde se realizaron también las diluciones). El antígeno soluble para comparación se preparò por centrifugación del antígeno lavado como se indicò anteriormente.

#### PROCEDIMIENTO

Las microplacas de poliestireno (Costar, High Binding) se cubrieron con 100µl de antígeno/pozo ajustando a una concentración de  $5 \times 10^7$  promastigotes/ml en solución buffer de bicarbonato de sodio 0.05M, pH 9.6, después de la incubación a 37°C durante 2 hrs., se decantò la solución de antígeno y los pozos fueron lavados tres veces con solución de PBS 0.01M+0.05% Tween, pH 7.2. Se adicionaron 100 µl de BSA a cada pozo, la placa se incubò 1hr. a 37°C y se lavò 3 veces. Se adicionaron 100µl de los sueros positivos y controles negativos a dos diluciones 1:200 y 1:400, y se incubò la placa con el suero de cabra anti-IgG de humano conjugado a peroxidasa de rábano durante 1hr. a 37 °C. Posteriormente se agregó el sustrato de OPD- $H_2O_2$ , se estabilizó el color con  $H_2SO_4$  2.5N y se leyò la D.O. a 490 nm. Entre las incubaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01%.

### 3.9 MATERIAL Y EQUIPO

#### Material Biológico

Cepas de *Leishmania mexicana mexicana* MHOM/MX/84/ISSETGS y MHOM/MX/93/INDRE FD. Las cuales fueron representativas de aislamientos de leishmaniasis cutánea diseminada de dos casos humanos.

Los sueros usados como controles negativos fueron 50 sueros de donadores sanos que recorren al Centro Nacional de Transfusión Sanguínea: 18 de grupo A<sup>+</sup>; 1 A<sup>-</sup>; 11 B<sup>-</sup>; 1 B<sup>+</sup> y 18 O<sup>+</sup>, los cuales tienen valores normales de Hto., Hb; ALAT y son negativos a sífilis, HIV; así como al virus de la hepatitis B y C. Todos procedentes del Distrito federal. Los sueros de LCD y LCL son de 46 pacientes.

Plasma humano fresco y congelado de grupo sanguíneo A y B.

Anti IgM y anti IgG de cabra antihumano.

#### Reactivos

Albúmina sérica bovina. Merck

Agua bidestilada

Acido cítrico Merck

Carbonato de sodio. Beaker

Carbonato de sodio anhidro. Beaker

Cloruro de potasio. Beaker

Cloruro de sodio. Beaker

Fosfato dibásico de sodio anhidro. Técnica química

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado. Beaker

Fosfato monobásico de potasio. Beaker

Hidróxido de sodio. Técnica química

O-fenilendiamina. Sigma

Peróxido de hidrógeno. Beaker

Reactivo de Folin-Ciocalteu. Sigma

Concanavalina A (Con-A). Sigma

Tween 20. Sigma

Sepharosa 4B. Sigma



Bromuro de cianógeno. Sigma

Papel indicador 0-11

Tartrato de sodio y potasio.

Sulfato cúprico 1% p/v

Sephadex G-200

### Material

Algodón

Espátula de acero inoxidable

Matraz Erlenmeyer 125, 250, 500 y 1000ml. Pyrex

Matraz volumétrico 50, 100, 1000 ml. Pyrex

Mechero Bunsen

Pipeta graduada de 0.1, 1.5 y 10ml. Pyrex

Pipetas tipo Eppendorf de 20-100  $\mu$ l, 10-100 y 100 $\mu$ l.

Piseta

Placas de microtitulación 12.7 por 9.5 cm. Costar, High Binding

Tubo de ensaye 13X100. Pyrex

Vasos de precipitado de 50, 100, 250, y 500ml.

Columna cromatografica. Kimax

### Equipo

Agitador Vortex genic. Scientific Industries Inc.

Balanza analítica. Mettler H 80.

Centrifuga. Solbat

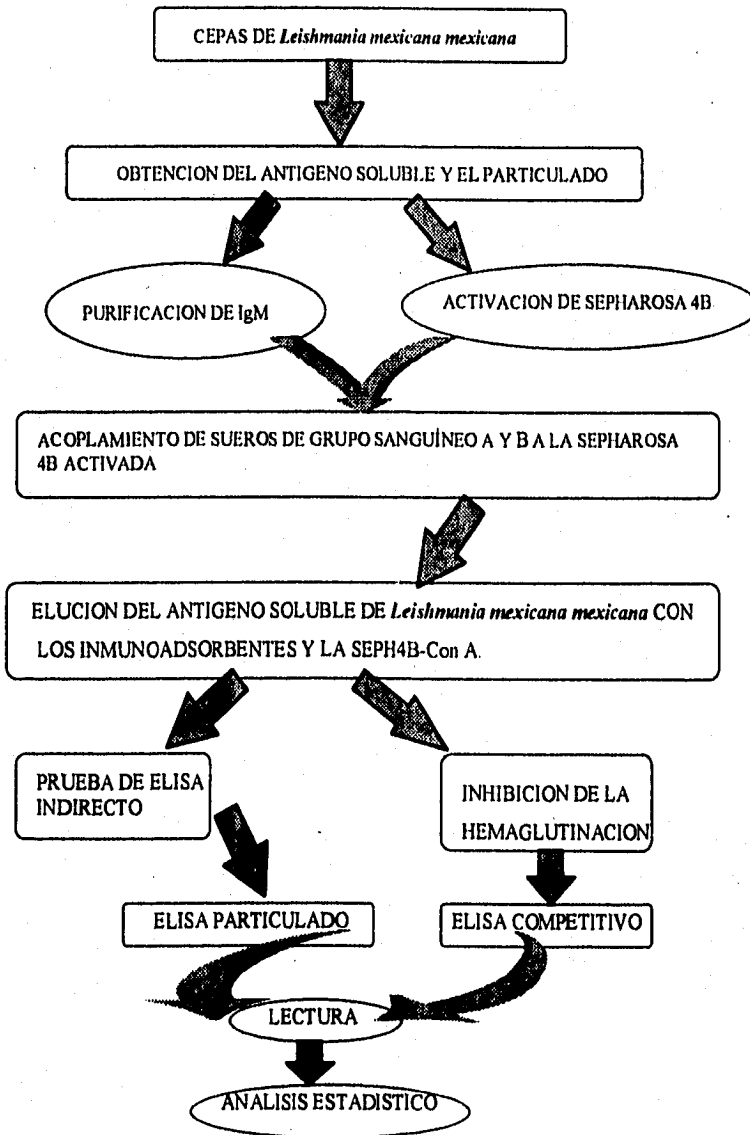
Equipo de destilación 200ml. Pyrex

Espectrofotómetro ELISA. Dynatech MR 250

Incubadora, Riossa EC

Refrigerador. Phillips 127 volts-VA.

### 3.10 ESQUEMA DE TRABAJO



#### 4.1 ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

El análisis de varianza (ANDEVA) (57), es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada una de las 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. Este modelo supone que hay K poblaciones distintas con sus respectivas medias, y que tienen todas la misma varianza, además se supone que estas K poblaciones constituyen juntas una gran población con media llamada Gran Media. Se desea probar la hipótesis nula de que todas las medias de los tratamientos son iguales.

