
Determinación de la especificidad de IgA sérica producida en respuesta a antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* en leishmaniosis murina.

Mary Carmen Pérez-Aguilar¹, Oskarina Hernández¹, Zulay Maizo de Segnini¹, Carmen Haydee Rojas¹, Silverio Díaz¹, Maritza Alarcón², Loredana Goncalves¹.

¹Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR) y

²Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Palabras clave: Leishmaniosis, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, respuesta inmune, antígenos parasitarios, IgA.

Resumen. En la leishmaniosis experimental, la función de los anticuerpos no está completamente clara, ya que algunos autores consideran que dichas proteínas no participan en la protección contra la infección; sin embargo, estudios histopatológicos en lesiones con leishmaniosis humana y experimental, muestran infiltrados de células plasmáticas positivas para IgA y secreción de IgM, IgG e IgA que podrían mediar la formación de complejos inmunológicos con antígenos parasitarios o propios, favoreciendo la necrosis lo que conlleva a la eliminación del parásito. En este trabajo se determinó si la IgA sérica en el modelo murino posee reactividad específica contra antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* de utilidad diagnóstica. Para ello, se utilizaron ratones susceptibles y resistentes a leishmaniosis cutánea, demostrándose mediante ELISA indirecta que la IgA sérica de ratones susceptibles es elevada en comparación con la producida por ratones resistentes. Aunque otros estudios en modelos murinos demuestran que la IgG sérica de ratones infectados con *L. (L) mexicana* presenta reactividad cruzada con antígenos parasitarios no relacionados obtenidos de *Trypanosoma cruzi*, al analizar la especificidad de IgA por antígenos de *L. (L) mexicana* y *T. cruzi*, mediante Western Blot, se demostró que la IgA sérica de ratones infectados con *T. cruzi* también reaccionan con antígenos de *L. (L) mexicana*, estos hallazgos sugieren que la IgA puede ser útil para el manejo clínico y pronóstico de la enfermedad.

Determination of the specificity of seric IgA produced in response to antigens of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in murine leishmaniasis.

Invest Clin 2011; 52(3): 216 - 229

Key words: Leishmaniasis, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, immune response, parasite antigens, IgA.

Abstract. In experimental leishmaniasis, the role of antibodies is not entirely clear, as some authors consider that these proteins are not involved in protection against infection. However, histopathological studies in human and experimental leishmaniasis lesions, show plasma cell infiltrates positive for IgA and secretion of IgM, IgG and IgA could mediate the formation of immune complexes with parasite antigens or self components, favoring necrosis leading to the elimination of the parasite. In this study, we determined if the serum IgA in the murine model has specific reactivity against antigens of *Leishmania (Leishmania) mexicana* of diagnostic utility. To do this, we used mice either susceptible or resistant to cutaneous leishmaniasis, and demonstrated by indirect ELISA that serum IgA is elevated in susceptible mice compared with that produced by resistant mice. Although other studies in murine models show that the serum IgG from mice infected with *L. (L) mexicana* present cross reactivity with unrelated parasite antigens derived from *Trypanosoma cruzi*, the analysis of the specificity of IgA by antigens of *L. (L) mexicana* and *T. cruzi*, by Western Blot, showed that the IgA serum of mice infected with *T. cruzi* reacts too with antigens of *L. (L) mexicana*. These findings suggest that IgA may be useful for the clinical management and prognosis of the disease.

Recibido: 05-01-2011. Aceptado: 28-04-2011

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniosis cutánea (LC), es causada por un protozooario hemoflagelado del género *Leishmania*, perteneciente a la familia Trypanosomatidae y es una de las tres manifestaciones clínicas de la leishmaniosis, la cual tiene una amplia distribución en el mundo, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una prevalencia mundial de aproximadamente 14 millones de casos con una incidencia anual de 1,5 a 2 millones de nuevos casos para LC (2). En Venezuela, es

considerada una enfermedad ocupacional, ya que afecta principalmente a las personas que trabajan en zonas boscosas, entre ellos: agricultores, ganaderos, cazadores y personal militar. Las entidades con mayor número de casos registrados en el país son Táchira, Mérida, Trujillo (56%) y el estado Bolívar, con una incidencia de la infección de un 45% (3).

El parásito *Leishmania* ha sido ampliamente utilizado en los modelos experimentales para comprender la generación, mantenimiento e insuficiencia de la respuesta inmune subyacentes a la resistencia y la susceptibilidad a la infección. Los resulta-

dos clínicos de la infección por *Leishmania* dependen de la especie infectante y el estado inmune del hospedador. En este sentido, la mayoría de las personas expuestas al parásito nunca desarrollan la enfermedad manifiesta (4). La descripción de la función de las moléculas efectoras de la respuesta inmune en modelos experimentales puede aportar información tanto para el diseño y evaluación de vacunas y terapias contra la leishmaniosis; así, también como para su diagnóstico preciso, haciendo énfasis para su posterior estudio de la enfermedad humana.

En referencia a la respuesta inmune humoral, las células B y los anticuerpos no son generalmente considerados de gran importancia en la inmunidad protectora contra la *Leishmania*, debido a que los anticuerpos no son efectivos para destruir el parásito dentro de la vacuola parasitófora y la producción de anticuerpos con el fin de mediar la cura inmune de la infección cutánea (4).

Los altos niveles de anticuerpos específicos contra *Leishmania* son observados en pacientes con Leishmaniosis Visceral (LV) y otras formas graves de la enfermedad, acumulando pruebas de que las células B y los anticuerpos se correlacionan con la patología (5). Por otra parte, la función reguladora de las células B ha sugerido en un modelo de LV que estas células B se encuentran disminuidas en animales con extensa patología mediada por neutrófilos (6). Sin embargo, aunque la función en cuanto a pronóstico, seguimiento y diagnóstico de los isotipos de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA han sido ampliamente estudiados, todavía hay mucho que comprender sobre la función de los anticuerpos en la leishmaniosis y no debe descartarse que ciertos anticuerpos puedan contribuir a la protección y al diagnóstico.

