

LEISHMANIASIS. PATOGENICIDAD Y LA SUPERFICIE CELULAR DE LEISHMANIA (*)

*A. G. Hernández y N. Rodríguez (**)*

En el reporte de la segunda reunión del grupo de trabajo sobre Leishmaniasis de la "Organización Mundial de la Salud" se reconoció que tal patología, la cual había sido originalmente incluida en su Programa Especial como un modelo para el estudio del parasitismo intracelular, era en realidad un problema de salud pública importante. La importancia pública de esta enfermedad se hacía evidente al constatar la existencia de 400.000 nuevos casos por año en el mundo y 1.000 nuevos casos por año en Venezuela. Sin embargo, ambas cifras son estimadas por algunos autores como conservadoras ya que algunos reportes sugieren que este número está incrementado o bien es mayor (WHO, 1979).

La dolencia en nuestro continente se manifiesta en las formas llamadas Leishmaniasis tegumentaria Americana y Leishmaniasis visceral.

La Leishmaniasis tegumentaria Americana, clásicamente conocida, se caracteriza clínicamente por lesiones cutáneas (Leishmaniasis cutánea y cutánea difusa) seguida en un determinado número de casos, después de períodos de lactancia de duración variable, de localizaciones en las mucosas nasal, oral y farínge (Leishmaniasis mucocutánea), (Pifano, 1960). La Leishmaniasis visceral, conocida con el nombre de Kala-Azar se caracteriza por severos cambios patológicos en órganos internos, entre ellos el bazo.

La estrategia de investigación en nuestro laboratorio se orienta conforme al hecho que el estudio de la Leishmaniasis como un problema de parasitismo intracelular puede llevar al hallazgo de soluciones al problema de salud pública que ella representa y es eso lo que trataremos de mostrar en el presente trabajo.

(*) Trabajo distinguido con el Premio Anual de Investigación "Fundación CJM", 1983.

(**) Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

El parasitismo intracelular es un tema de gran interés biológico para el estudio de los factores que modulan el reconocimiento celular. En el caso particular de *Leishmania* y su célula hospedera en los vertebrados —el macrófago—, este estudio adquiere aspectos fascinantes por cuanto se trata del parasitismo de una célula eucariota por parte de otra de naturaleza similar y aun más por ocurrir la multiplicación del parásito en el interior de una célula asesina o microbicida tal cual es, el macrófago.

El proceso de invasión al macrófago puede ser efectuado por dos estadios fisiológica y morfológicamente distintos de *Leishmania*; la forma amastigote presente en el hospedero vertebrado y la forma promastigote la cual se localiza libre en el tracto digestivo del hospedero invertebrado. Esta última forma es la que se consigue en los cultivos de *Leishmania*. (Adler, 1964).

La serie de eventos que conducen a la manifestación del parasitismo a nivel celular son los siguientes (Silverstein, 1977): a) enlazamiento del parásito a la superficie celular del macrófago. b) formación de la vacuola parasitofora en cuyo interior se aloja la *Leishmania*. c) fusión de las lisosomas con la vacuola antes mencionada para dar origen al fagolisosoma y d) multiplicación del parásito en el interior de este ambiente inhóspito caracterizado por la presencia de numerosas enzimas digestivas lisosomales. Hemos escogido el primero de los eventos arriba mencionados por ser este un punto clave en el ulterior desarrollo del parasitismo y en consecuencia para el éxito biológico de la *Leishmania* (Hernández y col. 1981). En consecuencia, particular atención ha recibido la caracterización de la superficie celular de *Leishmania*. Dicha caracterización se concentra en conocer cuáles receptores de la superficie celular y en particular qué glicoproteínas participan en la relación parásito-macrófago y en cuál es el destino de este parásito en función de las características que presenta la mencionada estructura celular. Este es un dato de particular y decisiva importancia para la posible eliminación del parasitismo ejercido por la *Leishmania* toda vez que los carbohidratos de la superficie celular han sido propuestos como factores que modulan tanto el reconocimiento como la adhesión celular (Hughes y Pena, 1981). Los residuos de carbohidratos podrían interactuar con moléculas enlazadoras de los mismos localizadas en la superficie celular del macrófago generando una serie de procesos conducentes a la transformación y cambio tanto del parásito como del macrófago. Entre los candidatos a ejercer esta función en el macrófago destacan las glicosil-transferasas (Roseman, 1970), las glicosidasas (Rauvala y col., 1981) o proteínas (lectinas) las cuales no tienen activi-

dad enzimática conocida. Diferentes modelos de estudio se han empleado con el propósito de investigar la posibilidad de existencia del mecanismo receptor-ligando propuesto para la relación *Leishmania*-macrófago.