En este modelo, la desviación de una observación con relación a la gran media (desviación total) se descompone en efecto de tratamiento (desviación entre tratamientos) o desviación de cada tratamiento con relación a la gran media y, error residual (desviación dentro de tratamientos) o desviación de cada observación con relación a su propio grupo.

Si la hipótesis nula es cierta, se esperará que los estimadores de la varianza sean aproximadamente iguales y el cociente

$$CM \text{ trat} / CM \text{ error} = S^2 \text{ trat} / S^2 \text{ error}$$

que es una variable F de Fisher será la unidad. Por el contrario si  $H_0$  es falsa; es decir si los efectos de tratamientos no son nulos, esta razón tenderá a ser significativamente mayor que la unidad. Así, se rechazará  $H_0$  si  $CM \text{ trat} / CM \text{ error}$  es mayor que la F de tablas: (F teórica)  $F_{1-\alpha, g, l \text{ trat}, g, l \text{ error}}$ .

$$g, l \text{ trat} = K - 1$$

$$g, l \text{ error} = N - K$$

Donde:

K = No. de observaciones en un grupo

$N$  = No. de observaciones en las  $K$  muestras juntas.

entonces se concluye que existe diferencia entre grupos, o en caso contrario que no existe diferencia, o que si existe es debida al azar.

El análisis aún no está terminado porque ahora aparecen otras preguntas:

¿Son todas las medias de los tratamientos significativamente distintas unas de otras? Si no,

¿Cuáles difieren significativamente entre si?

Una vez obtenido un valor significativo de  $F$ , el paso siguiente consiste en realizar una prueba mediante la cual podamos comparar todos los pares posibles de medias. Esta clase de prueba se aplica sólo cuando se obtiene un valor significativo de  $F$ . Para nuestros propósitos utilizaremos la prueba de Student-Newmann-Kuels (SNK), que es considerada, en general, como una prueba confiable de recorridos múltiples.

#### 4.2 PRUEBA DE STUDENT-NEWMANN-KUELS

Esta prueba esta basada en el concepto general de que cuando aumenta el número de grupos de tratamientos, hay mayor probabilidad de que los extremos o las regiones próximas a los extremos presenten una diferencia significativa falsa cuando son comparados mediante la prueba  $t$ . En otras palabras, si sacamos de una población bastantes grupos de tratamientos, los extremos pueden presentar diferencias bien significativas, a pesar de que pertenezcan a la misma distribución de medias. por tanto necesitamos evaluar las diferencias entre los extremos y cerca de los extremos mediante una prueba que incorpore un factor de corrección que toma en cuenta el número de medias que están siendo comparadas ( $k$ ).

La prueba de Student-Newmann-Kuels, o SNK, suministra una especie de escala móvil de diferencias mínimas que deben ser igualadas o excedidas para establecer la

significación. En otras palabras, si tenemos cinco medias de tratamientos que se ordenan en valores crecientes desde  $X_1$  hasta  $X_5$ , debe existir una diferencia mínima mayor entre  $X_5$  y  $X_1$  que entre  $X_4$  y  $X_3$  o entre  $X_3$  y  $X_1$ .

Primero se calcula el error estándar de la media, utilizando la media de los cuadrados del residuo como estimación de  $\sigma^2$ .

El número de repeticiones entre tratamientos es sustituido por  $n$ .

$$S_x = S^2 / n \quad \text{ó} \quad S_x = S^2 / n/t_x$$

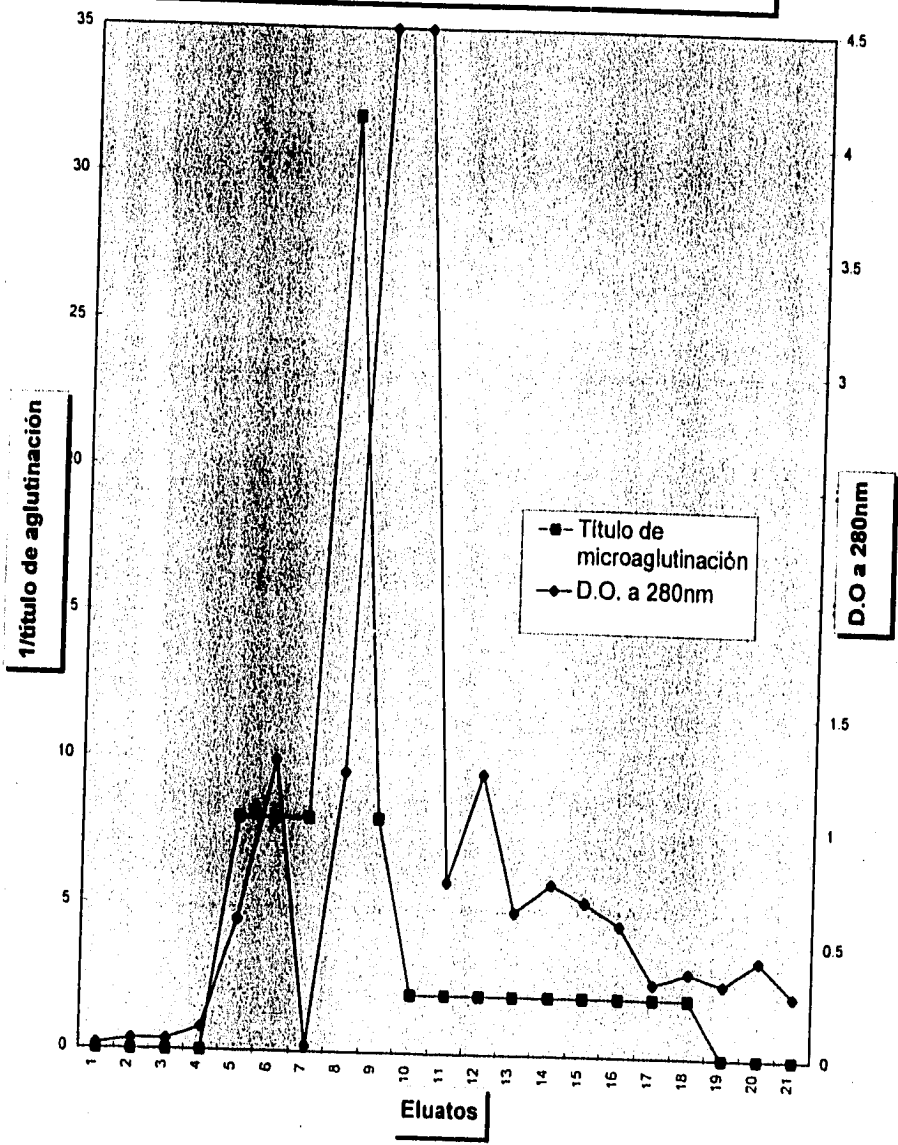
Luego se hace una tabla que contenga los valores de  $K$ . Por ejemplo,  $K=2$  está asociado con dos medias cualquiera que sean adyacentes;  $K=3$  se asigna a la comparación de dos medias que son los extremos de tres medias, y  $K=4$ , se emplea para determinar la diferencia mínima que debe ser encontrada entre dos medias que son los extremos de cuatro medias. De la tabla I del apéndice se obtienen los valores de  $q$  asociados con los g.l. y los respectivos valores de  $K=2,3$  y  $4$ . Finalmente, multiplicamos cada valor de  $q$  por  $S_x$ , que tenemos ya calculado. Esto nos da los valores de  $qS_x$  y cada uno de estos valores es la diferencia mínima que debe encontrarse entre dos medias asociadas con un valor específico de  $K$ , si se va a considerar que estas dos medias son significativamente distintas estadísticamente. Puesto que la diferencia mínima entre un par dado de medias es determinada por  $qS_x$  es evidente que un valor más pequeño de  $S_x$  aumentará las posibilidades de detectar diferencias pequeñas.

