

Impacto de nuevas metodologías en el estudio de parásitos

I. Introducción

Guadalupe Ortega-Pierres*

Los parásitos constituyen un grupo de organismos que tienen una distribución cosmopolita y se ha reportado que existen bastantes más organismos parásitos que aquellos de vida libre en nuestro mundo actual.

En términos generales, la vida parasitaria ha sido muy exitosa ya que ha evolucionado de manera independiente en casi todos los *phyla* animales desde los protozoarios hasta los artrópodos y cordados, así como en un gran número de plantas y hay algunos casos en que los parásitos alojan a otros parásitos. Estos organismos han desarrollado maneras de vivir en huéspedes que proveen ambientes nutricionalmente abundantes, pero paradójicamente, muy hostiles desde el punto de vista inmunológico. Así, los parásitos muestran una gran combinación de adaptaciones bioquímicas, fisiológicas y nutricionales únicas de su grupo, así como formas de evadir la respuesta inmune y sus consecuencias, así mismo su ecología es más compleja en comparación con la de organismos libres. Estas características tan distintivas de los organismos parásitos, han atraído la atención no sólo de parasitólogos sino también de biólogos moleculares, bioquímicos, fisiólogos, inmunólogos y epidemiólogos.

Es claro que las enfermedades parasitarias constituyen un aspecto muy importante en la vida de mucha gente. Esto último, tanto en países en vías de desarrollo en donde la prevalencia de esas enfermedades es muy basta, como en países desarrollados en los cuales, de acuerdo con reportes recientes, se han incrementado los casos de

individuos que alojan organismos parásitos protozoario y algunos helmintos.

La morbilidad y la mortalidad causada en diferentes poblaciones por enfermedades parasitarias tienen un impacto importante en la economía de los países ya que la vida productiva de los individuos, animales y plantas, considerando éstos últimos como fuentes de alimentación, se ven seriamente mermadas por la infección con parásitos. Así, uno de los papeles importantes de los parasitólogos, junto con colegas de otras disciplinas científicas, es el contribuir a disminuir el número de muertes e infecciones causadas por organismos parásitos, con esto se tiene una oportunidad única para colaborar en la erradicación global de enfermedades transmisibles, así como el hacer posible un uso más eficiente de los recursos disponibles actualmente en la tierra.

En este contexto, el estudio de la biología de los parásitos y la relación que éstos establecen con sus huéspedes, así como de los reservorios y vectores que alojan a estos organismos empleando un enfoque multidisciplinario y aplicando herramientas novedosas acorde con avances tecnológicos en varias áreas, ha permitido contribuir al conocimiento de sus ciclos de vida, a desarrollar métodos útiles para el diagnóstico de estos, a diseñar maneras para prevenir su transmisión, así como a curar las infecciones y eventualmente erradicar las enfermedades producidas por estos organismos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos colectivos de un gran número de científicos en el mundo entero, aún quedan muchos aspectos básicos por estudiar en los parásitos. Estos

* Investigador titular. Departamento de *Genética y Biología Molecular*, CINVESTAV-IPN
Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Guadalupe Ortega Pierres, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados IPN Apartado Postal 14740. México, D. F. 07000. e-mail: gortega@gene.cinvestav.mx.

incluyen mecanismos de patogenia, factores de estos organismos que inducen respuestas inmunes en el huésped, formas en que éstos penetran en células o tejidos del mismo, expresión genética y especiación en estos organismos, identificación de algunas de sus moléculas con el fin de desarrollar tratamientos más efectivos, así como vacunas, y también aquellos que permitan estudiar aspectos evolutivos de estos organismos.

En nuestro país existen varias regiones en donde la población padece de enfermedades parasitarias mermando no solo su salud sino el desarrollo integral de sus individuos. Esta ha sido la causa

más directa por la que se cuenta con una gran tradición en el estudio de parásitos en varias Instituciones a nivel nacional.

Considerando esto último, se invitó a participar en este simposium a investigadores de vanas instituciones de investigación en nuestro país, para que presentaran sus estudios sobre parásitos de importancia en salud pública en México y también en otros sitios del orbe, en los cuales han aplicado metodología de vanguardia. Estos estudios sin duda han tenido un impacto importante en el conocimiento de los organismos parásitos, así como en el control de las enfermedades que producen.