Muchas de las proteínas de los parásitos del género *Leishmania* generan una

fuerte respuesta inmune humoral durante la LC; sin embargo, el diagnóstico específico de la enfermedad por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) o ensayos de Western Blot en humanos, no ha sido desarrollado y existen muy pocos antígenos con un valor diagnóstico potencial, a pesar de ser utilizados en los estudios serológicos (7).

La presencia de IgA en las lesiones de pacientes con leishmaniosis, no es del todo clara ya que podría estar asociada a la propia infección por *Leishmania*, a otras patologías que cursen con la infección o a la generación de autoanticuerpos (8). Se ha referido ampliamente la presencia de depósitos intercelulares de IgA en la epidermis y en la unión entre la dermis y la epidermis en una amplia variedad de patologías dérmicas localizadas como: dermatitis herpetiforme, dermatosis bulbosa, pénfigo (9,10) y en patologías sistémicas con manifestaciones dérmicas como en el lupus eritematoso sistémico (11, 12). No obstante, diversos estudios señalan que la IgA se correlaciona positivamente con el estatus clínico de la LV; además de ser considerada un marcador pronóstico de dicha infección, ya que se presenta en altas concentraciones en el estado sintomático de la enfermedad (13, 14).

El estudio y la comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos responsables de la presencia de abundantes células plasmáticas e IgA que forman complejos con antígenos parasitarios en infiltrados de lesiones humanas y experimentales (14), sugieren que la respuesta inmune humoral podría influir en la eliminación del parásito y en la patogenia de la lesión. Es por ello, que en este estudio nos propusimos determinar si los antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* reaccionan específicamente *in vitro* con la IgA sérica producida en modelos murinos susceptibles y resistentes producto de la infección parasitaria cutánea. Este enfoque representa el paso

inicial para seleccionar y purificar antígenos específicos del parásito que permitan desarrollar ensayos inmunoenzimáticos más sensibles y específicos con gran valor para el diagnóstico y la epidemiología de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizaron amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, mantenido en nuestro laboratorio mediante pasajes sucesivos en hámsters (*Miscricetus auratus*) y tripomastigotes sanguícolas del aislado Elpidio Padrón (EP) de *Trypanosoma cruzi* mantenido en ratones NMRI (*Mus musculus*).

Animales

47 ratones hembras de la cepa BALB/c y 42 de la cepa C57BL/6 de 9 semanas de edad fueron obtenidos del Bioterio Central de la Universidad de los Andes (BIOULA). 23 ratones BALB/c y 23 C57BL/6 fueron infectados con *L. (L) mexicana*. Como control negativo se utilizaron 19 BALB/c y 19 C57BL/6 y como grupo de estudio para reacción cruzada 5 BALB/c infectados con tripomastigotes sanguícolas de *T. cruzi*. Los animales utilizados en este estudio fueron manipulados según los principios de la APS (American Physiological Society) en cuanto al cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el Instituto Nacional de Salud de los EE.UU y siguiendo el protocolo de manejo de animales experimentales planteado por el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología (Venezuela).

Infección experimental de modelos murinos

Los cultivos de promastigotes de *L. (L) mexicana* fueron crecidos en medio LIT hasta alcanzar DO_{600nm} de 0,8. Los parásitos fueron posteriormente incubados a 32°C

hasta la verificación por microscopía óptica del cambio morfológico a la forma redondeada del parásito y a la ausencia de flagelos en la mayoría de las células del cultivo (amastigotes-like). El volumen total del cultivo fue centrifugado a 2000g durante 20 minutos, el pellet fue lavado tres veces en solución salina estéril. Seguidamente se hizo el conteo de parásitos en cámara de Neubauer y se diluyó en solución salina estéril hasta obtener 2×10^6 parásitos/mL, que se inocularon por vía subcutánea en la pata posterior derecha de ratones BALB/c y C57BL/6.

El grupo experimental de reacción cruzada se inoculó por vía intraperitoneal con 2×10^6 parásitos/mL de *T. cruzi*.

Evolución de la lesión y obtención de las muestras

El tamaño de las lesiones fue estimado a partir de la primera semana post-infección, midiendo la pata infectada del animal y la pata contralateral sana con un calibrador Drapper SM-112 (1 vez a la semana durante 60 días). Al cabo de este período se tomó 1 mL de sangre de los ratones por punción cardíaca, a fin de obtener suero mediante centrifugación a 500g por 15 minutos. El suero separado fue almacenado a -20°C hasta su utilización en los ensayos de ELISA y Western blot.

Aislamiento de parásitos de *L. (L) mexicana*

Los parásitos fueron aislados al final de la fase logarítmica de crecimiento. Para ello, los promastigotes cultivados *in vitro*, fueron lavados 5 veces con solución amortiguadora estéril a 0,1 M y centrifugados a 2000g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento final se contó en cámara de Neubauer a una dilución 1:100, ajustándose a una concentración de 2×10^7 parásitos/mL y se almacenó a -70°C hasta su utilización en la preparación de antígenos.

Fracionamiento subcelular

Las alícuotas de parásitos fueron solubilizadas a razón de 1×10^9 parásitos/mL en 2 mL de amortiguador de lisis (0,225 M de sacarosa, 20 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 1 mM Na_2EDTA , 20 mM Tris Base) a pH 7,2, 4°C y posteriormente centrifugadas a 3000g durante 30 minutos. El sedimento fue resuspendido con amortiguador de lisis en presencia de inhibidores de proteasas (pestatina 1 μM , antipaina 0,2 μM , leupeptina 10 μM , PMSF 50 μM , benzamidina 1mM, inhibidor de tripsina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a razón de 5 mL por cada 20g de extracto celular, posteriormente fue sometido a 5 ciclos de sonicación de 30 segundos c/u con intervalos de 5 minutos de descanso entre cada ciclo a 4°C (15).

