

# ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SERICAS EN LA INFECCION EXPERIMENTAL CON *LEISHMANIA MEXICANA* \*

Silvia Molina, \*\* Jorge Fonseca \*\*\*

**Key Words:** Leishmaniasis, electrophoresis of proteins, humoral response.

## RESUMEN

*En los grupos de animales, uno susceptible y el otro resistente a la infección experimental con Leishmania mexicana, se analizaron semanalmente los patrones electroforéticos séricos obtenidos durante el transcurso de la infección, por un período de 11 semanas. En ambos grupos, se observó un aumento en la banda de las gamma globulinas a partir de la segunda semana después de la inoculación, conservando niveles más elevados hasta la finalización del estudio. Al comparar los resultados con los controles, se presentaron incrementos de más de un 100% en la concentración de la mencionada globulina. Estadísticamente, el aumento en esta banda reveló una correlación entre el desarrollo de la lesión y el número de células plasmáticas cuantificadas en los cortes histológicos. La determinación de las otras fracciones no aportó diferencias significativas. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1994; 15(1,2): 15-18).*

\* Trabajo presentado en el II Congreso Centroamericano de Parasitología y Medicina Tropical. San José, Costa Rica, 5-8 mayo de 1993.

\*\* Escuela de Medicina. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\*\* Departamento de Inmunología Clínica. Hospital México. San José. Costa Rica.

## INTRODUCCION

*Leishmania mexicana* es uno de los agentes de la leishmaniasis cutánea en América (5). Este protozoo flagelado presenta un ciclo de vida diheteroxeno, utilizando como huésped vertebrado a gran cantidad de mamíferos, incluso al hombre, y como huéspedes invertebrados, a los mosquitos hembras del orden Diptera, Familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae (11). En el vertebrado, el parásito se reproduce dentro de los fagolisosomas de los macrófagos localizados en el sitio de la lesión, sin que al parecer ocurra diseminación a otros territorios. Algunos investigadores han mencionado el hecho de que *L. mexicana* es muy susceptible a temperaturas superiores a los 36 °C, por lo que es improbable que ocurra una visceralización del parásito (6).

Se ha informado la determinación de un aumento leve en la banda de las gamma globulinas (3); esto contrasta con las llamativas hipergammaglobulinemias que se presentan en las leishmaniasis viscerales (7).

En el presente estudio, se analizaron las diferentes fracciones proteicas obtenidas durante los corridos electroforéticos del suero de animales susceptibles y resistentes al parásito. Esto se hizo con la finalidad de determinar si se presentan alteraciones en las diversas bandas durante el transcurso de la infección experimental con *L. mexicana*.

## MATERIAL Y METODOS

Un total de 85 ratones blancos machos (*Mus musculus*) y 85 hamsters hembras (*Mesocricetus auratus*) fueron inoculados en la región nasal con una cepa virulenta de *L. mexicana* (cepa O-CR) en una concentración de  $10^6$  promastigotos / 0,1 cc en fase estacionaria (10). Como testigos, se inocularon 5 ratones y 5 hamsters con una dosis similar a la utilizada en la infección experimental, pero con promastigotos muertos por congelación.

Semanalmente se sangraron de corazón un grupo de 5 animales, por un período de 11 semanas. Al suero obtenido, se le realizó una electroforesis de proteínas utilizando cintas de acetato de celulosa con amortiguador de barbital (pH 8,6) y un voltaje de 200 V durante 20 minutos. Posteriormente, se tiñeron con Ponceau y se transparentaron con ácido acético al 5%. La lectura densitométrica se realizó en un integrador computarizado (Appraire Junior Densitometer - Beckman) analizándose las bandas obtenidas y su concentración en los diferentes períodos de la infección (2).

En el análisis estadístico se realizó un estudio de variancia, complementándose con una prueba T-Student para establecer diferencias significativas entre los parámetros analizados (4).

## RESULTADOS

Los valores obtenidos en las fracciones correspondientes a la albúmina, alfa globulinas y beta globulinas en hamsters y ratones, no aportaron diferencias importantes en relación con los animales utilizados como controles, en tanto que la banda de las gamma globulinas sí mostró un aumento a partir de la segunda semana de infección con variaciones en su concentración dependiendo del animal. En los ratones, los valores más elevados correspondieron a los obtenidos durante la séptima semana de infección, en que se dio un incremento hasta de un 193,75% (1,55 mg/dl) en relación con la concentración nor-

mal de esta proteína (0,80 mg/dl). Por otro lado, en los hamsters, los mayores aumentos se observaron en el transcurso de la cuarta semana con un 146,6% (1,10 mg/dl) y la novena semana con un 106,6% (0,80 mg/dl) en comparación con el grupo testigo (0,75 mg/dl) (Figura 1).

En ambos animales, el incremento en la fracción gamma globulínica coincidió con el desarrollo de la lesión cutánea y una mayor concentración de células plasmáticas en los cortes histológicos.

En el análisis de variancia realizado a los diferentes parámetros no se encontró una diferencia significativa en relación al tipo de animal ( $P > F = 0,2052$ ) pero sí en relación al tiempo de infección ( $P > F = 0,0015$ ).

