

LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA DE COMPONENTES ASOCIADOS A LA MEMBRANA CITOPLASMATICA DE DIVERSAS FORMAS BIOLÓGICAS DE TRYPANOSOMA CRUZI Y LEISHMANIA AMERICANA

Arenas, Carlos Manuel
Bretaña, Antonio
Avila, José Luís
Tapia, Félix
Arias, Marianela
y Contreras de Bretaña Marisol.

INSTITUTO DE BIOMEDICINA
Universidad Central de Venezuela

INTRODUCCION:

La membrana de los eucariotes está recubierta en su cara externa por una capa de polisacáridos de cadena corta (generalmente menos de 15 monosacáridos) denominada GLICOLALIX y' que puede presentar una altísima variabilidad en su composición basándose en sólo 9 azúcares. Estas cadenas están ancladas en diferentes formas a la membrana citoplasmática siendo la más frecuente la asociación a una proteína, ya siendo ésta integral o superficial, constituyendo glicoproteínas de superficie. La exhibición de estos compuestos ha demostrado ser de particular importancia en procesos de reconocimiento intercelulares y en procesos infectivos de algunos trypanosomatidios (Villalta y Kierszenbaum, 1985).

Las lectinas son glicoproteínas multiméricas de origen no inmunológico aisladas de plantas y animales. Poseen sitios donde pueden enlazar de manera no covalente a un azúcar en particular o a una corta secuencia de éstos, poseyendo alta especificidad en el recono-

cimiento. Debido a su multimericidad tienen la capacidad de aglutinar células que exhiben como azúcar de membrana aquél para el cual son características, también pueden precipitar carbohidratos. (Sharon, 1977).

La aglutinación ha sido el método más común para la evaluación de azúcares de membrana en células libres. Igualmente se pueden usar marcadores acoplados a lectinas para detectar ultraestructuralmente los azúcares. Una de estas técnicas es la unión de la enzima peroxidasa de rábano a la lectina y el posterior revelado con una reacción que deja un depósito electrondenso que puede ser detectado por Microscopia Electrónica de Transmisión. (Berhardhard y Avrameas, 1971).

La laminina es una glicoproteína de membrana basal que media el anclaje de células epiteliales y endoteliales al colágeno tipo IV (Terranova et al., 1980). Esta proteína consta de distintas cadenas polipeptídicas con un peso de aproximadamente 220 Kdaltons para la cadena liviana o B y 440 Kdaltons

para la cadena pesada o A y una porción de carbohidratos que representa un 15% en peso de la macromolécula.

Recientemente se ha demostrado que el suero de pacientes con mal de Chagas en fase aguda y monos **Rhesus** infectados con **Trypanosoma cruzi** contienen IgM e IgG que reaccionan con la laminina, pero no con otros compuestos tisulares conectivos como colágenos tipos I, 111, IV y V, fibronectina, proteoglicano de sulfato de heparina (BM-1) o condronectina (Szarfman et al., 1982). Resultados similares se han reportado para pacientes con diferentes formas de leishmaniasis americana cutánea o con mal de Chagas en fase crónica (Avila et al., 1984), en pacientes infectados con **Trypanosoma rangeli** (Avila et al., 1986) y en monos **Rhesus** infectados experimentalmente con **T. rhodesiense** (Szarfman et al., 1982). Se ha propuesto que en el proceso de infección de los kinetoplastidios la producción de una proteína similar a la laminina o la incorporación

de la proteína proveniente del hospedador puede permitir al parásito interactuar con los tejidos del hospedador, asimismo se ha demostrado que la modificación en el contenido de azúcares de la membrana modula la capacidad de asociación de **T. cruzi** con células hospedadoras (Villalta y Kierszenbaum, 1985).

Utilizando técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas se presentan resultados que muestran que la composición de azúcares de membrana varía entre las formas de cultivo de **T. cruzi** y de *Leishmania* spp en cuanto a su distribución y que **T. cruzi** exhibe una proteína reconocida con anticuerpos anti-laminina en la fase tripomastigote pero no en epimastigote, así mismo **Leishmania** spp exhibe un anticuerpo de membrana con similares características y con localización específica en sus formas, amastigotes y promastigotes.