### 3. RESULTADOS

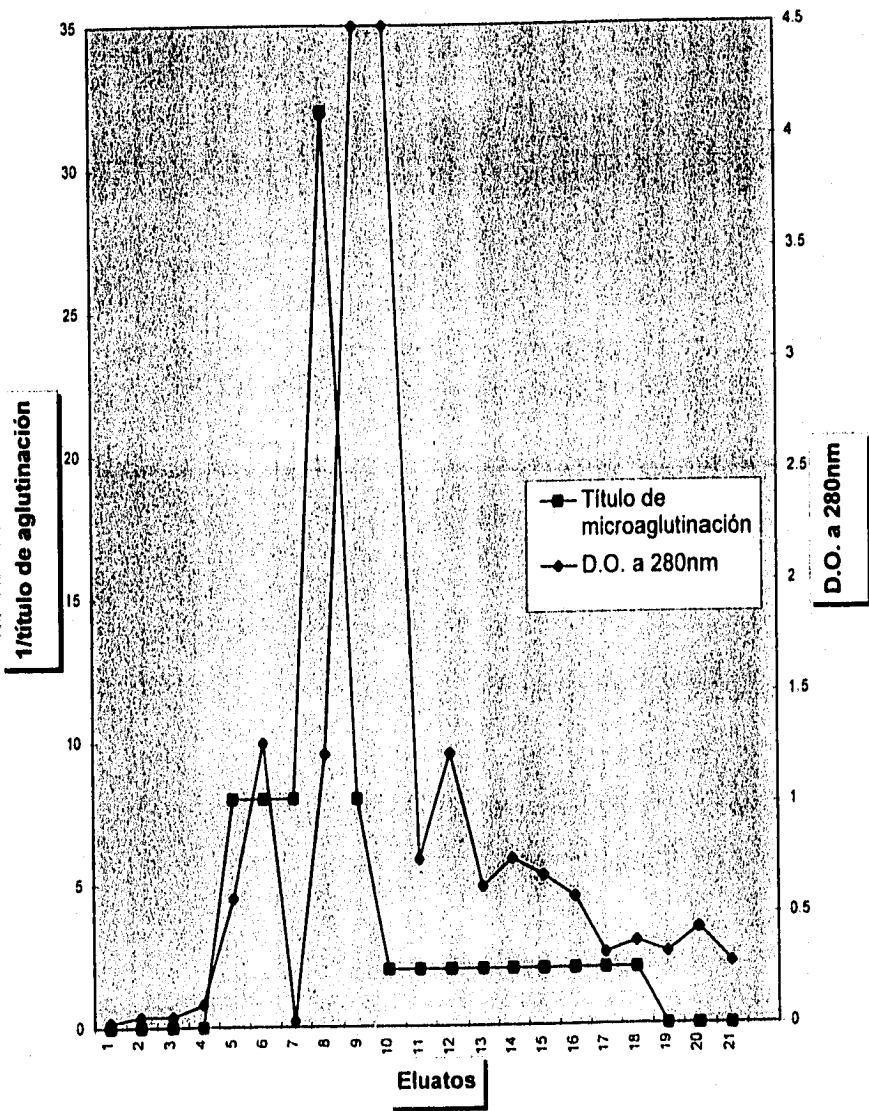
La purificación de inmunoglobulinas de tipo IgM procedentes de plasma fresco congelado de grupo sanguíneo A y B, por cromatografía en columna empleando el gel de dextrán (Sephadex G200-40), permitió obtener los eluatos cuya actividad biológica determinada por microaglutinación estaba relacionada con la densidad óptica (D.O) a 280nm; de estos se seleccionaron las muestras 6 y 8 a 12 para el plasma de grupo sanguíneo A (gráfica 3.2.1), y los eluatos 3 a 6 y 5 a 8 para el primero y segundo plasmas purificados de grupo sanguíneo B (gráfica 3.2.2 y 3.2.3), muestras que se utilizaron posteriormente para su acoplamiento con los inmunoabsorbentes.

Después de la elución del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* con los inmunoabsorbentes de Sepharosa 4B-acoplado a proteínas con Anti A y otro con anti B, se seleccionaron los eluatos de antígeno con mayor D.O. a 280 nm. Estos fueron el 3,5 y 6 obtenidos por elución en Sepharosa 4B anti A y los 3-6, eluidos en Seph4B.antiB, los cuales se utilizaron posteriormente para las pruebas de ELISA (Tabla 3.3.1 y 3.3.2).

Gráfica 3.2.1 Eluatos obtenidos por cromatografía en sephadex G200-40 de plasma de grupo sanguíneo A.



**Gráfica 3.2.2 Eluatos obtenidos por cromatografía en Seph G200-40 de plasma de grupo sanguíneo B.**





Gráfica 3.2.3 Eluatos obtenidos por cromatografía en Seph G40-200 de plasma de grupo sanguíneo B.

