

INTERACCIÓN DE PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana* CON COLÁGENA

José Luis Rosales-Encina^{*,1}, Edgar Rangel-López,^{*,†} Rosalía Lira-Carmona,[§] Sara Elisa Herrera-Rodríguez,^{*} Mariam Guapillo-Vargas,^{*} Arturo González-Robles,^{*} Lydia Baylón Pacheco,^{*} Patricia Talamás-Rohana,^{*}
e-mail: rosales@cinvestav.mx

^{*}Departamento de Patología Experimental, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ave. IPN No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, G.A. Madero, México, D.F. 07360, México. [†]Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, México, D.F., 4080 México. [§]Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F., 04510, México.

La leishmaniosis es una enfermedad producida por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, la cual inicia cuando los promastigotes son depositados en la dermis a través de la picadura del insecto vector, para posteriormente ser fagocitados por macrófagos e iniciar la infección. Un aspecto poco estudiado del inicio de la infección, es la interacción del parásito con los componentes de la matriz extracelular antes de que sean internalizados por los macrófagos. Se ha demostrado que esta interacción se lleva a cabo en etapas tempranas de la infección, ya que al cultivar promastigotes con criocortes de piel de ratón, se observó que el parásito interacciona con fibras de colágena de la piel en tiempos de 24-48 hr. Por otro lado, los promastigotes muestran adhesión y migración a través de las fibras de la colágena cuando éstos son incubados en geles de colágena tipo I nativa. Además, también los promastigotes interaccionan con colágena desnaturalizada en forma específica. La interacción, tanto con la colágena nativa como con la desnaturalizada es específica y saturable, lo que sugiere la presencia de moléculas de superficie capaces de reconocer a la colágena [1].

Con el fin de estudiar la interacción parásito-colágena y su relevancia en el desarrollo de la enfermedad, se purificaron por cromatografía de afinidad 5 proteínas (120, 58, 30, 25 y 18 kDa) de promastigotes de *L. mexicana* con capacidad de unir colágena (LmCBP). Para continuar con la caracterización de estas proteínas, se produjeron anticuerpos policlonales anti-LmCBPs, los cuales se utilizaron en el tamizaje de una biblioteca de expresión de cDNA construida en el vector lambda ZAP II. De este tamizaje se seleccionó una clona altamente positiva (LmCBP120), cuyo inserto de 1828 pb codifica para una proteína de 480 aa que contiene dentro de su secuencia 11 repetidos de 20 aa. Para analizar la función de LmCBP120, el inserto de la clona pBSLmCBP120 se subclonó en el vector pRSETB para obtener el plásmido pRSLmCB120. Con este plásmido se transformaron bacterias y la proteína recombinante His::LmCBP120 (80 kDa) se purificó después de la inducción con IPTG. La proteína recombinante se utilizó para generar anticuerpos anti-His::LmCBP120, los cuales reconocen una proteína de 120 kDa en extractos totales de promastigotes de *L. mexicana*.

Los anticuerpos anti-His::LmCBP120 se utilizaron para analizar la distribución subcelular de la proteína nativa por inmunofluorescencia indirecta. En promastigotes permeabilizados, la fluorescencia se localizó cerca del núcleo y el cinetoplasto, mientras que no se detectó marca alguna en promastigotes no permeabilizados. Estudios de microscopía electrónica de transmisión, mostraron que el anticuerpo se localizó en una estructura membranosa que rodea al núcleo, entre el núcleo y el cinetoplasto.

Debido a que los anticuerpos anti-His::LmCBP120 reconocen una proteína intracelular con capacidad de unirse a la colágena, se investigó si la unión del parásito a la colágena tiene algún efecto en la cantidad y localización subcelular de la proteína LmCBP120. Para ello se cultivaron promastigotes en cubreobjetos cubiertos con colágena tipo I de bovino. A diferentes tiempos de cultivo, los parásitos se fijaron y permeabilizaron o solamente se fijaron sin permeabilizar, para después incubarlos con los anticuerpos anti-His::LmCBP120 o con anticuerpos anti-promastigotes. A tiempo 0 h, la marca de los anticuerpos anti-His::LmCBP120 se encontró dentro de los promastigotes permeabilizados, en contraste con los parásitos no permeabilizados en los cuales no se detectó marca alguna. Por el contrario, parásitos permeabilizados y no permeabilizados se marcaron con los anticuerpos anti-promastigotes. Conforme progresó el tiempo de incubación con la colágena se hizo evidente que la cantidad de antígeno se incrementa y que su localización varía, de tal forma que después de 24 y 72 h de interacción la proteína LmCBP120 se localizó en la superficie de parásitos permeabilizados y no-permeabilizados. No se detectaron cambios en el caso de parásitos incubados con anticuerpos anti-promastigotes.

Ya que la colágena es uno entre varios componentes de la matriz extracelular, fue importante determinar si la translocación de LmCBP120 a la superficie del parásito era una respuesta específica a la interacción con la colágena o si otros componentes de matriz extracelular tenían el mismo efecto en la localización subcelular de la proteína. En este caso, los promastigotes se incubaron sobre laminina, fibronectina o albúmina. De los resultados

obtenidos se observó que no hubo cambios en el patrón de tinción de la proteína después de que los parásitos fueron cultivados por diferentes periodos sobre las tres proteínas analizadas. La marca permanece dentro del parásito en todas las condiciones, confirmando que la redistribución de la proteína LmCBP120 hacia la superficie es un proceso dependiente de la interacción del parásito con la colágena. Además, la distribución subcelular de LmCBP120 sugiere que puede ser un componente del sistema de transporte vesicular.

Por otro lado, ratones inmunizados con la proteína recombinante His::LmCBP120 mostraron una reducción del 35% en la lesión producida por la inoculación de promastigotes en el cojinete plantar. Los resultados anteriores indican que las proteínas de unión a colágena, particularmente la proteína LmCBP120 puede jugar un papel importante en el mecanismo de patogenicidad y en el desarrollo de la leishmaniasis.

[1] Rosalía Lira, José Luis Rosales-Encina, and Carlos Argüello, *Experimental Parasitology*, 85 (1997) 149-157.