II. Diseño y construcción de vectores para la transformación estable de *Entamoeba histolytica*

Alejandro Alagón*, Arantxa Cortés**, Felipe Olvera*, Alejandro Olvera*,
Antonio González**, Paul Lizardi*

Introducción

Entamoeba histolytica es un protozooarioparásito intestinal humano, de comportamiento patógeno; es el agente etiológico de la amibiasis. El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* comprende cuatro estadios consecutivos: trofozoitos, prequistes, quistes y formas metaquisticas. La investigación se ha centrado en las formas quísticas, por las que se disemina y en los trofozoitos, que producen el cuadro patológico.¹

La amiba histolítica es un organismo eucariote atípico (Cuadro I). Desde un punto de vista estructural, *Entamoeba histolytica* es un eucariote muy simple, ya que no tiene mitocondrias, peroxisomas, ni microtúbulos citoplásmicos. Tampoco tiene aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico liso o rugoso bien desarrollados. Bioquímicamente se desvía, de manera importante, de los eucariotes más complejos; por ejemplo, carece de hemoproteínas,

glutación, ciclo de Krebs, vía colateral de las pentosas y glucólisis no está regulada alostéricamente. Asimismo, su actina y ubiquitina son altamente divergentes. La organización de sus ácidos nucleicos presenta también características particulares, ya que no posee histonas típicas, tienen muy pocos intrones, los extremos 5' no traducidos de los RNAs mensajeros son muy cortos y los genes ribosomales (rDNA) están localizados de manera exclusiva en plásmidos extracromosomales circulares (alrededor de 200 por célula).

Además, en *Entamoeba histolytica* las vías lisosomal y secretoria no están separadas, es decir, un mismo tipo de vesículas realiza funciones digestivas y de secreción constitutiva. Es posible, sin embargo, que exista una vía separada para la secreción inducida. También se sabe que la patogenicidad y otros fenómenos vitales de la amiba dependen de su gran actividad secretoria.¹ Resulta pues, muy interesante, preguntarse cómo

* Instituto de Biotecnología, UNAM Cuernavaca, México.

** Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, España.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Alejandro Alagón. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, México. Tel. (52-73) 114900; Fax (52-73) 172388, E-mail: alagon@ibt.unam.mx

es que funciona la maquinaria secretoria de *Entamoeba histolytica*. Además, la respuesta a esta pregunta podría dar elementos en el conocimiento del desarrollo filogenético de las estructuras y moléculas que participan en el movimiento intracelular de las proteínas.

Material y métodos

El cultivo de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (cepa HK9) se realizó de manera axénica en medio TYI-33.⁴ Todos los reactivos y enzimas utilizados fueron de la mejor calidad disponible. Las manipulaciones de los ácidos nucleicos fueron convencionales.^{5,6}

Cuadro I. Algunas peculiaridades de <i>Entamoeba histolytica</i>
<p>Morfología y compartimentalización: * Carece de mitocondrias y peroxisomas. * Tiene retículo endoplásmico y aparato de Golgi poco desarrollados. * Sus vesículas digestivas no se distinguen de las secretorias constitutivas.</p> <p>Metabolismo: * Carece de ciclo de Krebs, vía colateral de las pentosas y proteínas con grupo heme. * Posee cinasas dependientes de pirofosfato. * Su glicólisis no está regulada alostericamente. * No sintetiza glutatión. * Tiene una ubiquitina altamente divergente.</p> <p>Organización del DNA y RNA: * La estructura de su cromatina y sus histonas, es atípica. * Sus genes ribosomales (rDNA) se localizan en plasmidos circulares extracromosomales. * La mayoría de sus genes no tienen intrones * Los extremos 5' de sus RNAs mensajeros son extremadamente cortos. * La transcripción de sus mRNAs inicia en la secuencia consenso ATTCA o ATCA. * Sus mRNAs tienen un motivo TATA, bastante atípico, más o menos 30 nucleótidos corriente arriba del inicio de la transcripción. * En el extremo 3' no traducido de sus mRNAs hay un motif pentanucleotídico TA(A/T)TT que funciona pautalmente como la señal de terminación de la transcripción</p>
Basado en ^{2 y 3}

Resultados

Primera estrategia para construir un vector de transformación de *Entamoeba histolytica*

El vector incluye un gene cuyo producto inactiva a un antibiótico, la higromicina B, que debe resultar en resistencia al mismo por parte de las amibas transformadas. Para hacer posible la transcripción del gene que codifica la fosfotransferasa de higromicina B, se clonó delante una secuencia de DNA con actividad promotora en *Entamoeba histolytica* (la del de gene de actina) y, detrás, una señal de poliadenilación (la de la proteína ribosomal L21). La secuencia promotora y la señal de poliadenilación fueron obtenidas por clonación, por reacción de la polimerasa en cadena (PCR), de la región comprendida entre los genes que codifican para la proteína L21 y una de las actinas,⁷ que tiene un tamaño aproximado de 2.4 kb (Figura 1A).

Para conseguir transformantes que puedan tener la oportunidad de replicarse de manera autónoma en los trofozoitos ambianos transformados, insertamos en la construcción un origen de replicación episomal (el mismo que para los vectores descritos abajo). No puede excluirse, sin embargo, que el gene de la fosfotransferasa pudiera integrarse por recombinación homóloga entre el gene de actina y el de la proteína L21. El mapa de este vector, pBSSK(-)AHPHL-ARS1, se esquematiza en la figura 1B.