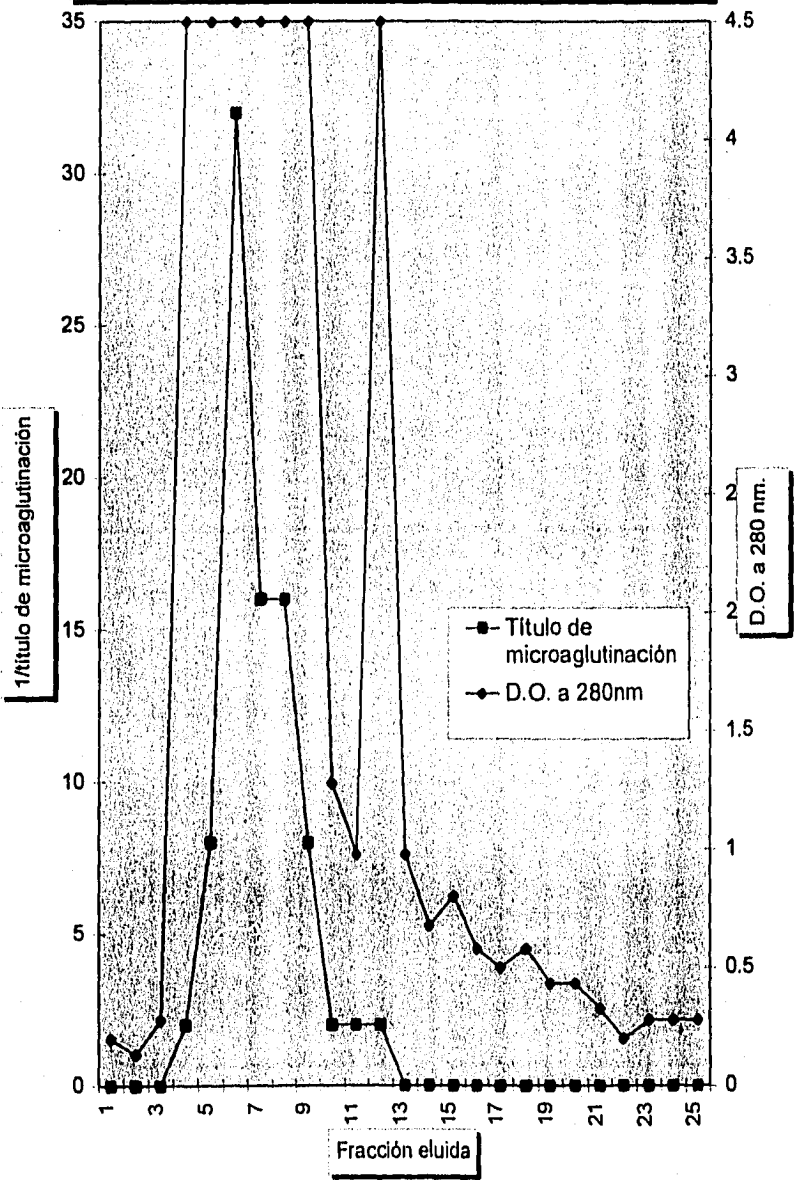


Tabla 3.3.1. D.O. a 280nm. de los eluatos obtenidos por elución del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* en Sepharosa4B-antiA.

No. tubo	D.O. a 280nm
1	0.0969
2	0.1761
3	0.2218
4	0.0969
5	0.3680
6	0.1919
7	0.0669
8	0.0669
9	0.1461
10	0.0669
11	0.0669
12	0.0669
13	0.0322
14	0
15	0
16	0
17	0

Tabla 3.3.2 D.O. a 280nm. de los eluatos obtenidos por elución del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* en Sepharosa4B.antiB.

No. tubo	D.O. a 280nm
1	0.3010
2	0.5051
3	0.9031
4	0.9031
5	1.2041
6	0.6021
7	0.3010
8	0.3802
9	0.3010
10	0.3802
11	0.6021
12	0.4260
13	0.3010
14	0.4260
15	0.3590
16	0.1047
17	0.3680
18	0.2430
19	0.1919
20	0.1047
21	0.1919
22	0.1249
23	0.0902
24	0.0580
25	0.0902
26	0.1249

Para eliminar los residuos de glucosa y manosa del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana*, se utilizó la Sepharosa 4B acoplada a Concanavalina A (Seph4B-Con A) con la cual se dejó reaccionar el antígeno; obteniéndose muestras con D.O. a 280nm como se muestra en la tabla 3.4.1., tomándose las primeras 3 para los ensayos posteriores, ya que en éstas se obtuvo el volumen de antígeno adicionado inicialmente.

Para confirmar que las columnas con los inmunoabsorbentes funcionaron adecuadamente, esto es, que la columna con Sepharosa 4B-antiA adsorbió las N-acetil-D-galactosaminas inherentes al antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* y que la elución de este con Sepharosa 4B-antiB eliminó la D-galactosa; se realizó la determinación de anticuerpos en los sueros controles negativos a leishmaniasis, utilizando saliva de individuos secretores de grupo sanguíneo A, B y O como fuente de antígeno de competencia. Para ello se titularon los antisueros comerciales anti A, anti B y anti D (BCA, Organon Teknika Co.) por microaglutinación (tabla 3.6.1). Así como la inhibición de la hemaglutinación de los eritrocitos y suero homólogos por acción del antígeno en saliva (tabla 3.6.2).

Tabla 3.4.1 Eluatos de antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* con Sepharosa4B-Concanavalina A.

No. muestra	D.O. a 280nm
1	0.0621
2	0.1761
3	0.3310
4	0.3310
5	0.3310
6	0.3979
7	0.5740
8	0.3979
9	0.3010
10	0.3010
11	0.2341
12	0.1761
13	0.1249
14	0.0378
15	0
16	0
17	0
18	0
19	0
20	0

Tabla 3.6.1 Titulación de antiseros comerciales

Antisero	Título de microaglutinación	4Unidades Hemaglutinantes (4UHA)
Anti A	1:32	1:8
Anti B	1:32	1:8
Anti D	1:2	1:2

Tabla 3.6.2 Resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación de sueros negativos a leishmaniasis

No. suero	Grupo sanguíneo	Inhibición de HA
1	A+	Positivo
2	A+	Positivo
3	A+	Positivo
4	A+	Positivo
5	A+	Positivo
6	B+	Positivo
7	B+	Positivo
8	B-	Positivo
9	B-	Positivo
10	O+	Positivo

**Tabla 3.7.1 resultados de ELISA competitivo**

**Ag1: Antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana***

**Ag2: Antígeno eluido con Sepharosa4B-antiA**

**Ag3: Antígeno eluido con Sepharosa4B.antiB**

**Ag4: Antígeno eluido con Sepharosa4B-ConcavalinaA**

**Concentración 8 g/ml**

**Conjugado: Anti IgG humano diluido 1:1000**

**Dilución de suero: 1:200**

Grupo sanguineo	Ag1		Ag2		Ag3		Ag4	
	Testigos	Competencia	Testigos	Competencia	Testigos	Competencia	Testigos	Competencia
A+	0.253	0.191	0.112	0.142	0.092	0.086	0.111	0.062
A+	0.246	0.147	0.06	0.107	0.071	0.062	0.126	0.008
A+	0.215	0.181	0.138	0.133	0.191	0.057	0.245	0
A+	0.248	0.21	0.233	0.175	0.207	0.06	0.247	0.101
A+	0.233	0.197	0.174	0.124	0.154	0.018	0.182	0.133
B+	0.215	0.136	0.127	0.181	0.046	0.02	0.124	0.047
B+	0.195	0.218	0.207	0.179	0.131	0.145	0.129	0.088
B-	0.24	0.213	0.12	0.165	0.059	0.078	0.041	0.059
B-	0.231	0.201	0.151	0.15	0.122	0.083	0.106	0.044
O+	0.215	0.197	0.142	0.167	0.1	0.054	0.159	0

**Tabla 3.7.2 Resultados de ELISA competitivo**

**Ag1: Antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana***

**Ag2: Antígeno eluido con Sepharosa4B-anti A**

**Ag3: Antígeno eluido con Sepharosa4B-antiB**

**Ag4: Antígeno eluido con Sepharosa4B-Concavalina A**

**Concentración: 8 g/ml      Conjugado: Anti IgM humano diluido 1:1000**

**Dilución de suero:            1:200**

Grupo sanguíneo	Ag1		Ag2		Ag3		Ag4	
	Testigos	Competencia	Testigos	Competencia	Testigos	Competencia	Testigos	Competencia
A+	0.066	0.018	0.104	0.034	0.083	0	0.027	0.078
A+	0.12	0.039	0.104	0.045	0.17	0	0.068	0
A+	0.045	0.026	0.084	0	0.053	0	0	0
A+	0.072	0.039	0.18	0	0.052	0	0.03	0
A+	0.11	0.062	0.104	0	0.087	0	0.071	0
B+	0.119	0.02	0.127	0	0.108	0	0.024	0
B+	0.11	0.059	0.114	0.014	0.068	0	0.012	0
B-	0.038	0.034	0.026	0.024	0	0	0	0
B-	0.223	0.034	0.209	0.003	0.127	0	0.24	0
O+	0.095	0.07	0.132	0.066	0.129	0.036	0.071	0