El homogeneizado obtenido fue incubado con amortiguador de lisis a 4°C durante 30 minutos y los lisados se centrifugaron a 4°C a 150g durante 3 minutos para obtener antígenos solubles, el sobrenadante fue sometido a centrifugación diferencial para obtener las distintas fracciones antigénicas: núcleos y parásitos enteros a 1500g durante 10 minutos, fracción granular gruesa a 6000g durante 10 minutos, fracción rica en glicosomas a 45000g por 20 minutos, fracción citosólica y microsomal a 105000g durante 2 horas.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Lowry (16), utilizando la albúmina de suero bovino (BSA) como el estándar para establecer la curva de calibración.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Los antígenos solubles obtenidos por lisis celular de promastigotes de *Leishmania* cultivados *in vitro* y aislados en la fase logarítmica de crecimiento, fueron utilizados para sensibilizar las placas de fondo plano (2×10^7 parásitos/mL).

Para la detección de IgA específica contra *L. (L) mexicana*, se emplearon como anticuerpos primarios sueros de ratones BABL/c y C57BL/6 con Leishmaniosis cutánea y sueros de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (diluidos en PBS-Tween-caseína desde 1:30 hasta 1:7680). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-IgA de ratón y anti-IgG de ratón conjugados a Peroxidasa (HRP) y diluidos 1:2000 en PBST. El valor de corte mínimo de confianza fue establecido tomando en cuenta el promedio de los valores de absorbancia de los controles más dos desviaciones estándar (DS).

Análisis electroforético de proteínas

Los componentes antigénicos del parásito se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (17).

Los sobrenadantes de cada fracción antigénica se calentaron a 95°C durante 3 minutos en presencia de un amortiguador de muestra en frío (2,5 mL de SDS al 20%, 2,5 mL de Tris 0,2 M, EDTA 0,02 M, 5 mL de glicerol al 37%, 2,5 mL de azul de bromofenol al 10%, 7,5 mL de agua destilada y 50 mL de 2-mercaptoetanol). En cada pozo del gel se colocaron 45 μL de las muestras, ajustándose la concentración a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una de las muestras y 15 μL del marcador de peso molecular precoloreado de amplio rango (Gibco BRL Bench Merck). Los geles se sometieron a una corrida electroforética en una cámara Electro-Eluter BioRad modelo 422, a 60 V durante 1 hora. Finalmente, los geles fueron teñidos con 0,25% de azul de Coomassie R-250, 45% de metanol y 7,5% de ácido acético glacial y se decoloraron con 25% de metanol y 7,5% de ácido acético glacial para la visualización de las bandas.

Determinación del peso molecular de las proteínas

Los marcadores de peso molecular se analizaron por SDS-PAGE junto con las fracciones de *L. (L) mexicana* y se obtuvo para cada gel la curva de calibración correspondiente. Estas curvas de calibración se establecieron utilizando el logaritmo del peso molecular de los estándares contra la distancia recorrida en el gel en centímetros. Los pesos moleculares de las proteínas de *Leishmania* se estimaron por interpolación en la gráfica de calibración obtenida con los marcadores de peso molecular conocido.

Western Blot (WB)

Luego de la separación electroforética por SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Polyvinylidene difluoride) (18, 19). Como anticuerpo primario se utilizó suero de ratón infectado con *L. (L) mexicana* diluido 1:300 en TBS-BSA al 3% y como anticuerpo secundario anti-IgA y anti-IgG conjugados a Peroxidasa (HRP) diluidos 1:2000. Como control negativo y control de especificidad del anticuerpo secundario se utilizaron sueros de ratones BALB/c y C57BL/6 sanos.

Análisis estadístico

Los resultados son presentados en promedios \pm el error estándar (EE). Se realizó un ANOVA de una vía y el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar y es-

tablecer si existían diferencias significativas entre los grupos, considerando como estadísticamente significativo valores $p < *0,05$; $**0,01$; $***0,001$. Los análisis fueron realizados utilizando el programa SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc. Chicago, IL) y el software GraphPad (GraphPad Prism versión 5.0, San Diego, C.A).

RESULTADOS

El tamaño de las lesiones en los ratones BALB/c cuya característica es de susceptibilidad y C57BL/6 resistentes infectados con *L. (L) mexicana*, fue estimado a partir de la primera semana post-infección, midiendo la pata del animal con un calibrador Drapper SM-112, 1 vez a la semana y durante 60 días. En ambas cepas de ratones, se observó incremento progresivo de las lesiones a medida que evolucionaba el período de infección. No obstante, se observó aumento significativo del tamaño de la lesión a partir de la quinta semana post-infección en el grupo de ratones BALB/c ($2,93 \pm 0,44$) en comparación con el grupo de ratones C57BL/6 ($2,35 \pm 0,17$) hasta la séptima semana post-infección ($5,31 \pm 0,30$ y $2,81 \pm 0,09$) respectivamente (Tabla I).

Para evaluar los títulos de IgA sérica, se realizó la técnica de ELISA en muestras de suero de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados y no infectados frente a parásitos enteros y proteínas totales de *L. (L) mexi-*

TABLA I
TAMAÑO DE LA LESIÓN EN RATONES BALB/c y C57BL/6 INOCULADOS
CON *Leishmania (Leishmania) mexicana*

Ratones	Semanas post-infección						
	1	2	3	4	5	6	7
BALB/c	1,67 \pm 0,06	1,74 \pm 0,10	1,90 \pm 0,14	2,31 \pm 0,33	2,93 \pm 0,44*	3,42 \pm 0,51*	5,31 \pm 0,30**
C57BL/6	1,68 \pm 0,04	1,87 \pm 0,06	1,96 \pm 0,07	1,98 \pm 0,04	2,35 \pm 0,17*	2,65 \pm 0,11*	2,81 \pm 0,09**

Los resultados son expresados en promedios \pm el error estándar (valores en mm). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto al tamaño de la lesión en la primera semana post-infección de ratones BALB/c y C57BL/6.

cana a partir de diluciones seriadas de 1:30 a 1:7680, observándose títulos de IgA hasta una dilución 1:3840 en el caso de proteínas totales y parásitos enteros para ratones BALB/c (Tabla II).