## DISCUSION

En la leishmaniasis cutánea se ha comprobado la existencia de anticuerpos, los cuales "in vitro", ejercen un poder usante sobre los promastigotos en presencia de complemento, promoviendo la fagocitosis de promastigotos y amastigotos (8). "In vivo", las evidencias demuestran que los anticuerpos tienen poca importancia en el control de la infección, siendo la respuesta celular la pieza fundamental en la destrucción del parásito (8,9). Pocos estudios hacen mención de las clases de anticuerpos que se producen durante las infecciones leishmaniásicas, revelando que las que se producen principalmente son del tipo Ig G y en especial de los isotipos 1 y 3, en algunos casos Ig E o Ig A (1). En la leishmaniasis visceral, se encuentran altos niveles de anticuerpos circulantes, la mayoría inespecíficos e incapaces de conferir protección (7).

El haber obtenido en nuestros resultados un aumento en la fracción de las gamma globulinas indica la posible formación de anticuerpos específicos dirigidos contra el parásito; este hallazgo estaría en concordancia con estudios de otros investigadores que previamente reportaron un aumento de estas proteínas, de las cuales su título parece estar relacionado con la dosis utilizada en la inoculación (12).

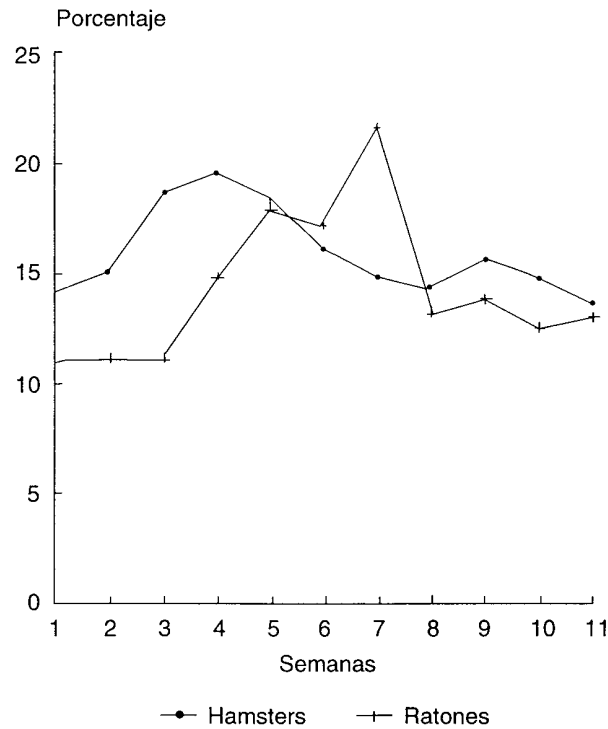


Fig. 1. Patrón de las gamma globulinas en hamsters y ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

Al realizar el análisis estadístico de los valores obtenidos en las diferentes bandas electroforéticas, se encontró una correlación entre el aumento de las gamma globulinas con el desarrollo de la lesión y la concentración de células plasmáticas en los cortes histológicos; cuando se dieron las concentraciones más significativas de gamma globulinas, tanto en los *hamsters* como en los ratones, existió un mayor crecimiento de la lesión y una mayor cantidad de células plasmáticas.

Al comparar el incremento en la banda de las gamma globulinas, tanto en animales susceptibles al parásito como en los resistentes a él, se comprueba el hecho de que los anticuerpos tienen un papel secundario en la respuesta defensiva del huésped.

#### ABSTRACT

*Serum electrophoretics patterns in resistant animals susceptible and resistant to the experimental infection with Leishmania mexicana were analysed weekly for a period of eleven weeks. In both groups animals an increase in gamma globulin bands was discovered two weeks after inoculation, with higher levels than those in control animals. Statistically the increase in this band correlated with the development of the lesion and the amount of plasma cells in histological smears. The other fractions did not showed significant differences.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Avila, J. L.; Rojas, M.; García L.: Persistence of elevated levels of galactosyl-(1-3) galactose antibodies in sera from patients cured of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26(9): 1842-1847.
2. Barrantes, A.; Schosinsky, K.; Sáenz, G.; *et al.*: Nociones de Inmunología Clínica. Universidad de Costa Rica. 1977: 56.
3. Bogdan, C.; Stosiek, N.; Fuchs, H.; *et al.*: Detection of potentially diagnostic leishmanial antigens by Western Blot analysis of sera from patients with Kala-azar or multilesional cutaneous leishmaniasis. *J. Inf. Dis.* 1990;162:1417-1418.
4. Daniel, W. W.: Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa 1987; 188-196.
5. Garnham, P. C.C.: Introduction. In Peters W. Killick-Kendrick eds. The Leishmaniases in Biology and Medicine. Academic Press. 1987; 1: XIII -XXV.
6. Hayatee, Z. G.: Effect of environmental temperature on cutaneous leishmaniasis diffusa in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1970; 64:17.
7. Hviid, L.; Sorensen, A. L.; Kharazmi, A.; *et al.*: Functional and phenotypic changes in human lymphocytes after cocubation with *Leishmania donovani* in vitro. *Infect. Immun.* 1990; 58(10): 3163-3167.
8. Liew, F. W. Regulation of cell-mediated immunity in cutaneous leishmaniasis. *Inmunol. Letters* 1987; 16: 321-328.
9. Liew, F. Y.: Cell-mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today.* 1986; 2(10): 264-270.
10. Sacks, D. L.; Perkins, P. V.: Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigote. *Science.* 1984; 223: 1417- 1419.
11. Wright, E. P.; El Amin, E. R. M.: *Leishmania* infection: Surfaces and immunity. *Biochem. Cell. Biol.* 1989; 67: 525-536.
12. Yates, J. A.; Saliba, E. K.; *et al.*: Course of infection and humoral response to *Leishmania major* in inbred meriones inguiculatus. *J. Parasitol.* 1989; 75 (6): 942-945.