Tabla 3.5.1 Resultados de ELISA indirecto y particulado de sueros positivos a Leishmaniasis

Antígeno sin tratamiento	Ag eluido con Seph4B-antiA	Ag eluido con Seph4B-antiB	Ag eluido con Seph4B-conA	ELISA Particulado
0.262	0.132	0.093	0.129	0.174
0.25	0.101	0.098	0.105	0.207
0.248	0.093	0.089	0.089	0.181
0.253	0.075	0.111	0.132	0.187
0.194	0.086	0.062	0.026	0.157
0.219	0.086	0.081	0.075	0.166
0.262	0.099	0.153	0.15	0.227
0.248	0.092	0.078	0.1	0.137
0.221	0.102	0.087	0.054	0.135
0.262	0.12	0.117	0.102	0.212
0.25	0.122	0.071	0.045	0.167
0.256	0.079	0.076	0.077	0.172
0.267	0.116	0.092	0.047	0.167
0.256	0.142	0.116	0.091	0.209
0.253	0.116	0.08	0.066	0.186
0.212	0.089	0.059	0.069	0.208
0.24	0.104	0.066	0.052	0.172
0.259	0.179	0.133	0.125	0.233
0.214	0.106	0.071	0.035	0.23
0.267	0.182	0.171	0.128	0.236
0.256	0.136	0.1	0.107	0.25
0.27	0.152	0.107	0.098	0.25
0.259	0.172	0.174	0.109	0.184
0.229	0.126	0.098	0.063	0.158
0.227	0.174	0.177	0.135	0.245
0.259	0.14	0.145	0.132	0.251
0.245	0.103	0.119	0.07	0.191
0.197	0.051	0.046	0.032	0.157
0.265	0.17	0.179	0.15	0.291
0.262	0.102	0.102	0.075	0.282
0.253	0.127	0.105	0.034	0.276
0.248	0.093	0.073	0.083	0.245

Tabla 3.5.1 Resultados de ELISA indirecto y particulado de sueros positivos a Leishmaniasis

0.259	0.095	0.097	0.053	0.242
0.209	0.093	0.083	0.01	0.205
0.24	0.108	0.119	0.074	0.295
0.276	0.144	0.139	0.108	0.245
0.248	0.089	0.06	0.032	0.121
0.264	0.114	0.1	0.077	0.161
0.232	0.093	0.072	0.03	0.166
0.207	0.064	0.056	0.038	0.13
0.278	0.175	0.061	0.117	0.245
0.284	0.182	0.193	0.143	0.247
0.256	0.124	0.113	0.068	0.235
0.227	0.086	0.065	0.038	0.166
0.245	0.09	0.072	0.063	0.165
0.27	0.152	0.174	0.128	0.219

Tabla 3.5.2 Resultados de ELISA indirecto y particulado de sueros negativ				
Leishmaniasis de grupo sanguíneo A.				
ELISA	INDIRECTO			ELISA
Ag sin tx.	Ag eluido con	Ag eluido con	Ag eluido con	PARTICULADO
	Seph4B-antiA	Seph4b-antiB	Seph4B-conA	
0.261	0.177	0.092	0.041	0.207
0.264	0.187	0.122	0.1	0.2
0.215	0.104	0.106	0.033	0.164
0.178	0.065	0.068	0.057	0.161
0.258	0.087	0.09	0.036	0.179
0.154	0.049	0.051	0	0.112
0.176	0.063	0.067	0.018	0.142
0.217	0.081	0.057	0	0.149
0.258	0.143	0.134	0.057	0.219
0.152	0.046	0.05	0	0.146
0.141	0.044	0.047	0	0.139
0.148	0.048	0.088	0	0.134
0.212	0.075	0.049	0.019	0.125
0.234	0.101	0.087	0.062	0.152
0.271	0.157	0.164	0.148	0.173
0.277	0.09	0.096	0.101	0.14
0.249	0.124	0.141	0.135	0.248
0.181	0.106	0.12	0.131	0.221
0.274	0.153	0.161	0.144	0.218

Tabla 3.5.3 Resultados de ELISA indirecto y particulado de sueros negativos a leishmaniasis de grupo sanguíneo B.

ELISA	INDIRECTO			
Ag sin tx	Ag eluido con Seph4B-antiA	Ag eluido con Seph4B-antiB	Ag eluido con Seph4B-Con	ELISA con Ag particulado
0.254	0.174	0.177	0.155	0.227
0.238	0.131	0.152	0.088	0.191
0.274	0.169	0.181	0.142	0.18
0.23	0.164	0.185	0.139	0.157
0.236	0.166	0.171	0.115	0.228
0.267	0.141	0.147	0.132	0.196
0.195	0.08	0.071	0.018	0.172
0.279	0.098	0.077	0.12	0.184
0.225	0.143	0.165	0.188	0.238
0.226	0.131	0.127	0.186	0.175
0.248	0.123	0.132	0.117	0.194
0.256	0.112	0.108	0.101	0.175

Tabla 3.5.4 Resultados de ELISA indirecto y particulado de sueros negativos a Leishmaniasis de grupo sanguíneo O.

Ag sin tx.	Ag eluido con Seph4B-antiA	Ag eluido con Seph4B-antiB	Ag eluido con Seph4B-ConA	ELISA con Antígeno particulado
0.131	0.157	0.164	0.101	0.118
0.2	0.1	0.146	0.19	0.24
0.22	0.104	0.091	0.066	0.149
0.251	0.08	0.18	0.19	0.109
0.279	0.129	0.149	0.127	0.224
0.276	0.119	0.141	0.143	0.211
0.246	0.118	0.117	0.164	0.203
0.125	0.14	0.125	0.157	0.204
0.188	0.167	0.137	0.193	0.19
0.215	0.147	0.064	0.173	0.235
0.22	0.167	0.132	0.176	0.212
0.133	0.112	0.099	0.108	0.196
0.195	0.072	0.075	0.058	0.198
0.294	0.141	0.108	0.189	0.164
0.15	0.134	0.131	0.193	0.214
0.146	0.091	0.09	0.138	0.185
0.137	0.069	0.118	0.182	0.215
	0.164	0.146	0.115	0.215

CUADRO 4.1.1 ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE SUEROS POSITIVOS A LEISHMANIASIS Y SUEROS NEGATIVOS DE GRUPO SANGUINEO A,B Y O.

