

CINETICA DE LA INFECCION CON LEISHMANIA MEXICANA MEXICANA EN RATONES BALB/c Y C57BL/6 PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON FACTOR EXCRETOR

Dr. ARMIJOS MORETA RODRIGO X.*; Dr. ARMIJOS MARCO VINICIO;
Dra. AGUILAR TORRENTERA FABIOLA y Dra. MONROY OSTRAL AMALIA

** Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Central del Ecuador Quito – Ecuador.*

*Departamento de Inmunología-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
Instituto Politécnico Nacional México D.F.*

RESUMEN:

La inmunización de ratones BALB/c y C57BL/6 (genéticamente sensibles y resistentes a la infección por *Leishmania mexicana* respectivamente) con factor excretor de *Leishmania mexicana* promueve el desarrollo de la infección. Cuando los ratones mencionados son retados con dosis infectivas de promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*.

Los ratones BALB/c desarrollan la enfermedad en un período inicial más corto y con mayor intensidad en relación a los testigos (ratones BALB/c no vacunados). Los ratones C57BL/6, no logran controlar la enfermedad, desarrollando la forma crónica, frente al grupo testigo (ratones C57BL/6 no vacunados) que controla fácilmente la infección. (**Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, Quito, 14: 9, 1989**)

Introducción

El factor excretor (FE) es un glicoconjugado, que se elimina al medio externo desde la cubierta de leishmania por acción de fosfolipasa intrínseca de membrana (1), tanto en la forma de promastigote como en la de amastigote (2).

Este glicoconjugado ha sido y sigue siendo sujeto a estudio fundamentalmente en las leishmaniasis del viejo mundo (3-5). En el campo experimental se ha encontrado que el FE juega un papel importante en las formas crónicas de la leishmaniasis (67). Trabajos de MITCHELL y col. (8) en modelos murinos definen al FE de *Leishmania major*, como una molécula, que induce la activación de linfocitos T supresores. Esto corrobora con varios reportes

que asocian la persistencia de la enfermedad con ausencia de respuesta inmunoprotectora (6, 7, 9).

En el presente estudio encuentra que el FE de *leishmania mexicana mexicana* induce mayor susceptibilidad a la infección con la cepa de *leishmania* homóloga, cuando inmunizamos a ratones BALB/c (sensibles) y C57BL/6 (resistentes) con esta molécula.

Materiales y métodos

Ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad, de cepas C57BL/6 y BALB/c, donados por el Centro de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. México.

Parásito:

Leishmania mexicana mexicana, aislada desde un paciente que presentó leishmaniasis cutánea difusa, es mantenida en el Departamento de Inmunología E.N.C.B. por pases alternos en ratón y medio de cultivo.

Factor excretor:

Se obtuvo de acuerdo al método de SLUTZKY (9), desde el sobrenadante de los cultivos de promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* en fase estacionaria. En forma breve el método consiste en la extracción del factor excretor con fenol a partir del sobrenadante del cultivo, posteriormente y previo a diálisis en P.B.S. Ph 7.2, se pasó por una columna de sepha de G-50, obteniéndose el F.E. en condiciones adecuadas de pureza, con una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteína por el método de LOWRY (10) y 260 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa por el método BUBOIS (11).

Inmunización:

Tanto los ratones BALB/c y C57BL/6 se distribuyeron en dos grupos. El grupo problema, fue inoculado intraperitonealmente con 0.1 ml de F.E. más 0.1 ml de adyuvante completo de Freund (SIGMA) y 4 retos posteriores de 0.1 ml de F.E., más adyuvante incompleto de Freund en intervalos de una semana; quince días posteriores de la última inmunización tanto los ratones problema, como los testigos (estos últimos que no recibieron la inmunización), fueron retados con 3×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* fase estacionaria, inoculados en el cojinete plantar derecho de la pata posterior derecha, a partir de esta fecha, se midió en intervalos de una semana el grosor del cojinete plantar, que se infectó con el parásito.

Resultados

Como se puede observar en la figura No.1 en la que se graficó los milímetros de grosor del cojinete plantar frente a las semanas posteriores a la infección, en el caso de los ratones

(C57BL/6), el grupo inmunizado con F.E. desarrolla la lesión en forma progresiva, no logrando controlar la misma a partir de la octava semana, como sucede en el grupo control y así en la veintava semana, el grosor del cojinete plantar de este último grupo alcanzó las medidas originales.