Así, líneas patógenas de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, NR) han sido comparados con líneas no patógenos (*L. braziliensis yacuyensis*) mediante la utilización de lectinas y determinación de cargas superficiales presentes en la forma promastigote de ambas (Dawidowicz y col., 1975, Hernández y col. 1977, 1981; Hernández, 1982, 1983 y Ayesta, 1978). La línea patógena NR se caracteriza por ser aglutinada fuertemente por Concanavalina A y aglutinina de *Ricinus communis* y por presentar una fuerte carga negativa a nivel de su superficie celular. La aglutinación por ambas lectinas revela la presencia de alguno de los siguientes azúcares expuestos en la superficie celular: D-glucosa, D-manosa, D-galactosa y N-acetyl-D-galactosamina. Por el contrario, LBY se caracteriza por no ser aglutinada por la aglutinina de *Ricinus communis* y Concanalina A y por no presentar cargas negativas expuestas a nivel de su superficie celular. Es conveniente mencionar que mientras que NR se desarrolla y multiplica profusamente en macrófagos peritoneales de ratón y en la línea celular J774-G8 (Riggione, no publicado 1983), LBY es digerida en estos sistemas (Merino col. 1978). Como aportes nuevos en el presente trabajo encontramos:

El enlazamiento de NR a la línea de macrófagos J774-G8 es 1.55 veces mayor que el que presenta LBY (Tabla 1) cuando el enlazamiento se estudia por el método descrito por Chang (1981) y el cual consiste en utilizar parásitos marcados metabólicamente con ^{35}S -metionina o ^3H -leucina para el estudio de la interacción *Leishmania*-macrófagos. Específicamente, una vez que se han puesto en contacto el macrófago con la *Leishmania* isotopicante marcada, bajo determinadas condiciones, se lava con medio de cultivo, se incuba y luego de un tiempo determinado se hace el contaje radioactivo en un contador de centelleo líquido pudiéndose así calcular el número de parásitos enlazados por macrófago. En el caso de NR el enlazamiento es dependiente de la temperatura, siendo 7 veces mayor a 35°C que a 4°C . (Fig. 1) y es inhibido en 50% si los promastigotes son tripsinados ($20\mu\text{g}/10^6$ células) (Fig. 2) y en 87% si los macrófagos son tratados con tripsina ($10\mu\text{g}/10^6$ células). Además este enlazamiento es posible sólo si ciertos azúcares están presentes en la superficie celular del promastigote como lo demuestran los siguientes experimentos. Promastigotes de NR tratados con metaperiodato de sodio bajo condiciones (20 mM, 4°C , 10 min, en

oscuridad) que mantienen su viabilidad y disminuyen su aglutinación por Con A (17%) se enlazan a J774-G8 con un 60% menor de eficiencia. Si el ensayo de enlazamiento se lleva a cabo en presencia de azúcares (100 mM) éste resulta disminuido en el siguiente orden: N-acetil-D-glucosamina (59%), D-galactose (40.5%), D-glucose (39.5%), N-acetil-D-galactosamina (29.4%), D-manosa (19.7%), D-arabinosa (7.4%), D-fucosa (7.3%) y ácido siálico (6.5%) (Tablas 3 y 3). Estos resultados de enlazamiento de NR a J774-G8 difieren del sistema *L. donovani*-macrófago de hamster (Chang, 1981) únicamente en la especificidad del enlace. Mientras en este último sistema el ácido siálico tiene gran importancia y muy poca los residuos de galactosa, en el enlazamiento en NR-J774-G8 la situación es totalmente contraria. En otro tipo de experimentos hemos hecho uso de la información aportada por los trabajos de Dagger y col. (1983) quienes han demostrado que el tratamiento de la *Leishmania* patógena NR con tunicamicina (2 µg/ml), un inhibidor de la formación de N-glicanos (Kuo y Lampen, 1974), produce células que nosotros hemos denominado "desnudas" por carecer de la cubierta celular que rodea el parásito y la cual está en íntimo contacto con la membrana plasmática de esta célula. Es importante anotar que este tratamiento no afecta la viabilidad de los parásitos. Estos promastigotes así obtenidos enlazan el doble de Concanavalina A que las células control y a su vez se enlazan 2.06 veces más a los macrófagos J774-G8 (Tabla 4). No obstante, todo el proceso se traduce en una eliminación o digestión rápida de estos promastigotes por parte de la línea de macrófagos.