Los sueros de los ratones BALB/c infectados con *L. (L) mexicana*, revelaron la presencia de IgA en un 100%, presentando valores de densidad óptica superiores al punto de corte (valor de corte mínimo de confianza = 0,209). Los títulos de IgA frente a parásitos enteros de *L. (L) mexicana* fueron superiores ($0,625 \pm 0,13$) al ser comparados con los sueros de los ratones controles sanos ($0,229 \pm 0,014$), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Adicionalmente, se valoró la presencia de IgA reactiva a proteínas totales de *L. (L) mexicana*, observándose el mismo resultado para los sueros de ratones infectados ($0,786 \pm 0,068$) y sanos ($0,256 \pm 0,054$). En los sueros de ratones C57BL/6 infectados, los valores de reactividad de IgA frente a parásitos enteros presentó títulos de $0,337 \pm 0,093$, mientras

que en el caso de proteínas totales fue de $0,223 \pm 0,049$. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, ni con respecto a los grupos control para parásitos enteros ($0,243 \pm 0,023$) y proteínas totales ($0,429 \pm 0,019$) (Fig. 1A y 1B).

Igualmente, fueron evaluados los títulos de IgG frente a parásitos enteros de *L. (L) mexicana*, donde el análisis estadístico reveló un aumento significativo ($p < 0,001$) en los títulos de IgG presentes en los sueros de ratones BALB/c ($1,704 \pm 0,207$) en comparación con los títulos de IgG presente en los sueros de ratones C57BL/6 infectados ($0,401 \pm 0,094$). La evaluación de los títulos de IgG frente a proteínas totales del parásito, reveló diferencias significativas entre los sueros de ratones BALB/c ($1,746 \pm 0,109$) y los sueros de ratones C57BL/6 ($0,435 \pm 0,059$) (Figs. 1A y 1B).

Debemos destacar que no se evaluó la presencia de IgG por técnicas de Western Blot en la infección experimental por *L. (L) mexicana*, aun cuando se conoce que la respuesta de IgG es mayor, existiendo por lo

TABLA II
TÍTULOS DE IgA EN SUEROS DE RATONES BALB/c y C57BL/6 INOCULADOS
CON *Leishmania (Leishmania) mexicana*

Dilución	BALB/c PE	BALB/c PT	C57BL/6 PE	C57BL/6 PT
1:30	0,876	0,887	0,271	0,452
1:60	0,775	0,883	0,259	0,427
1:120	0,702	0,782	0,235	0,425
1:240	0,618	0,776	0,223	0,373
1:960	0,623	0,775	0,214	0,365
1:1920	0,574	0,763	0,215	0,289
1:3840	0,432	0,758	0,187	0,242
1:7680	0,417	0,661	0,183	0,125

Estos valores se calcularon tomando en cuenta: DO para CP de ratones BALB/c= 0,625; DO para CP de ratones C57BL/6= 0,223; DO para CN de ratones BALB/c= 0,256; DO para CN de ratones C57BL/6= 0,169; valor de corte mínimo de confianza para PE (0,229) y para PT (0,213).

Los resultados son expresados en promedio (valores de DO), PE (parásitos enteros), PT (proteínas totales), CP (Control positivo), CN (Control negativo).