MATERIALES Y METODOS:

Fueron utilizadas las cepas EP, FL, A-35, Y, Ya, DS y 0-86 de **Trypanosoma cruzi**, representantes de los zimodemos 1 y 2 cuyas características han sido descritas con anterioridad (Avila et al., 1981, 1983). Los epimastigotes fueron cultivados en Medio Esencial Mínimo suplementado con suero fetal bovino al 2,5% (Avila et al., 1979) o en medio de infusión de hígado-triptosa modificado (Avila et al., 1979) y colectados por centrifugación (2400g por 20 min a 4°C). Los tripomastigotes fueron obtenidos de ratones NMRI/VIC inoculados con $0,1 \times 10^6$ parásitos por ratón con un período de incubación de 10-20 días. La sangre obtenida del plexo axilar fue centrifugada en gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque (Hungerer et al., 1981) o en gradientes de Percoll (Fish et al., 1982). También fueron obtenidos tripomastigotes de cultivos de células Vero; con más de 20 pases como se ha descrito (Piras et al., 1982).

Promastigotes de las cepas EB, AZV, MP y LMA de *Leishmania mexicana*, NR de *L. brasiliensis* y HM de **L. garnhami** fueron cultivados a 28°C. Los amastigotes fueron obtenidos de hamsters dorados inoculados en el dorso de cada pata trasera con 1×10^5 pa-

rásitos. Después de 1-3 meses de infección las lesiones establecidas fueron disectadas, homogeneizadas y los amastigotes purificados en gradientes de Percoll como se ha descrito anteriormente (Coello y Urbina, 1982).

Los anticuerpos contra laminina fueron obtenidos en conejos, utilizando un antígeno de laminina de tumor murino Engelbreth-Holm-Swarm (Avila et al., 1984). La especificidad del antisuero fue verificada utilizando inmunodifusión de Ouchterlony con anticuerpos purificados para laminina (100µg/ml) y fue probado contra laminina, fibronectina y colágeno tipo IV. Utilizando esta técnica se obtuvo una sola banda de precipitación entre la laminina y el anticuerpo. Como otro control de especificidad, antisuero anti-laminina (100µg/ml de proteína) al ser incubado con laminina purificada (500µg/ml) redujo su inmunoreactividad en la prueba de ELISA en más del 95%. Usando inmunolectroforesis una línea sencilla de precipitación fue obtenida.

En el marcaje inmunocitoquímico con oro coloidal para microscopía electrónica las células fueron usadas bien sin fijar o fijadas con glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 por 30 min a temperatura ambiente.

Los parásitos fueron lavados cuidadosamente con buffer fosfato 0,01M NaCl 0,85% pH 7,2 (PBS) fresco, incubados por 60 min con 50µl de anti-laminina (solución 1:20 de antisuero 65pg/ml proteína) y lavados tres veces de nuevo con PBS. El sedimento fue entonces expuesto a 50µl de una dilución 1:2 en PBS de inmunoglobulina carnero anti-conejo acoplada a esferas de oro coloidal de 20 nm de diámetro, (donada por el Dr. Jan de Mey, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica) por 60 min. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces en PBS.

Las lectinas Concanavalina A (ConA) y aglutinina de **Limulus polyphemus** (LPA) (SIGMA) fueron disueltas a concentraciones de 50 y 100µg/ml respectivamente en buffer PBS. Estas proteínas reconocen específicamente la presencia de los azúcares: α-D-Manosa y ácido N-acetilneuramínico. La LPA se obtuvo conjugada a biotina.

Para analizar la presencia de azúca-

res de membrana se sometieron los parásitos a tres lavados en PBS y luego se incubaron con la lectina correspondiente durante un período de 30 min, al cabo del cual se llevaron a cabo otros tres lavados y se incubó con un marcador secundario: para la ConA se utilizaron 100µl de peroxidasa de rábano a 100µg/ml, en tanto que para la LPA se utilizaron 100NI del complejo avidina-biotina-peroxidasa en una concentración de 50µg/ml por un período de 30 min. al cabo de los cuales se procedió a lavar nuevamente. Se reveló la presencia de los complejos formados mediante la incubación con 100µl de una solución de 1mg de Diaminobencidina en 2 ml de buffer tris HCl 0,01 M NaCl 0,85% pH 7,2 (TBS) y 5µl de H2O2 al 30% durante un período de 30 min. Posteriormente se lavaron los parásitos con agua tridestilada desionizada.