Antígeno	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculada	P	F teórica
Inalamiento	Sin						
	Entre grupos	0.03413	3	0.0113	8.6289	4.80E-05	2.7058
	Dentro de los grupos	0.12	90	0.0013			
	Total	0.1519	93				
Eluido con Seph 4B-anti A	Entre grupos	0.0104	3	0.0034	2.7551	0.0469	2.7047
	Dentro de los grupos	0.0644	91	0.0012			
	Total	0.0748	94				
Eluido con Seph 4B-anti B.	Entre grupos	0.0216	3	0.0072	5.2952	0.002	2.7047
	Dentro de los grupos	0.1241	91	0.0013			
	Total	0.1457	94				
Eluido con Seph4B-ConA	Entre grupos	0.0968	3	0.322	17.0682	7.06E-09	2.7047
	Dentro de los grupos	0.172	91	0.0018			
	Total	0.2688	94				
ELISA particulado	Entre grupos	0.1566	3	0.0052	3.1943	0.0272	2.7058
	Dentro de los grupos	0.1471	90	0.0016			
	Total	0.1627	93				

CUADRO 4.2.1 PRUEBA DE STUDENT NEUMANN KUELS

Antígeno	Sx= Sx/n/tx	k	q	qsx o dif.min significativa	Comparación de medias	Diferencia
Sin tratamiento	7.50E-03	2	2.83	0.0213	X4-X1=0.0466 0.0282	S
		3	3.4	0.0256	X3-X1=0.0482 0.0256	S
		4	3.74	0.0282	X2-X1=0.0166 0.0210	NS
					X3-X2=0.0297 0.0210	S
					X4-X2=0.0301 0.026	S
				X4-X3=0.0004 0.021	NS	
Eluido con Seph4B-antiA	0.0073	2	2.83	0.021	X4-X1=0.036 0.027	S
		3	3.4	0.025	X3-X1=0.023 0.025	NS
		4	3.74	0.027	X2-X1=0.0168 0.021	NS
					X3-X2=0.0062 0.021	NS
					X4-X2=0.0192 0.025	NS
				X4-X3=0.013 0.021	NS	
Eluido con Seph4B-antiB	7.50E-03	2	2.83	0.021	X4-X1=0.047 0.0283	S
		3	3.4	0.025	X3-X1=0.0287 0.0258	S
		4	3.74	0.028	X2-X1=0.0087 0.0214	NS
					X3-X2=0.02 0.0214	NS
					X4-X2=0.0382 0.0256	S
				X4-X3=0.0182 0.0214	NS	
Eluido con Seph4B-ConA	8.92E-03	2	2.83	0.025	X4-X1=0.091 0.033	S
		3	3.4	0.03	X3-X1=0.068 0.030	S
		4	3.74	0.033	X2-X1=0.025 = 0.025	S
					X3-X2=0.0433 0.025	S
					X4-X2=0.066 0.030	S
				X4-X3=0.023 0.025	S	
Particulado	8.34E-03	2	2.83	0.024	X4-X1=0.0341 0.031	S
		3	3.4	0.028	X3-X1=0.0231 0.028	NS
		4	3.74	0.031	X2-X1=0.0223 0.024	NS
					X3-X2=0.0008 0.024	NS
					X4-X2=0.0118 0.028	NS
				X4-X3=0.011 0.024	NS	

Donde: X1: Media de sueros negativos de grupo sanguíneo A  
X2: Media de sueros positivos a Leishmaniasis  
X3: Media de sueros negativos de grupo sanguíneo O.  
X4: Media de sueros negativos de grupo sanguíneo B.

S: Diferencia significativa  
NS: Diferencia no significativa.

## DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados demostraron la existencia de reactividad cruzada entre antígenos de *Leishmania mexicana mexicana* e isohemaglutininas del sistema de grupos sanguíneos ABO evidenciada mediante la técnica de ELISA indirecto, utilizando como antígeno extracto soluble de promastigotes de *L. mex. mex.* causante de Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) en dos casos humanos, cuyo antígeno fue previamente tratado con inmunoabsorbentes específicos de glicoproteínas de los grupos sanguíneos A y B; así como el antígeno extracto total de promastigotes ensayados con la técnica de ELISA particulado. Técnicas que ofrecen ventajas en cuanto a realización ya que presentan ventajas con respecto a otras técnicas diagnósticas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunoelectrotransferencia (Western blot), técnicas que utilizan DNA recombinante e incluso los cultivos de microbiopsias e inoculación en Hamsters, ya que no en todos los centros existe la disponibilidad de equipo o el personal capacitado o recursos económicos suficientes ya que es un problema dado en países subdesarrollados y predominante de niveles socioeconómicos bajos.

La aplicación de la técnica de ELISA indirecto y particulado en los casos de LCD, LMC y LV requiere ser más estudiada y manipulada en relación al sistema de grupos sanguíneos ABO; ya que esto representaría ventajas para la detección de casos en zonas endémicas.

La presencia de reacción cruzada entre antígenos de *Leishmania mexicana mexicana* e isohemaglutininas de los grupos sanguíneos ABO se describió en sueros de pacientes y de individuos sanos con diferente grupo sanguíneo que referían no provenir de zonas endémicas de leishmaniasis (58), lo cual es un factor de inespecificidad en el serodiagnóstico por ELISA indirecto y particulado por lo cual



el antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* se adsorbió con Sepharosa4B-anti A, Sepharosa4B-anti B y Sepharosa4B-Concavalina A; inmunoabsorbentes que nos permitirían retener los glicoconjugados de N-acetil-D-galactosamina, D-galactosa; así como los grupos que contienen residuos de manosa y glucosa respectivamente. Partiendo de ésta hipótesis se seleccionaron sueros y muestras de saliva de individuos secretores sanos de grupo sanguíneo A, B y O mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación y se procedió a realizar la prueba de ELISA competitivo utilizando saliva como fuente de antígeno de competencia; obteniendo los resultados reportados, aunque no son de un número suficiente para un tratamiento estadístico, se observa disminución de la densidad óptica a 490nm de los sueros corridos por ELISA competitivo con respecto a los testigos, lo cual indicó que existe similitud entre el antígeno de grupo sanguíneo y los antígenos de *L. mex. mex.*; teniendo disminución de lecturas cuando se utilizó el conjugado de anti IgM humano; ya que las inmunoglobulinas acopladas al soporte se Sepharosa4B fueron principalmente de clase "M".

Puesto que el valor de F obtenido del análisis de varianza de un factor de los datos obtenidos por ELISA indirecto utilizando antígenos con diferentes tratamientos; se decide rechazar la hipótesis nula, es decir que tenemos evidencia estadística y experimental de que existe una diferencia estadística significativa entre la media de al menos un par de tratamientos y posiblemente entre más, cuyos grupos de tratamientos son los sueros positivos a leishmaniasis y sueros negativos de grupo sanguíneo A, B y O; así como los grupos formados por los negativos entre sí. Entre los cuales cabe destacar que el tratamiento del antígeno soluble de *L. mex. mex.* con Sepharosa4B-Concavalina A permitió obtener una F calculada de 17.0682 con respecto a una F teórica de 2.7047 con una p de  $7.081 \times 10^{-9}$  lo cual indica una diferencia significativa entre los grupos de tratamientos; corroborado con la prueba de Student Newmann-Kuels descrito en el apartado correspondiente.