Finalmente, si uno de los componentes de la superficie celular de la línea patógena NR, una glicoproteína de 47.000 de peso molecular y la cual contiene 59% de peptidos y 41% de proteínas, se incuba con la línea no patógena LBY y luego éste se ofrece a los J774-G8, se observa un incremento en el enlazamiento de LBY a los J774-G8 de 1.60 veces (Tabla 1). Bajo estas condiciones el período de vida de estos promastigotes se prolonga hasta más de 72 horas.

Estos resultados indican que los componentes de la superficie celular de *Leishmania* juegan un papel decisivo en el establecimiento de los parásitos en el interior de los macrófagos. Su papel toda vez que el enlazamiento al macrófago parece ser de naturaleza receptor-ligando podría estar relacionado con el envío de mensajes señalando el inicio de la transformación promastigote-amastigote en debido tiempo (Lewis and Peters, 1977), o bien modificando la actividad biológica del macrófago. Evidencias de esta última situación han sido reportados por Rodríguez y col., 1983; y Hernández y col., 1980, quienes de-

mostraron disminución de la capacidad fagocítica y digestiva de macrófagos peritoneales de ratón y J774-G8 en presencia del componente glicoproteico de 47.000 de peso molecular secretado por *Leishmania braziliensis* (NR).

Estos hallazgos podrían ayudar en el diseño ya sea de drogas u otras alternativas inmunológicas para evitar la reinfección de macrófagos una vez desarrollada la Leishmaniasis en el hombre o bien para el diseño de campañas preventivas mediante regímenes inmunoprolácticos.

Figura 1.— 5×10^6 promastigotes de *Leishmania braziliensis* NR se incubaron con 10^6 macrófagos J774-G8 a 35°C (●) y a 4°C (□) por el tiempo indicado procediéndose luego a determinar el enlazamiento de acuerdo a Chang (1981).