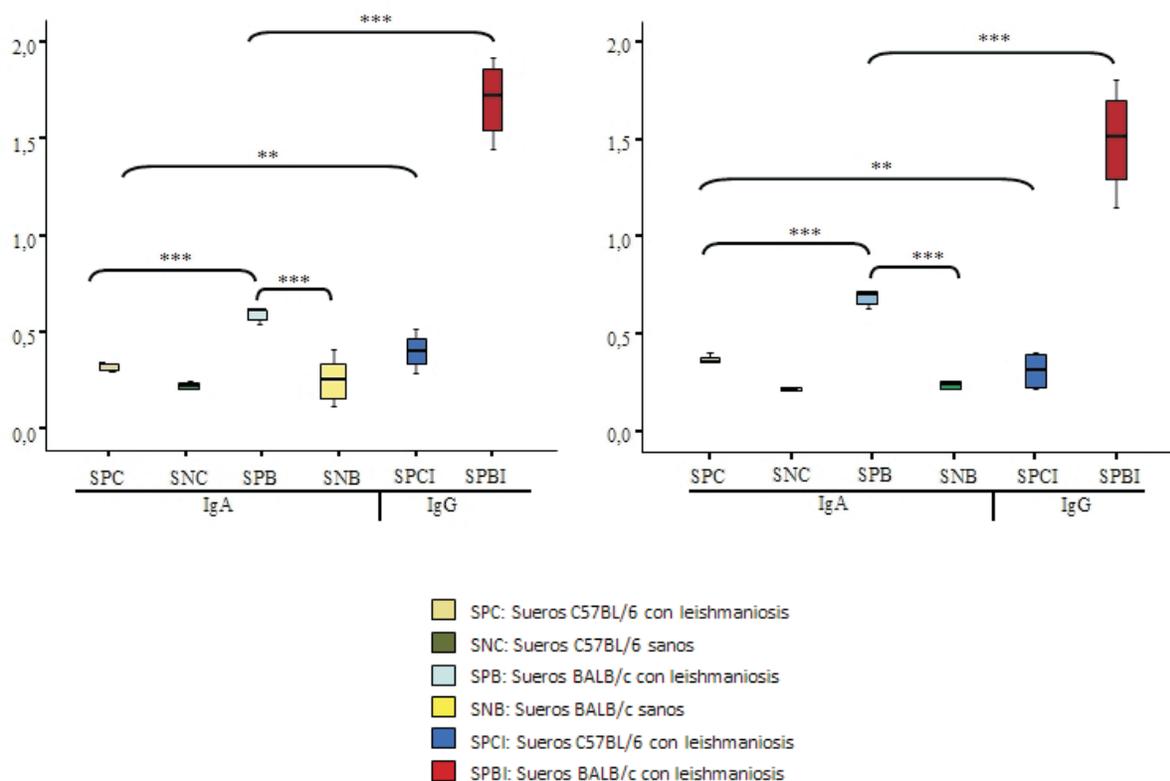


Fig. 1. Títulos de IgA e IgG en sueros de ratones BALB/c y C57BL/6 sanos e infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana* AZV (en valores de DO). (A) Títulos de IgA e IgG frente a parásitos enteros. (B) Títulos de IgA e IgG frente a proteínas totales. Los resultados son expresados en promedios \pm el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

tanto gran cantidad de antígenos capaces de inducir la producción de IgG, ya que ha sido descrito en gran cantidad de trabajos y probado anteriormente por nosotros que la IgG sérica producida durante la infección genera reacciones muy variadas, no reproducibles e inespecíficas a antígenos relacionados y no relacionados a parásitos de la Familia Trypanosomatidae, por lo que la reacción con IgG no constituyó el objetivo que permitiera en un futuro desarrollar antígenos para pruebas serológicas.

Por otro lado, se contrastaron los sueros de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, para observar los títulos de IgA presente en estos sueros reactivos a parásitos enteros y proteínas totales de *L. (L) mexicana*. Para parásitos enteros se obtuvieron

títulos de $0,233 \pm 0,036$ y para el caso de proteínas totales los títulos de IgA de los sueros de ratones BALB/c infectados por *T. cruzi* mostraron títulos de $0,756 \pm 0,167$. Si comparamos los títulos de IgA entre ratones infectados con *T. cruzi* y ratones infectados por *L. (L) mexicana*, se observa que no existen diferencias significativas en cuanto a la producción de este isotipo de inmunoglobulina y su reacción frente a proteínas totales. Mientras que en la reacción frente a parásitos enteros si se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$). Esto indica que tal perfil de IgA en los sueros de ratones BALB/c positivos para *L. (L) mexicana* y *T. cruzi* no refleja un patrón concluyente; debido a que estos anticuerpos reaccionan inespecíficamente con las proteínas

totales de *L. (L) mexicana*, indicando reacción cruzada con *T. cruzi* y no cuando se utilizan parásitos enteros (Tabla III).

La ejecución de los ensayos de electroforesis y Western Blot permitieron detectar que la inmunoglobulina del isotipo IgA presente en los sueros de los ratones BALB/c infectados con *L. (L) mexicana*, muestra un patrón de reconocimiento por diversas proteínas comprendidas en un rango de peso molecular de 85 a 25 kDa. Las proteínas identificadas en el rango de interpolación

poseen pesos moleculares de: 85 kDa, 65 kDa, 50 kDa, 46 kDa y 25 kDa. Predominando la proteína de 50 kDa cuya banda sobresalió por su intensidad y grosor en todas las fracciones analizadas de *L. (L) mexicana* (Fig. 2). La IgA presente en los sueros de ratones C57BL/6, reconoció esta proteína de 50 kDa con menor intensidad en comparación con la IgA presente en los sueros de ratones BALB/c.

Para comprobar la especificidad de la IgA por las fracciones proteicas de *L. (L)*

TABLA III
TÍTULOS DE IgA SÉRICA DE RATONES BALB/c INFECTADOS CON *T. cruzi* Y RATONES BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana* FRENTE A PARÁSITOS ENTEROS Y PROTEÍNAS TOTALES DE *Leishmania (Leishmania) mexicana*

Ratones BALB/c	PE <i>L. (L) mexicana</i>	PT <i>L. (L) mexicana</i>
Infectados con <i>T. cruzi</i>	0,233±0,036	0,756±0,167
Infectados con <i>L. (L) mexicana</i>	0,625±0,13*	0,786±0,068

Las placas fueron sensibilizadas con 2×10^7 p/mL de PE y PT de *L. (L) mexicana*. Los resultados son presentados en promedio \pm el error estándar. PE (parásitos enteros), PT (proteínas totales). * $p < 0,001$ con respecto a PE en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