Luego se procedió al procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión: Se post fijaron en una solución de tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato 0,1M pH 7,2 por 30 min, se lavaron y se incluyeron en agar al 1,5% y se cortaron los sedimentos obtenidos por centrifugación. Se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron en resina LX-1 12. Las muestras se cortaron en secciones de 44-90 nm y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se observaron en un microscopio Hitachi H-500 a 75 KV y se tomaron microfotografías.

RESULTADOS:

Los anticuerpos anti-laminina reconocieron un epitopo presente en la laminina en una zona específica de la cara externa de la membrana plasmática de tripomastigotes de **T. cruzi** provenientes de ratones infectados. Los tripomastigotes provenientes de cultivo de células Vero también mostraron marcaje, sin embargo fue homogéneo sobre toda la superficie de los parásitos. Es de hacer notar que sólo un bajo porcentaje de tripomastigotes derivados de células Vero fueron positivos para la reacción.

Los tripomastigotes sanguíneos reaccionaron en forma positiva independientemente al zimodemo que pertenecieran, en tanto que los epimastigotes

de cultivo carecieron totalmente de inmunorreactión.

Los tripomastigotes perdieron la inmunorreactividad para laminina en un período de dos días en medio de cultivo LIT modificado al llevarse a cabo el paso de tripomastigote a epimastigote.

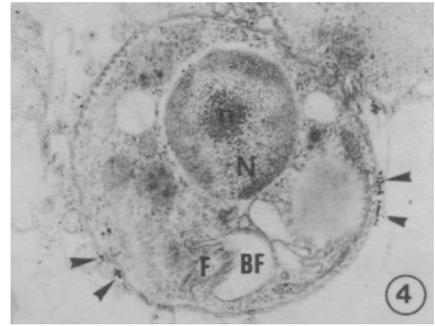
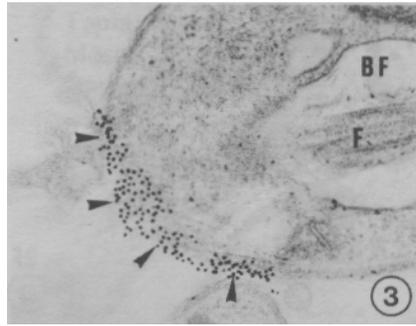
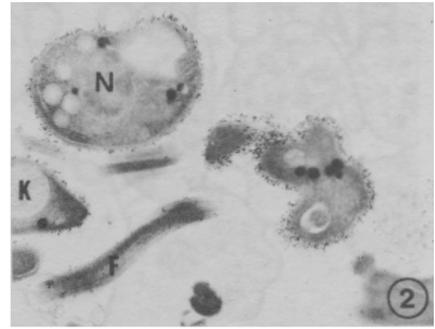
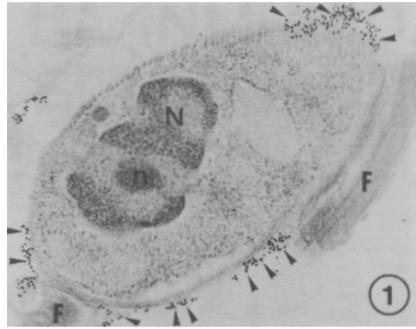
Se observó inmunorreactividad para laminina tanto en amastigotes como promastigotes de *Leishmania spp* circunscrita a los labios de la bolsa flagelar en los promastigotes. Las formas amastigotes además exhibieron inmunorreactividad en la superficie celular opuesta a la salida del flagelo, ésta es normalmente la zona de adhesión a la vacuola parasitofora de la célula hospedadora. La reactividad anti-laminina fue encontrada en todas las cepas de *Leishmania spp* estudiadas.

En el análisis con lectinas se observó una marca electrondensa de distribución homogénea en toda la membrana plasmática de los epimastigotes de *T. cruzi* (cepas A-35, DS, ES, FL y Ya) estudiados para la Concanavalina A. En *Leishmania spp* el resultado es muy distinto en cuanto a la distribución de la α -D-manosa: Para todos los promastigotes de las cepas estudiadas (AZV y MP de *Leishmania mexicana* y HM de *L. garnhami*) se demostró un marcaje no universal con la ConA y aparentemente no homogéneo en toda la membrana plasmática; asimismo, al utilizar LPA se encontró presencia de ácido N-acetilneuramínico en una pequeña proporción de los epimastigotes de cultivo de *T. cruzi* estudiados (cepas ES y 0-86).