La técnica de ELISA indirecto utilizando antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* sin tratamiento demostró cruce antigénico con sueros positivos a leishmaniasis y sueros negativos de grupo sanguíneo B (58), lo cual podría deberse a que las cepas utilizadas poseen un antígeno de grupo sanguíneo A como la N.acetil-D-galactosamina; lo cual contribuye a que el suero con anticuerpos anti A en suero de grupo sanguíneo B reconozcan el antígeno de *Leishmania mexicana mexicana* dando títulos altos de anticuerpos (17). Sin embargo, la prueba de ELISA indirecto realizada con antígeno soluble de L. mex. mex. eluido previamente en el inmunoadsorbente de Sepharosa4B-antiA y Sepharosa4B.antiB demostró la presencia de reactividad cruzada con grupo sanguíneo A, B y O; debido probablemente a la presencia en el suero de sujetos sanos de anticuerpos anti-flora microbiana que cruzan con antígenos de grupo sanguíneo del sistema ABO. Al respecto Arron Thall y Uri Galili (59,60) encontraron que el hombre puede producir grandes cantidades de anticuerpos naturales de tipo IgG que interactúan específicamente con residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina, estos anticuerpos naturales, llamados "anti-Gal", constituyen aproximadamente el 1% de la IgG circulante en el hombre y puede aislarse del suero normalmente mediante inmunoadsorbentes.

## CONCLUSIONES

Existen antígenos de reacción cruzada entre antígenos de *Leishmania mexicana mexicana* e isohemaglutininas de grupos sanguíneos ABO.

La técnica de ELISA indirecto y particulado apoyada con más estudios, puede ser usada como una herramienta para lograr un diagnóstico más seguro.

La presencia de reactividad cruzada fué evidenciada mediante la técnica de ELISA indirecto, utilizando como antígeno, extracto soluble y total de promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*.

El tratamiento del antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* con Sepharosa4B-Concavalina A redujo significativamente la reacción cruzada causada por isohemaglutininas del sistema de grupos sanguíneos ABO.

## PERSPECTIVAS

Realizar la técnica de ELISA indirecto con antígeno soluble de *Leishmania mexicana mexicana* conociendo el grupo sanguíneo de los sueros positivos, ya que en el presente trabajo no fué posible hacer la determinación del grupo sanguíneo por prueba inversa por ser el suero insuficiente.

Se requiere de la estandarización de la técnica de ELISA con antígeno particulado y su correlación con la técnica de IFI ya que ambos determinan antígenos de superficie para lo cual, se necesita correlacionar las lecturas de un suero problema con títulos conocidos previamente realizados por IFI y su corrimiento en ELISA

## APENDICE I

### PREPARACION DE SOLUCIONES

#### SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Mezclar 8.0g de NaCl, 0.2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.15g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2g de KCl, hasta su disolución total en 1000ml de agua destilada y ajustar a pH 7.4. Almacenar a 4°C.

#### SOLUCION DE ALSEVER

Mezclar 2.05g de glucosa o dextrosa, 0.80g de citrato de sodio dihidratado, 0.055g de ácido cítrico monohidratado, 0.42g de NaCl en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza a 10lb durante 15 min. Se suspenden dos volúmenes de esta solución por uno de eritrocitos. Refrigerar a 4°C.

#### SOLUCION SALINA ISOTONICA

Pesar 8.5g de NaCl y adicionar 1000ml de agua destilada.

#### AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO DE CARBONATOS pH 9.6

A 1.59g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 2.93g de  $\text{NaHCO}_3$ , adicionar 1000ml de agua destilada. Almacenar a 4°C por no más de dos semanas.

#### REACTIVOS PARA DETERMINACION DE PROTEINAS

##### REACTIVO A.

Carbonato de sodio al 2% y tártrato de sodio y potasio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1N.

##### REACTIVO B

$\text{Cu}_2\text{SO}_4$  al 0.5% en agua destilada.

##### REACTIVO C

Mezclar 50ml del reactivo A con 1ml del reactivo B.

#### REACTIVO D

Reactivo de Folin-Ciocalteu.

A 0.2ml de muestra (25-500 $\mu$ g/ml) adicionar 1ml del reactivo C, dejar 10 min. a temperatura ambiente, luego adicionar 0.1ml del reactivo D, dejándolo 30 min. a temperatura ambiente y leer a 750 nm.

#### SUSTRATO DE PEROXIDASA

Amortiguador del sustrato pH 5.0

Mezclar 24.3ml de ácido cítrico 0.1M y 25.7ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M, adicionarle 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

Tomar 10ml de la solución y adicionarles 4 mg de Ortofenilendiamina (OFD). Se prepara inmediatamente antes de usarla pues la OFD es fotosensible.

#### MEDIO DE NOVY-NICOLLE-McNEAL (NNN)

El agar se obtiene calentando juntos los siguientes ingredientes: 1.4g de agar, 0.6g de NaCl en 90 ml de agua destilada, una vez fundido el agar, se transfiere a los recipientes de cultivo. Se esteriliza manteniendo los tubos a 121°C durante 15 min. Se deja enfriar hasta unos 50°C y se agrega sangre de conejo desfibrinada, obtenida en condiciones de asepsia a una concentración del 15%. La sangre se mezcla con el agar haciendo rodar los tubos entre las manos, en posición vertical. Luego, los tubos se colocan en posición inclinada hasta que el agar se solidifica y luego se colocan los tubos en posición vertical a prueba de esterilidad a 37°C por 24 hrs, y se

siembran los tubos que no presentan crecimiento después de la prueba de esterilidad.

#### **CALDO DE INFUSIÓN DE CEREBRO Y CORAZÓN (BHI)**

Mezclar 6.0g de Infusión cerebro y corazón, 6.0g de peptona de carne, 5.0g de NaCl, 3.0g de dextrosa, 14.5g de peptona de gelatina, 2.5g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hasta su disolución total en 1000ml de agua destilada y ajustar a pH  $7.4 \pm 0.2$ . O bien suspender 37g del polvo en 1000ml de agua destilada. Distribuir y esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  por 15 min.

#### **MEDIO DE CULTIVO RMPI 1640**

Mezclar 2.0g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50 U/ml de penicilina, 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina en 1000 ml de agua destilada. Se pesa el  $\text{NaHCO}_3$  y el RMPI se disuelven en 700 ml de agua destilada, y se pasa por filtro grueso, posteriormente se esteriliza por filtración en condiciones de esterilidad. Se agrega el antibiótico y se suplementa con hemoglobina al 10%.

## REFERENCIAS.

1. Arenas R. Dermatología, atlas, diagnóstico y tratamiento. México: Editorial Mc Graw-Hill, 1989:445-449.
2. Neghme A. Parasitología clínica. 2a.ed. Santiago:Publicaciones técnicas mediterráneo,1985:223-237.
3. Faust CE, Farr RP, Clifton JR. Parasitología clínica. Barcelona: Editorial Salvat, 1984: 10-18,69-92.
4. Velasco CO, Guzmán BC, Cruz RJ, González DF. Las Leishmaniasis, con especial referencia a México. México:Publicación técnica del INDRE, 1991: No. 7. México:56 pp.
5. Lucha contra las Leishmaniasis.(1990). WHO. Tech. Rep. Ser.
6. Tropical disease reserch: progress 1991-92. 1993, WHO 11th programme report.
7. Bates PA.The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol 1994; 79:215-218.
8. Infectología (libro).
9. Kwang-Poo Ch, Gautam C, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Annu Rev Microbiol 1990; 44:499-529.
10. Mallison DJ, Coombs GH. Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana mexicana*. Parasitology 1989; 98:7-15.
11. Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. Am J Trop Med Hyg 1989; 41(6): 687-725.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA.