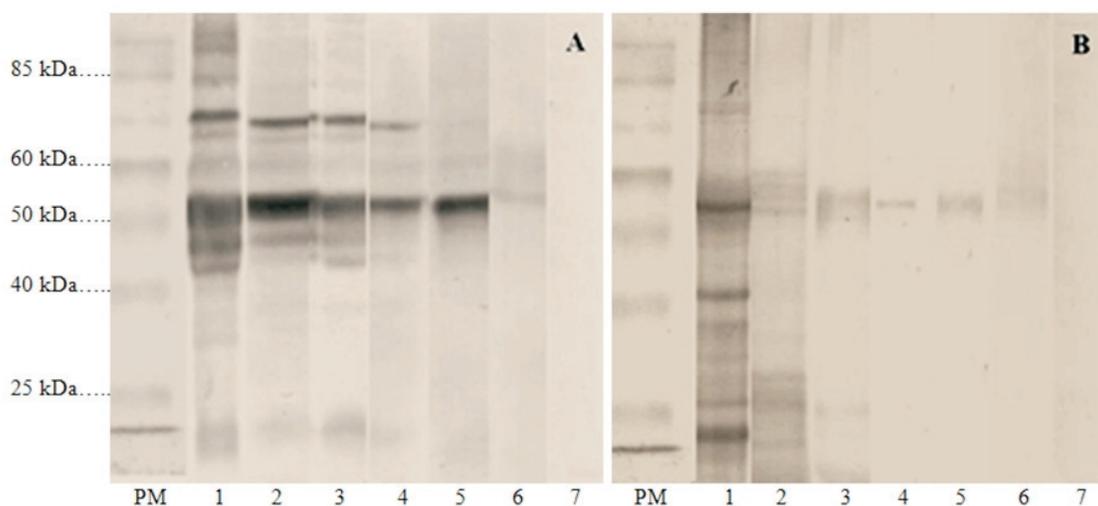


Fig. 2. Análisis por Western blot de fracciones de *Leishmania (Leishmania) mexicana* AZV. (A) Patrón de reconocimiento de proteínas de 50 y 65 kDa (\leftarrow) por sueros de ratones BALB/c positivos para *L. (L) mexicana*. (B) Patrón de reconocimiento de proteínas de 50 y 65 kDa (\leftarrow) por sueros de ratones C57BL/6 positivos para *L. (L) mexicana*. Fracciones: Proteínas totales (1), membrana (2), granular gruesa (3), citosólica (4), glicosomal (5), microsomal (6), control albúmina de suero bovino (7). PM: marcadores de peso molecular.

mexicana, se analizó el reconocimiento de este isotipo de inmunoglobulina en sueros de ratones BALB/c infectados con la cepa EP de *T. cruzi* frente a diferentes preparaciones antigénicas de *L. (L) mexicana*, encontrando un patrón de reconocimiento de la IgA por la proteína de 50 kDa en todas las fracciones antigénicas y por la proteína de 65 kDa en las fracciones correspondientes a proteínas totales, membranal y granular gruesa (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Al analizar los títulos de la IgA sérica, se encontró que los sueros de ratones BALB/c en contraste con los sueros de ratones controles sanos, presentan niveles altos específicos de IgA anti-*Leishmania* contra parásitos enteros y proteínas totales. Debido a que la infección causada por este parásito puede ocurrir a nivel mucocutáneo, la participación de la IgA en la respuesta inmune pudiera ser considerada importante; de hecho, en este estudio se evidenció la alta producción de dicho isotipo de inmunoglobulina, lo cual confirma su utilidad como un marcador indicativo de diagnóstico de la enfermedad, tal y como fue reportado por Reis y col. (20), quienes utilizando como modelo experimental caninos infectados con *L. chagasi*, observaron una correlación entre la densidad parasitaria en diferentes tejidos y los títulos de diversas inmunoglobulinas, proponiendo a la IgA como un marcador de la parasitemia en tejidos. Sin embargo, hay que destacar que los títulos de IgA presente en los sueros de ratones C57BL/6 infectados fueron más bajos tanto para proteínas totales como para parásitos enteros de *L. (L) mexicana*. Diversos autores señalan que esta diferencia en los títulos de IgA refleja la activación de la respuesta humoral frente a la infección y el progreso de la enfermedad, que no solo involucra este isotipo de

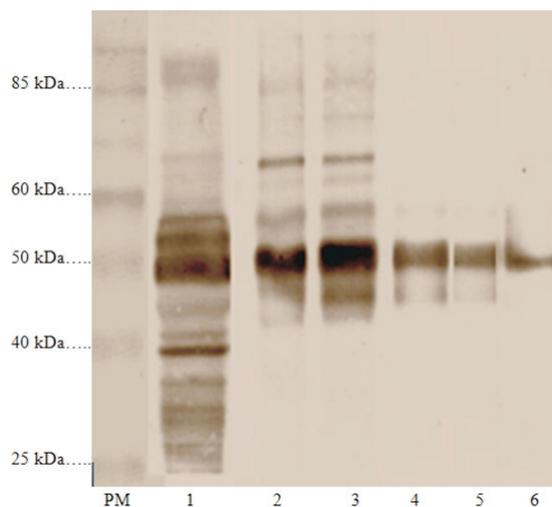


Fig. 3. Análisis por Western blot de fracciones de *L. (L) mexicana* AZV. Patrón de reconocimiento de proteínas de 50 y 65 kDa (←) por sueros de ratones BALB/c positivos para *T. cruzi*. Fracciones: Proteínas totales (1), membrana (2), granular gruesa (3), citosólica (4), glicosomal (5), microsomal (6), control albúmina de suero bovino (7). PM: marcadores de peso molecular.

inmunoglobulina, sino también la participación de la IgG (12).

Los títulos de IgG detectados en este estudio, fueron superiores a los títulos de IgA tanto en ratones BALB/c como en C57BL/6. Estos resultados pueden atribuirse al tipo de respuesta inmune desarrollada en el modelo murino y a la diseminación del parásito. En el modelo C57BL/6 se activa la respuesta tipo Th1 provocando la secreción de IFN- γ . Por su parte, la cepa BALB/c desarrolla una respuesta del tipo Th2 con la producción de IL-4, IL-5 e IL-1 (21, 22).

En nuestro estudio se demuestra diferencias cuantitativas con relación a los niveles y reconocimiento de la IgG e IgA, donde la cepa BALB/c reconoce más bandas antigénicas de *L. (L) mexicana* en comparación con la cepa resistente C57BL/6, probablemente debido a la condición clínica de

la lesión y a la diseminación del parásito, que expone más antígenos para la producción de IgA por parte de las células B de la cepa susceptible, a pesar que este isotipo constituye menos de una cuarta parte de los anticuerpos presentes en el plasma y es considerada como un componente menor de la respuesta inmune humoral sistémica en comparación con la IgG y la IgM (22); sin embargo, deben ser realizados estudios moleculares más precisos.