Segunda estrategia para construir vectores de transformación de *Entamoeba histolytica*

Esta serie de vectores plasmídicos incluyen buena parte del cistron del RNA ribosómico con una mutación, producida *in vitro*, en el dominio

Hace algún tiempo nos planteamos varias estrategias para acercarnos al estudio de la vía secretoria de *Entamoeba histolytica*: (a) la clonación y caracterización de genes que codifican para proteínas que participan en el tráfico intracelular y la vía secretoria, (b) la caracterización de alguna proteína secretoria, su clonación, expresión y producción de anticuerpos, a fin de utilizarla como marcador en futuros estudios, y (c) iniciar el desarrollo de un sistema de transformación genética del parásito para aplicarlo a la disección genética y molecular de sus rutas de secreción.

En este trabajo presentamos el diseño y la construcción de dos tipos de vectores con los que pudiera lograrse transformación estable de la amiba histolítica.

menor 3' de la subunidad ribosomal pequeña. Así, al transcribirse el cistron mutado, producirá subunidades de RNA ribosomal pequeñas (SSUrRNAs) resistentes a la acción de higromicina B.

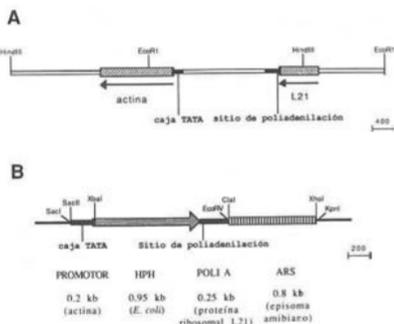


Figura 1. A. Mapa de la región cromosómica donde se localizan, de manera contigua, los genes de actina y de la proteína ribosomal L21.⁷ Las regiones, rellenas en negro, se utilizaron en el vector pBASK(-)AHPHL-ARS1 para enmarcar al gene de la HPH. Figura 1B. Mapa del vector pBSSK(-)AHPHL-ARS1. Se indican el origen y el tamaño de las diferentes regiones que componen el gene de la fosfotransferasa de higromicina B.

Los genes ribosomales de *Entamoeba histolytica* se encuentran en un episoma circular extracromosomal de 24.5 kb del que existen 200 copias por célula;⁸ al parecer el episoma puede replicarse autónomamente.^{9, 10}

Si bien, no se ha descartado aun la presencia de posibles copias cromosomales, el episoma parece ser el principal depósito de estos genes.

En la cepa HM1, cada episoma contiene dos cistrones ribosomales invertidos de 5.2 kb (Figura 2). Los cistrones están separados por regiones de DNA de 3.9 y 10.3 kb que contienen secuencias repetidas en tándem. Cada una de las regiones intercistricónicas tienen elementos estructurales para funcionar como orígenes de replicación del episoma, ya que en levaduras funcionan como tales.^{10, 11}

El dominio menor 3' de la subunidad pequeña ribosomal (SSUrRNA), que comprende los últimos 150 nucleótidos, participa en muchas de las funciones ribosomales.¹² Entre los sitios funcionales del dominio están: la secuencia anti Shine-Dalgarno .

la secuencia que promueve el inicio de la traducción, el sitio de corte por colicina E3, así como los sitios que determinan la sensibilidad a kasugamicina, kanamicina, paromomicina e higromicina B. En *Tetrahymena thermophila*, la resistencia a higromicina B está asociada a una transición de una U por una C en la posición 1495.¹³

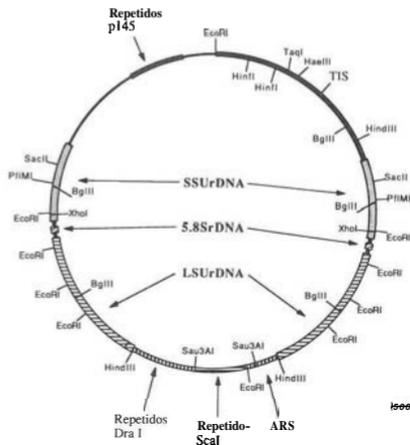


Figura 2. Mapa del episoma ribosomal de *Entamoeba histolytica*, cepa HM1. SSUrDNA = regiones codificantes de la subunidad pequeña ribosomal; 5.8SrDNA = regiones codificantes de la subunidad 5.8 ribosomal; LSUrDNA = regiones codificantes de la subunidad grande ribosomal; TIS = sitio de inicio de la transcripción del cistron ribosomal de la derecha; ARS = secuencias de replicación autónoma.¹⁰ Se indican, también, las posiciones de algunos elementos repetitivos.