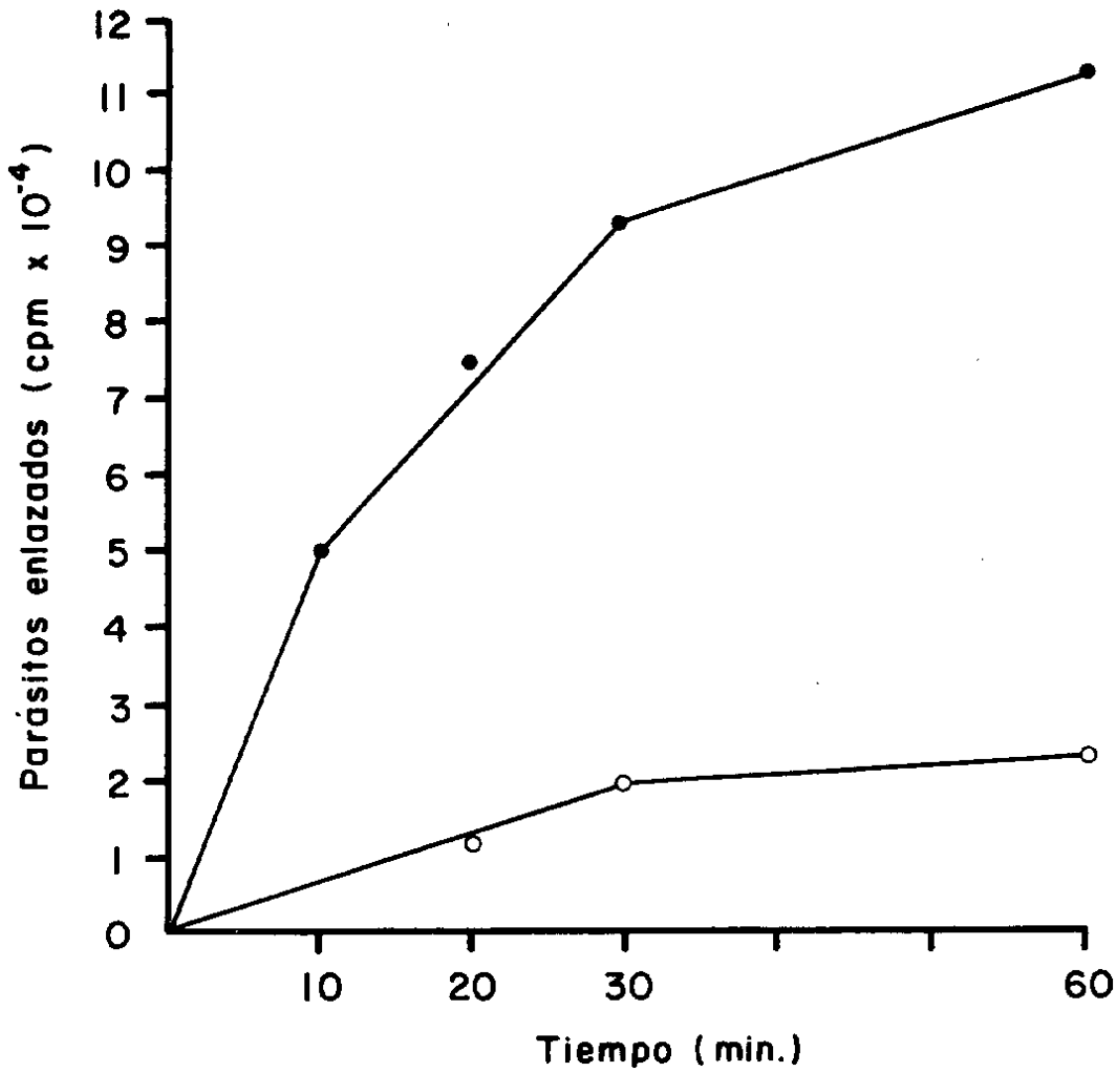


Figura 2.—El experimento se realizó como se indicó en la Figura 1, excepto que los promastigotes de NR fueron tratados previamente con tripsina ($20\mu\text{g}/10^6$ parásitos, por 1 hora a 25°C) y entonces incubados con los macrófagos J774-G8 a 35°C .

• Control

□ Tratados con tripsina.