Tratándose de los ratones (BALB/c) se puede observar que en el grupo inmunizados con F.E. se desencadena la infección a partir de la tercera semana, la misma que presenta mayor incremento en relación al grupo testigo, ambos grupos no logran controlar la enfermedad a nivel de la veintava semana.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan al F.E. como un antígeno de *Leishmania* que induce sensibilidad a la infección por este protozooario. Si analizamos el grupo de ratones BALB/c (genéticamente susceptibles a *Leishmania*) podemos observar que los ratones previamente inmunizados con el F.E., estos se vuelven más susceptibles y desarrollan la enfermedad en un menor tiempo y con una mayor intensidad en relación al grupo testigo. Finalmente, ambos grupos no logran controlar la enfermedad.

Con respecto a los ratones (C57BL/6) (cepa resistente a esta enfermedad), podemos observar que el grupo inmunizado con F.E. presenta susceptibilidad a la infección con *Leishmania* y así a nivel de la veintava semana, no logra controlar la infección, período en el que el grupo testigo ha logrado controlar la infección.

Podríamos decir que el F.E. es una molécula que facilita el desarrollo de esta parasitosis, como ya se ha demostrado en otros estudios con *Leishmaniasis* del Viejo Mundo (12). El mecanismo exacto de esta inmunosupresión no lo conocemos, probablemente se deba a que el factor excretor activa clones de linfocitos T supresores (8, 12, 14) los mismos que estarían inhibiendo una respuesta protectora por parte del huésped, frente a la invasión por *Leishmania*.