12. Laison R. The American Leishmaniasis some observations on there ecology and epidemiology . Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;77:569-96.
13. Biagi F. Enfermedades parasitarias.2a.edición.México:Prensa medica mexicana, 1986:149-58.
14. Kreutzer RD, Yemma JJ, Grogl M, Tesh RB, Martin IT. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Am J Trop Med Hyg 1994; 51 (3): 301-7.
15. Warburg A, Saraiva E, Lanzaro CG, Titus GR, Neva F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Phil Trans R Soc Lond 1994; 345:223-230.
16. Travi BL, Osorio Y, Saravia NG. The infammatory response promotes cutaneous metastasis in hamsters infected with *Leishmania (viannia) panamensis*. J. Parasitol-1996; 82 (3): 454-57.
17. Balta PJ, Ward MW, Tomkins AM. Do leishmania serotypes .mimic human blood group antigens Lancet 1981; feb 28:505-6.
18. Moll H. Las células epidérmicas de Langerhans son importantes para la inmunorregulación de la leishmaniasis cutánea. Immunol Today 1993; 14(8):383-386.
19. Locksley MR, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis:induction, expansion and effector function. Immunol Today 1991; 12:A58-A61.
20. Milon G, Del Giudice G, Louis JA. Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. Parasitol Today 1995; 11(7):244-247.
21. Janice T. Inmunidad frente a protozoos y helmintos en Inmunología. Roitt,Bradstoff J; Male D, editores). Masson-Salvat. España 1994:16.1-16.21.

22. Scott P. T-Cell subsets and T-cell antigens in protective immunity against experimental leishmaniasis. En: Kaufmann HE. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1990; 155:35-52.
23. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. Int J Exp Path 1994; 75(4):277-284.
24. J Leuk Biol 1990; 47(2):187-193.
25. Sells PG, Perkins LD. Lymphocyte transformation in cutaneous leishmaniasis patients. Ann Trop Med Parasitol 1987; 81: 105-116.
26. Corradin SB, Mauel J. Phagocytosis of *Leishmania* enhances macrophage activation by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide 1991; 146 (1): 279-85.
27. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. J Immunol 144(1): 278-283.
28. Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunol Today 1991; 12(8):256-257.
29. Liew FY. Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. Immunol Today 1989; 10 (2):40-45.
30. Raziuddin S, Abdalla RE, El-Awad EH, Al-Janadi M. Immunoregulatory and proinflammatory cytokine production in visceral and cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis 1994; 170:1037-1040.
31. Liew FY. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. En: Kaufmann HE. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1990; 155.

32. Heinzel FP, Rerko MR, Ahmed F, Pearlman E. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol* 1995; 155:730-739.
33. Mosmann TR, Cherwinski H, Bonol MW, Giedlin MA, Coffman RI. Two types of murine helper clone: I. identification according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 136:2348-2357.
34. Aebischer T. Recurrent cutaneous Leishmaniasis: a role for persistent parasites. *Parasitol Today* 1994; 10 (1): 25-27.
35. Moll H. Las células epidérmicas de Langerhans son importantes para la inmunorregulación de la leishmaniasis cutánea. *Immunol Today* 1993; 14(8):383-386.
36. Pearson DR. Pathology of leishmaniasis, en *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. Kennet Sw editores). Blackwell Scientific Publications Inc. 1993; 71-79.
37. Anthony RL. Microenzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of new world leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:190-4.
38. Ridley DS, Marsden PD. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in brazil and its clinical evaluation. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1980;29:183-189.
39. Peterson EA, Neva FA. Specific inhibition of lymphocyte, proliferation response by adherent suppressor cell in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 1982; 306:287-392.
40. Velasco Co. Las Leishmaniasis en México. *Rev Latinoamer Microbiol* 1987;29:119-126.

41. Esterre P, Dedet PJ. The relationship of blood-group type to american cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1989;83(2):427-239.
42. Mushel LH. Blood groups,disease and selection. *Bacteriological Reviews* 1966;30(2):427-439.
43. Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and Leishmaniasis 1990;43(6): 650-56.
44. Alexander B, Cadena H, Usma MC, Rojas CA. Laboratory and field evaluations of a repellent soap containing diethyl toluamide (DEET) nd permethrin against Phlebotomine sand flies (diptera: psychodidae) in valle del cauca, colombia. A., *J Trop Med Hyg* 1995; 52(2): 169-73.
45. Modabber F. Development of vaccines against Leishmaniasis. *Scand J Infect Dis* 1990; 76 (suppl):72-78.
46. Greenblatt CL. The present and future of vaccination for cutaneous Leishmaniasis. News development with human and veterenary vaccines. *Prog Clin Biolog Res* 1980;47:259.
47. Modabber F.Experiences with vaccines against cutaneous Leishmaniasis:of men and mice. *Parasitology* 1989;98:549-560.
48. Mayrink W, Williams P, Da Costa CA. An experimental vaccine against american dermal Leishmaniasis: experience in the state of Espirito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1985; 79:259-269.
49. Dwyer DM. Lectin binding saccharides on a parasite protozoan. *Science* 1974; 184:471-473.

50. Weller BI, Simmons PD, Ivanyi L. Identification of immunodominant antigens of *Candida albicans* in patients with superficial candidosis. Clin Immunol Immunopath 1990; 54: 347-53.
51. Lehninger AL. Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular, 2a.ed. Ediciones Omega. Barcelona España 1990:280, 161-185.
52. Damjanov Y. Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Inv 1987;57:5-20.
53. Dulaney JT. Binding interactions of glycoproteins with lectins. Mol Cell Biochem 1979;21:43-63.
54. Lowry DH, Rosenbluet NJ, Fair AL, Randall RJ. Biol Chem 1951; 193:265.
55. Venkatesan P, Waqkelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today 1993;9(6):228-232.
56. Nieto A, Carbonetto CH. Enzimoimmunoensayo, en Inmunología e inmunoquímica. (Margni AR, editor).Panamericana. Buenos Aires; 1990; 571-586.
57. Marques de Cantú MJ. Probabilidad y estadística. México:McGraw-Hill, 1991:361-71.
58. Aguilar TF. Reactividad cruzada, un problema de inespecificidad en el serodiagnóstico de la leishmaniasis cutánea. Universidad e Investigación Biomédica. 1992;1(1):22-29.
59. Thall A, Galili U. Distribution of Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1, 4GlcNac residues on secreted mammalian glycoproteins (thyroglobulin, fibrinogen, and immunoglobulin G) as measured by a sensitive solid-phase radioimmunoassay. Biochemistry 1990; 29:3959-3965.

60. Galili U, Swason K. Gene sequences suggest inactivation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 7401-4.