Debido a que diversos estudios histopatológicos en lesiones con leishmaniosis cutánea localizada tanto humana como experimental, reportan una expansión prominente de infiltrados de células plasmáticas positivas para IgA; así como secreción de IgM, IgG e IgA (21) y que estos anticuerpos podrían participar en la formación de complejos inmunes con antígenos parasitarios o propios y estar relacionados con el proceso necrótico que conlleva a la eliminación del parásito así como a la patogenia de la lesión (7); se decidió evaluar la reacción antígeno específica de los anticuerpos IgA contra *L. (L) mexicana* a fin de analizar su función en la enfermedad activa y crónica en humanos en un todo con los resultados obtenidos sobre la presencia de IgA en lesiones cutáneas. Por lo que debemos poner en perspectiva que estos resultados demuestran que la IgA pudiera ser un marcador para diferenciar la enfermedad activa con lesiones y crónica con o sin lesiones en vez de ser únicamente útil para diagnosticar la enfermedad activa, ya que aún cuando existen pocos antígenos reconocido que permitieran desarrollar una prueba diagnóstica por Western Blot, estos anticuerpos del isotipo IgA también fueron capaces de reconocer el mismo patrón de antígenos de *T. cruzi*. También hay que destacar que la IgG no fue analizada por Western Blot debido a que esta incrementa la progresión de la enfermedad, ya que se conoce que la inoculación pasiva de IgG anti *Leishmania* en rato-

nes incrementa la lesión cutánea, por lo que su utilidad diagnóstica queda restringida a la enfermedad activa y no la infección crónica (23).

Para contribuir al diseño de un eventual método diagnóstico inmune, se realizó la detección y posterior identificación de antígenos inmunodominantes de *L. (L) mexicana*, como agente etiológico de la LC. La fracción antigénica reconocida predominantemente por ambos tipos de sueros se ubica en el rango de 50 kDa cuya banda sobresalió por su intensidad y grosor en todas las fracciones analizadas de *L. (L) mexicana*; a pesar que la IgA presente en los sueros de ratones C57BL/6 reconoció esta proteína con menor intensidad en comparación con la IgA presente en los sueros de ratones BALB/c. Adicionalmente, se observaron pequeñas diferencias en el patrón de proteínas de otros rangos moleculares comprendidos entre 85 kDa, 65 kDa, 50 kDa, 46 kDa y 25 kDa, lo que indica que la IgA fue producida de manera particular por cada ratón susceptible o resistente; por lo que el Western Blot se pudiera considerar de utilidad diagnóstica específica cuando se toman en cuenta determinadas bandas de proteínas que permitan diferenciar reacciones específicas y cruzadas.

Al evaluar la reactividad de IgA en sueros de ratones infectados con *T. cruzi* frente a parásitos enteros y proteínas totales de *L. (L) mexicana*, se detectó la presencia de títulos de IgA tanto en el grupo de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, como el grupo de ratones BALB/c infectados con *L. (L) mexicana*. Este hecho, aunado al reconocimiento inespecífico por una banda de 50 kDa presente en todas las fracciones antigénicas en sueros de ratones BALB/c infectados con *L. (L) mexicana* y BALB/c infectados con *T. cruzi*, evidencia la existencia de reacciones cruzadas entre parásitos filogenéticamente relacionados como es el caso de *Leishmania* y *Trypanosoma*, ambos

pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. El género *Leishmania*, comparte muchas características comunes desde el punto de vista biológico con el género *Trypanosoma*, entre los que están determinantes antigénicos altamente conservados (24), por lo tanto en la práctica, la posibilidad de reacciones cruzadas, es muy elevada; hecho que guarda estrecha relación con el antígeno, independientemente de la técnica de diagnóstico empleada; por lo que se hace importante evaluar las características de esta proteína de 50 kDa reconocida por los sueros de ratones en este estudio.

Entre las moléculas que han sido sugeridas como antígenos potenciales se encuentran la proteasa de superficie de los promastigotes (PSP), los lipofosfoglicanos (LPG) y la proteína M2 (25, 26). Jaffe y col. (27), demostraron que la mayoría de los sueros de pacientes infectados con *Leishmania* mayor reconocen una banda de 50 kDa que probablemente corresponda a la PSP, puesto que es la principal glicoproteína de membrana presente en los promastigotes de todas las especies de *Leishmania* y concluyen que dicha molécula puede ser útil como antígeno diagnóstico en la LC. Sin embargo, como mencionamos anteriormente; dentro del patrón de reconocimiento de IgA en sueros de ratones BALB/c con *T. cruzi*, confrontados con diferentes preparaciones de antígenos de *L. (L) mexicana*, se visualizó una proteína de 50 kDa, a pesar de que no se obtuvo el patrón idéntico de reconocimiento de IgA por las proteínas visualizadas en los sueros de ratones BALB/c con Leishmaniosis, nos sugiere que a pesar de que existen reacciones cruzadas entre parásitos filogenéticamente relacionados, por lo menos dos proteínas muestran especificidad pudiéndose utilizar como patrón de diagnóstico para la cepa MHOM/VE/72/ AZV de *L. (L) mexicana*. Esto indica que la IgA sérica de ratones infectados con *L. (L) mexicana*, puede ser

útil para el manejo clínico y pronóstico de la enfermedad, pero no para diagnóstico específico de la LC.

En nuestro caso, las pruebas serológicas como el ELISA para determinar IgA no diferencia si se trata de enfermedad activa, mientras que la reacción de Western Blot tampoco permite un diagnóstico a través de la IgA, por lo que aún no se reporta una prueba diagnóstica específica para la infección por *L. (L) mexicana*. Estos resultados sugieren que probablemente la PCR sea la técnica de diagnóstico más sensible y específica a diferencia de las pruebas serológicas, ya que no hay resultados definitivos sobre bandas antigénicas diagnósticas, debido al grado de subjetividad o a los distintos protocolos técnicos llevados a cabo en la obtención de antígenos, fracciones, concentración de SDS, grados de reducción de la técnica de SDS-PAGE, sustratos, dilución del suero y anticuerpos secundarios, entre otros (28, 29).