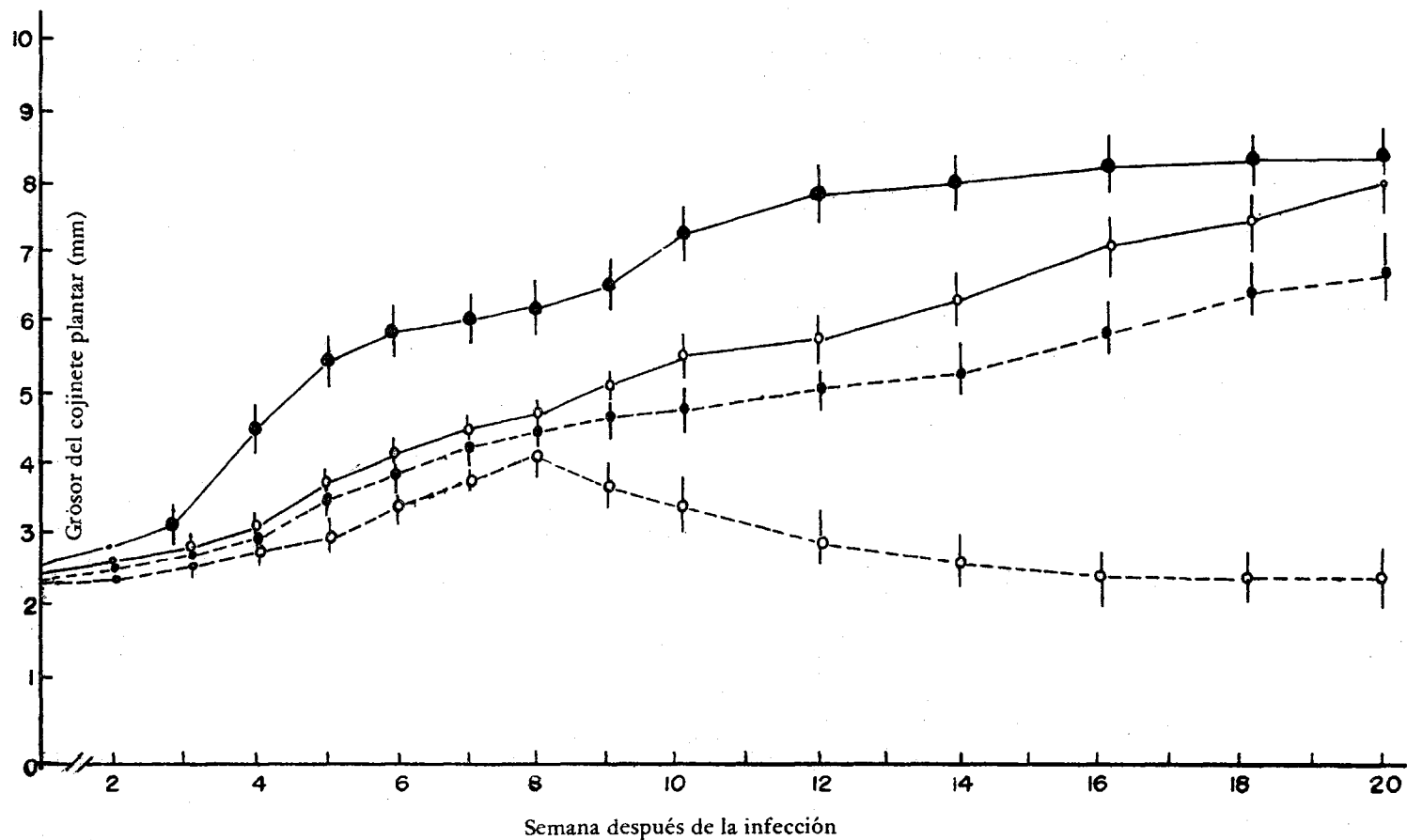


Figura 1.— Infección con 3×10^6 promastigotes de *L. mexicana mexicana* (Cepa Solis), en fase estacionaria, inoculados en el cojinete plantar derecho de ratones BALB/c (líneas continuas) y C57BL (línea de puntos) que fueron inmunizados por vía intraperitoneal con factor excretor de *L. mexicana mexicana* (Cepa Solis), (círculos cerrados) y no inmunizados (círculos abiertos).

Bibliografía

1. Slutzky, G.M.; El-Elon, J. y Greenblatt, C.: "Leishmanial Excreted Factor: "Protein-Bound and Free Forms From Promastigote Cultures of *Leishmania Tropica* and *Leishmania Donovan*". *Infection and Immunity* 26: 916, 1979
2. Schnur, L.F.; A. Zurkerman y Greenblatt, C.L.: "Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo, 1st". *J. Med. Sci.* 8:132, 1972.
3. Swtzy, G.M. y Greenblatt, C.L.: "Isolation of a Carbohydrate-Rich Immunologically Active Factor from Cultures of *Leishmania Tropica*". *Febs. Lett.* 80:401, 1977.
4. El-On, J., Schnur, L. y Greenblatt, C.L.: "*Leishmania donovani*: Physicochemical Immunological and Biological Characterization of Excretor Factor from Promastigotes". *Experimental Parasitology* 47: 254, 1979.
5. El-On, J., Bradley, D.J. y Freeman J.: "*Leishmania donovani*: Action of Excretor Factor on Hydrolite. Enzyme Activite of Macrophages from mice with Genetically Different Resistance to Infection" *Experimental Parasitology.* 49: 167, 1979.
6. Liew, F.Y., Hate, C. y Howard, J.: "Immunologic Regulation of Experimental. Cutaneous Leishmaniasis. V. Characterization of Effects and Specific Supressor T Cells". *The Journal of Immunology* 128: 1917, 1982.
7. Reiner, N., Winniene y McMaster R.: "Parasite Accesoty Cell Interactions in murine Leishmaniasis". *The Journal of Immunology* 138: 1926, 1987.
8. Scott, P.A. y Farrell J.: "Experimental Leishmaniasis Inespecific Immunodepression BALB/c mice Infected with *Leishmaniasis Tropica*". *The Journal of Immunology* 127: 2395, 1981.
9. Lowry O.M. J.; Roseborouhg, A.L.; Farr y Randall R.J.: "Protein measurement with the folliw phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
10. Dubois, M.K.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Bebers P.A.; y Smith F.: "Colorimetric Method for determination of sugars and related substances anal". *Chem.* 28:350, 1956.
11. Mitchell, G.F. y Handman, E.; "T. linphocyte recognice *Leishmania* Glicoconjugates". *Parasitology Today.* 1:63, 1985.
12. Londner, M.V.; Frankenburg, S.; Slutzky, G.M. y Greemblatt, C.: "Action of *Leishmania* Excretor Factor on human linphocyte, blast transformation". *Parsitic. Immunology* 5:249, 1983.
13. Mitchell, G.F. y Handman, E.; "The glycoconjugate derived from a *Leishmania* major receptor for macrophages is a suppressogenic, disease promoting antigen in murine cutaneus leishmaniosis". *Parasite Immunology* 8:255, 1986.
14. Liew, F.Y.: "Functional heterogeneity of CD4⁺ Tells in Leishmaniasis". *Immunology Today.* 10:40, 1989.