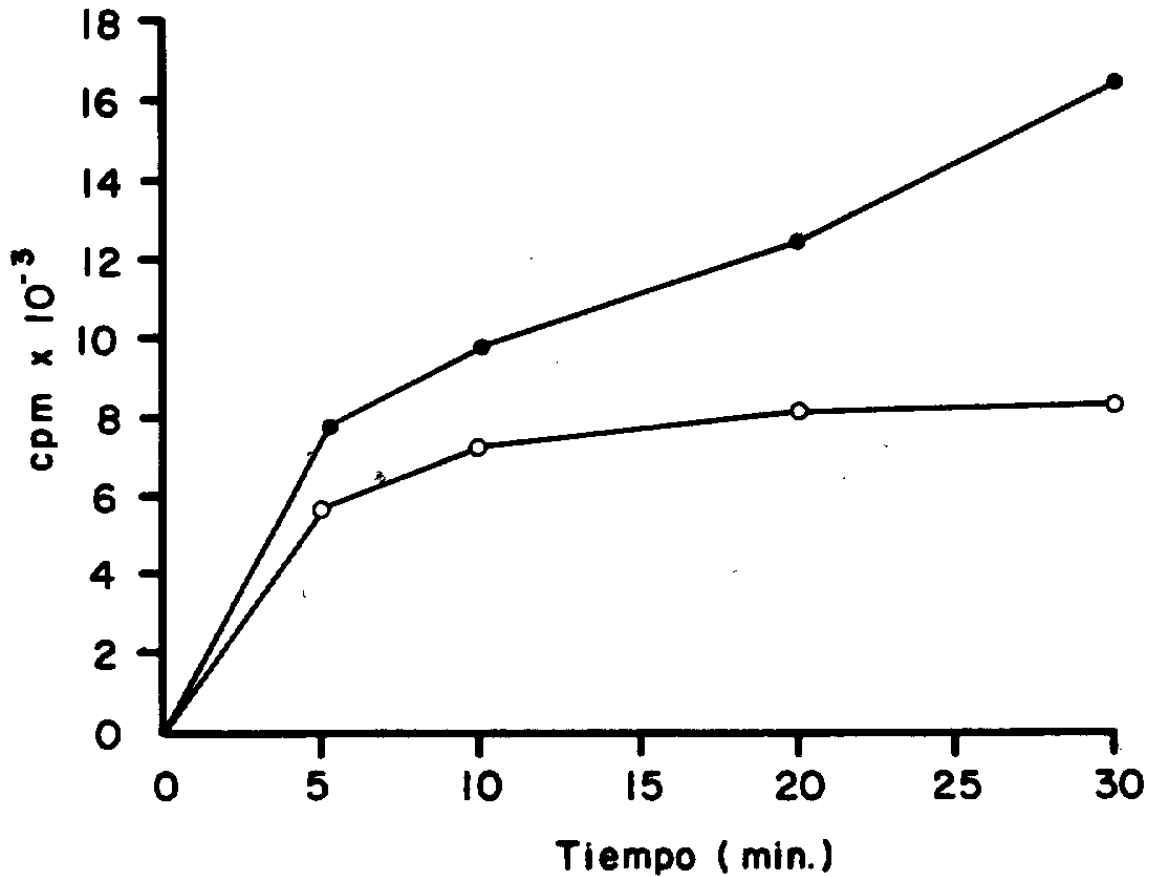


TABLA 1.
ENLAZAMIENTO DE PROMASTIGOTES DE NR
Y LBY A LOS MACROFAGOS J774-G8

<i>Experimento</i>	<i>Parásitos enlazados/ macrófago</i>
M + LBY	1.74
M + NR	3.00
LBY + 47K + M	3.12
M + galactosa + NR	1.80
M + galactosa + (LBY + 47K)	1.65
LBY + 47K + M	3.29
M + fucosa + (LBY + 47 K)	2.08
NR + fucosa	2.85
 <i>Promedios</i> 	
LBY	1.99 + 0.2
NR	3.00 + 0.3
LBY + 47K	3.20 + 0.3

El estudio se realizó de acuerdo al método de Chang (1981). Las abreviaturas representan: M, macrófagos, 47K una glicoproteína de peso molecular aparente 47.000 aislada de la superficie celular de NR (Rodríguez y col., 1983). Los componentes del sistema experimental se agregan en la secuencia señalada, habiéndose agregado galactosa y fucosa a una concentración 100 mM y el componente 47K a $10\mu\text{g}/10^6$ células.

TABLA 2.
ENLAZAMIENTO DE PROMASTIGOTES (NR)
A LOS MACROFAGOS J774-G8

EL EFECTO DE AZUCARES

<i>Azúcar</i>	<i>% Inhibición</i>
D-Galactosa	40.5
D-Glucosa	39.47
N. acetil D-glucosamina	59.04
N. acetil-galactosamina	29.40
D-Mannosa	19.70
D-Arabinosa	7.37
D-Fucosa	7.29
Acido Siálico	6.59

5 x 10⁶ promastigotes de NR se incubarán con 10⁶ macrófagos J774-G8 en ausencia (control) y en presencia (100 mM) de los azúcares señalados. Transcurridos 30 minutos se determinó el grado de inhibición del enlazamiento (Chang, 1981) tomando como 100% el ocurrido en ausencia del azúcar bajo estudio (Ver tabla 3).

TABLA 3.
ENLAZAMIENTO DE PROMASTIGOTES (NR)
A LOS MACROFAGOS J774-G8

EL EFECTO DE AZUCARES

	<i>Parásitos/Macrophago</i>	
	<i>Control</i>	<i>Azúcar</i>
D-Galactosa	4.51	2.55
D-Glucosa	2.50	1.34
D-Fucosa	3.23	2.76
D-Mannosa	2.82	2.02
Acido Siálico	3.97	3.82
D-Arabinosa	3.53	3.30
N-acetil-D-glucosamina	3.63	1.45
N-acetil-D-galactosamina	2.06	1.45

Desviaciones estandar = 3.002 ± 0.3

Los experimentos se realizaron igual que lo descrito en la Tabla 2 y se convirtieron en parásitos enlazados por macrófago haciendo uso de la actividad específica conocida para cada 5×10^6 promastigotes de NR.