Se observó marcaje endógeno para peroxidasa en todos los parásitos estudiados; presumiblemente por la presencia de peroxidasa activa en vesículas de estas células.

DISCUSION:

Este estudio inmunocitoquímico demuestra la distribución de algún(os) epitopo(s) presente(s) en la laminina que son exhibidos en la membrana plasmática de algunos tripanosomatidios en zonas específicas y que en el género *Trypanosoma* la presencia del epitopo es específica para cada estadio morfológico. Estos hallazgos están sustentados por los de Szarfman et al., (1982) quienes encontraron que las IgM e IgG contra laminina de monos



Localización inmunocitoquímica de componentes asociados a la membrana citoplasmática de diversas formas biológicas de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania americana*.

infectados con *T. cruzi* son altamente reactivas con tripomastigotes pero no con epimastigotes cuando se analizan por inmunofluorescencia.

La presencia de inmunorreactividad en los tripomastigotes provenientes de cultivo de células VERO demuestra que los parásitos están sintetizando proteína(s) tipo laminina y que no está(n) siendo incorporada(s) del hospedador.

La desaparición de la inmunorreactividad al llevarse a cabo el cambio morfológico de tripomastigote a epimastigote indica indirectamente que en esta transición hay rápidos e importantes cambios en la composición de la membrana.

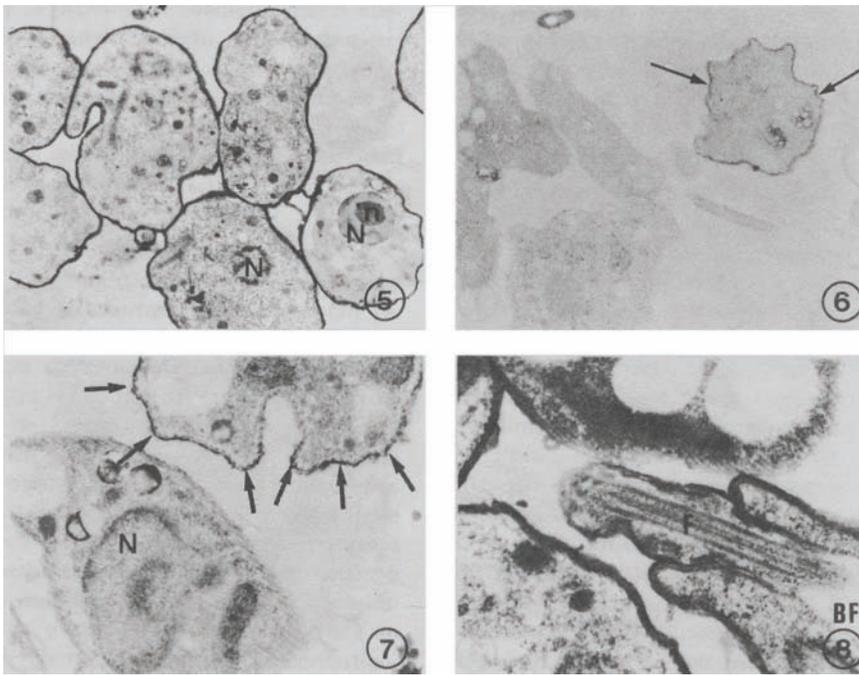
La distribución de proteínas inmunorreactivas con anticuerpos anti-laminina en la membrana plasmática es, sin embargo, diferente para *Leishmania spp* donde se localiza en los labios de la bolsa flagelar y en el lado opuesto a la salida del flagelo y para *T. cruzi* donde se localiza en la zona del velo flagelar. La razón celular de este hecho está aún por establecerse.

La presencia de este tipo de proteínas en los tripanosomatidios pudiera

explicar los títulos de anticuerpos anti-laminina en pacientes chagásicos y leishmánicos. La carencia de este tipo de proteína al cambiar los tripomastigotes a fase epimastigote pudiera tener una función celular específica. Como la laminina juega un papel importante en el anclaje de las células epiteliales y endoteliales al colágeno tipo IV, pudiera proponerse que las proteínas tipo laminina encontradas en los parásitos pueden tener un valor adaptativo; mediando el reconocimiento de membrana en el proceso infeccioso. En el caso particular de *Leishmania* este tipo de molécula pudiera jugar un papel importante en la unión del amastigote a la membrana fagolisosomal, dada la ubicación demostrada y en función de hallazgos recientes (Bretaña et al., 1983).