Es importante destacar que en este estudio se evaluó IgA sistémica y no localizada debido a que Aragort y col. (21) reportan la detección de este isotipo de inmunoglobulina en piel de pacientes con LC, lo que genera la interrogante con respecto a su producción y participación en suero de humano y modelos murinos. Por otro lado, el hecho de detectar IgA sérica que reconoce antígenos de *L. (L) mexicana* en el modelo murino podría representar un hallazgo de suma relevancia, abriendo caminos a futuras investigaciones que permitan determinar si en humanos la IgA presente en suero corresponde con la presente en piel como ha sido reportado; y de ser así, dilucidar los mecanismos involucrados en su transporte y función.

Podemos concluir que, la cepa de ratón C57BL/6 parece ser útil para analizar la función de la IgA como marcador diagnóstico, debido a que las lesiones cutáneas que se desarrollan en estos ratones son

menos agresivas que las lesiones que se desarrollan en la cepa BALB/c. A pesar que los ratones C57BL/6 desarrollan lesiones que curan, aun se requieren varios análisis para una buena estimación de la eficacia de un método diagnóstico utilizando IgA protectora, para posteriormente realizarlo en suero de personas infectadas con Leishmaniosis; ya que sólo pocos estudios se han llevado a cabo en la enfermedad en humanos con el complejo de *L. (L) mexicana*, dando lugar en estos casos a resultados confusos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT), proyecto C-1305-05-03-B.

REFERENCIAS

1. **Cuba-Cuba CA.** Diagnóstico parasitológico de la Leishmaniosis Tegumentaria Americana. *Rev Med Exp* 2000; 17: 1-14.
2. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Consejo ejecutivo. *Communicable disease* 2004:104-150.
3. **Yépez J, Scorza-Däger J.** Quimioterapia de la Leishmaniosis Cutánea Localizada. *Bol Malariol y Sal Amb* 2003; 43:9-20.
4. **Susanne N, Shalini G.** Immunological perspectives of Leishmaniosis. *J Glob Infect Dis* 2010; 2:135-146.
5. **Kane MM, Mosser DM.** The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniosis. *J Immunol* 2001; 166:1141-1147.
6. **Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM.** B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 2000; 164: 3681-3688.
7. **Salazar-Mejía PG, Tejeda-Aguirre CR, López-Moreno HS.** Reacción de antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* con sueros de pacientes con leishmaniosis cutánea de Sinaloa, México. *Salud Publica Mex* 2010; 52:165-169.
8. **Kumar P, Kalpana P, Tripathi K, Pandey H, Sundar S.** Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral leishmaniosis: its usefulness in prognosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:1119-1123.
9. **Iranzo-Fernández P.** Dermatitis herpetiforme. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Med Cutan Iber Lat Am* 2010; 38:5-15.
10. **McDonald HC, York NR, Pandya AG.** Drug induced linear IgA bullous dermatosis demonstrating the isomorphic phenomenon. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62:897-898.
11. **González LA, Restrepo M, Vásquez G.** Lupus eritematoso sistémico ampoloso: dramática respuesta a la terapia con dapsona. *Rev Colomb Reumatol* 2009; 16:352-360.
12. **Méndez-Flores S, García-Hidalgo L, Saeb-Lima M, Uribe-Uribe N, Orozco-Topete R.** Enfermedad ampolosa lineal por inmunoglobulina A (IgA) inducida por vancomicina. *Dermatología Rev Mex* 2010; 54:236-239.
13. **Rodríguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, Riera C, Gállego M, Portús M, Alberola J.** Dynamics of *Leishmania* specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniosis before and after treatment. *J Vet Int Med* 2006; 20:495-498.
14. **Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE.** The hamster as a model of human visceral leishmaniosis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 2001; 166:1912-1920.
15. **De Jesús R, Quiñones W, O'Callaghan J.** Identificación de proteínas de la membrana glicosomal de *Leishmania mexicana* con fines diagnósticos. *Rev Ecol Lat Am*; 6:9-17.
16. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
17. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 1970; 15:680-685.
18. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
 19. **Rybicki E, Purves M,** 1996. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *Molecular biology techniques manual*, Dpto of Microbiology, University of Cape Town. Pp 73-79.
 20. **Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA.** Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 2006; 146:303-311.
 21. **Aragort R, Calcaño M, Rossell O, Maizo Z, Rodríguez A.** Intralesional isotype profiles in human localized cutaneous leishmaniasis lesions. *Int J Exp Pathol* 2001; 82:129-134.
 22. **Todolí F, Pérez-Filgueira M, Galindo I, Gómez-Sebastián S, Escribano JM, Rodríguez-Cortés A, Alberola J.** Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMP2, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol* 2009; 164:154-161.
 23. **Vargas-Duarte JJ, López-Páez MC, Escovar-Castro JE, Fernández-Manrique J.** Evaluación por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infectados con *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Rev Salud Pública* 2009; 11:641-652.
 24. **Amini M, Nahrevanian H, Khatami S, Farahmand M, Mirkhani F, Javadian S.** Biochemical association between essential trace elements and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c and C57BL/6 mice. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 83-85.
 25. **Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D.** Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2000; 191: 1063-1068.
 26. **Champsi J, McMahon-Pratt D.** Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* 1988; 56:3272-3279.
 27. **Jaffe CL, Shor R, Trau H, Passwell JH.** Parasite antigens recognized by patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1990; 80:77-82.
 28. **Fernandez-Perez F, Gómez-Muñoz S, Mendez J.** *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop* 2003; 86:83-91.
 29. **Almeida MA, Jesusa E, Sousa-Attab M, Alvares L, Berne ME, Atta AM.** Anti-leishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 106:151-151.