TABLA 4.
ENLAZAMIENTO DE PROMASTIGOTES DE NR
A LOS MACROFAGOS J774-G8

EL EFECTO DE TUNICAMICINA

		<i>Control</i>	<i>Tunicamicina</i> <i>(4µg/ml)</i>
c.p.m.	6260		23426
Exp. 1	Parásitos-macrófago	2.01	4.34
	Relación		2.15
	c.p.m.	6717	13177
Exp. 2	Parásitos/macrófago	2.16	4.25
	Relación		1.97
	Promedio		2.06

Los promastigotes de NR se trataron con Tunicamicina (4µg/ml) de acuerdo a Dagger y col. (1983) y 5 c 10⁶ parásitos así obtenidos e incubaron con 10⁶ macrófagos J774-G8 a 35°C por 30 min. El enlazamiento y conteo radiactivo se efectuó de acuerdo a Chang y col. 1981.

c.p.m. cuentas por minuto.

La actividad específica para los parásitos control y tratado fue:

Control 15529 c.p.m./ 5 x 10⁶ células.

Tunicamicina 15467 c.p.m./5 x 10⁶ células.

Las desviaciones estandar para la relación y el número promedio es de ± 0.3.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, S. 1964. *Leishmania*. Adv. Parasitol 2: 35-96.
2. Ayesta, C. 1978 Estudio comparativo de la superficie celular de dos cepas de *Leishmania braziliensis*. Tesis de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. UCV.
3. Chang, K.P. 1981. *Leishmania donovani*. Macrophage binding mediated by surface glycoproteins. Antigens: Characterization *in vitro* by a radioisotopic assay. Mol. Biochem. Parasitol 4, 67-76.
4. Dagger, F., Ayesta, C. y Hernández, A. G. The effect of tunicamycin on *L. braziliensis*. I. Cell Growth, Cell Morphology and Ultrastructure. Biol. Cell. (En prensa).
5. Dawidowicz, K., Hernández, A. G., Infante, R. B., y Convit, J. 1975. The surface membrane of *Leishmania* I. The effects of lectins in different stages of *L. braziliensis*. J. Parasitol. 61, 950-953.
6. Hernández, A. G., Infante, R. B., La Riva, G., De Vera, O., Dawidowicz, K. y Convit, J. 1977. The surface membrane of *Leishmania* II. Energy dependent agglutination of *L. braziliensis* by Concanavalin A. Acta Cient. Venezolana 28, 380-384.
8. Hernández, A. G., Rodríguez, N., Dagger, F. y Greenblatt, C. L. 1980. Production and secretion of *L. braziliensis* proteins. Mol. Biochem Parasitol. 1, 143-149.
9. Hernández, A. G., Argüello, C., Ayesta, C. y col. 1981. The surface membrane of *Leishmania*. In: The biochemistry of parasites. Slutzky G. (ed). Pergamon Press, Oxford. p. 47-65.
10. Hernández, A. G. 1982. Lectins as a tool in parasite research. In: *Leishmania* UNDP/World Bank/WHO. Biochemical Characterization of *Leishmania*. M. L. Chance y B. C. Walton (eds).
11. Hernández, A. G. 1983. *Leishmanial* excreted factors and their possible biological role. In: The cytopathology of parasite disease. Pitman Books, Ciba Symposium 99, 138-156.
12. Hughes R. C. y Pena S.D.J. 1981. En carbohydrate metabolism and its disorders. Raudle, P. J., Steiner, D. F., y Whelan, D. J. (Editores). New York, Academic Press 3: 363-423.
13. Kuo, S. C. y Lampen, J. O. 1974. Tunicamycin an inhibitor of yeast glycoprotein synthesis Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 287-295.
14. Lewis, D. H. y Peters, W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. Ann. Trop. Med. Parasitol 71, 295-312.
15. Merino, F., Luis J., Hernández, A. G., Dawidowicz, K. y Jordán, L. S. 1978. Immunotherapy of experimental tumors by *Leishmania braziliensis*. Prevention and detection of cancer 2, 1803-1817.
16. Pifano, F. 1960. Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniasis tegumentaria en la región neotropical, con especial referencia a Venezuela. Archivos venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica 3, 31-61.