La presencia diferencial de residuos α -D-manosil entre los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* sugiere un comportamiento marcadamente diferente de la membrana plasmática.

La presencia de residuos de ácido N-acetilneuramínico en una baja proporción de los individuos de las cepas estudiadas hace suponer que este azúcar puede ser exhibido de manera no



Localización inmunocitoquímica de componentes asociados a la membrana citoplasmática de diversas formas biológicas de Trypanosoma cruzi y Leishmania americana.

permanente en la membrana o ser exhibido debido a diferencias clonales.

Estas diferencias pudieran tener incidencia en las características de los procesos infectivos, como ya ha sido reportado para la N-acetilglucosamina (Villalta y Kierszenbaum, 1985) dado que la composición de carbohidratos del glicocálix modifica la carga de la membrana y su comportamiento en los procesos de asociación e internalización con las células parasitadas. Estudios actualmente en desarrollo utilizando éstas y otras lectinas en diferentes formas morfológicas de **Trypanosoma** y **Leishmania** nos ayudarán a comprender mejor el comportamiento molecular de la membrana plasmática que es de vital importancia en la relación hospedador-parásito.

BIBLIOGRAFIA:

- Avila, J. L., Bretaña, A., Casanova, M. A., Avila, A., y Rodríguez, F. 1979.- *Trypanosoma cruzi*: Defined medium for continuous cultivation of virulent parasites. *Experimental parasitology* 48, 27-35.
- Avila, J. L., Avila, A., y Muñoz, E. 1981.- Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 3, 769774.
- Avila, J. L., Pérez-Kepp, R., y Bretaña, A. 1983.- A minimal medium for the cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of General Microbiology* 29, 285-291.
- Avila, J. L., Rojas, M., y Rieber, M. 1984.- Antibodies to laminin in american cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 43, 402-406.
- Avila, J. L., Rojas, M., Velázquez-Avila, G., y Rieber, M. (1986).- Prevalence of anti-laminin antibodies in tropical geographic areas. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, en imprenta.
- Berhardhard, W., y Avrameas, S., 1971.- Ultrastructural visualization of cellular carbohydrates by means of Concanavalin A. *Experimental Cell Research* 64, 232.
- Bretaña, A., Avila, J. L., Lizardo, G., Convit, J., y Rondón, A. J., 1983.- Comparative ultrastructure of experimental nodules and diffuse human cutaneous lesions in American leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 55, 377-385.
- Coello, N., y Urbina, J. A., 1982.- Isolation and purification of *Leishmania brasiliensis* amastigotes: Its application to the comparative study of cell surface properties of amastigotes and promastigotes, NR stock. *Acta Científica Venezolana* 33, 144-151.
- Fish, W. R., Lookerm, D. L., Marr, J. J., y Berens, R. L. 1982.- Purine metabolism in the bloodstream form of *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochimica et Biophysica Acta* 719, 223-231.
- Hungerer, K.D., Schaunburg, C., y Dionisius, J. 1981. New methods for the isolation of bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology* 67, 967-969.
- Piras, R., Piras, M. M., y Henríquez, D. 1982.- The effect of inhibitors of macromolecular biosynthesis on the in vitro infectivity and morphology of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 6, 83-92.
- Sharon, N. 1977.- Lectinas. *Investigación y ciencia*. Ago. 1977, 90-100.
- Szarfman, A., Terranova, V. P., Rennard, S. I., Foidart, J. M., Lima, M. F., Scheinman, J. I., y Martin, G. R. 1982.- Antibodies to laminin in Chagas' disease. *Journal of Experimental Medicine* 155, 1161-1171.
- Terranova, V. P., Rohrbach, D. M., y Martin, G. R. 1980.- Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22, 719-726.
- Villalta, F., y Kierszenbaum, F. 1985.- Role of surface N-acetylglucosamine residues on host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta* 845, 216-222.

Este trabajo ha sido financiado por el CONICIT, proyecto S1-1617.