Dado que *Entamoeba histolytica* es muy sensible a higromicina B y que tiene una U en su SSUrRNA en una posición equivalente a la de *Tetrahymena thermophila*,¹⁴ (nuestros resultados no publicados), decidimos construir vectores con la mutación en el gene SSUrRNA que debe conferir resistencia a higromicina B a los trofozoitos transformados. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en la transformación tanto de un procarionte como de un eucariote unicelular.¹⁵⁻¹⁸ Para el diseño racional de este tipo de vectores fue importante definir y caracterizar el sitio de inicio de transcripción del cistron ribosomal.¹⁴

La estrategia para la construcción de los dos vectores del tipo episomal se da en la figura 3. El primer vector de la serie fue construido a partir de dos segmentos clonados del episoma ambiano. El primero, en la construcción pBSSK(-)(EcoR1-EcoR1)6.8rDNA, incluye a casi la totalidad del gene de la SSURrRNA y 5 kb de la región corriente arriba del mismo.

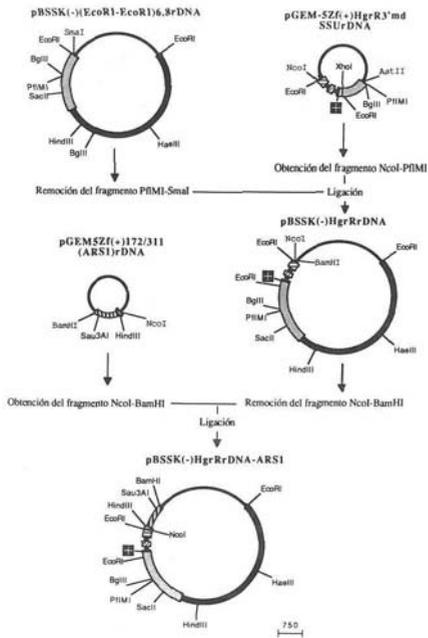


Figura 3 Construcción de los vectores pBSSK(-)HgrRrDNA y pBSSK(-)HgrRrDNA-ARS1. Ver el texto para detalles. El signo "+", encerrado en un cuadro, indica la posición del sitio mutado para conferir resistencia a higromicina B.

Hacia la mitad de esta última se encuentra el sitio de iniciación de la transcripción y las regiones promotoras de la misma.¹⁹ Asimismo, arriba del sitio de inicio de la transcripción se encuentran unas secuencias repetidas, llamadas Hinf I. El segundo segmento clonado, en la construcción

pGEM-5Zf(+)-HgrR3'mdSSUrDNA, va desde la parte central del gene de la SSUrRNA al primer tercio de la LSUrRNA, por lo que incluye a todo el gene de la subunidad 5.8S y las correspondientes ITS (espaciadores internos transcritos). Sobre el segundo fragmento se llevó a cabo el cambio de la base específica para conferir resistencia a Higromicina B. La mutagénesis se llevó a cabo por PCR con oligonucleótidos conteniendo la base cambiada.²⁰ Para completar el vector pBSSK(-)HgrRrDNA, se empalmaron los dos segmentos, a través de un sitio único de restricción, sin perder el marco de lectura. De esta forma, el vector tiene todos los elementos necesarios para la transcripción y procesamiento del SSUrRNA. En principio, el fragmento con la mutación pudiera integrarse por recombinación homóloga, o bien, subsistir autónomamente si las regiones repetitivas Hinf I tienen actividad de ARS (secuencias de replicación autónoma).

El segundo vector de la serie, llamado pBSSK(-)HgrRrDNA-ARS1, se construyó añadiéndole al anterior una región episomal, clonada por PCR en la construcción pGEM5Zf(+)-172/311 (ARS1)rDNA, a la que se le ha demostrado actividad de ARS en levaduras.¹⁰

Los experimentos de transformación requieren de controles adecuados. Un control negativo muy importante es la transformación con un vector idéntico al transformante pero que no tenga el marcador de selección. Hemos construido tales vectores control reemplazando el segmento nativo, sensible a higromicina B, en ambos vectores episomales de transformación. El reemplazo se hizo empleando la enzima de restricción BsmI, que reconoce una secuencia no palindrómica, ya que el residuo mutado se localiza dentro de un segmento limitado por dos sitios BsmI que se dan la cara.

Discusión

En el desarrollo de vectores de transformación es muy importante la elección de un buen sistema de selección. En el caso de *Entamoeba histolytica*, resulta impráctico el empleo de antimetabolitos o de complementación de auxotrofías, ya que el organismo necesita de un medio muy rico para crecer. La alternativa que queda es la utilización de

algún antibiótico que sea letal en dosis baja y del que se tenga un gene inactivador bien caracterizado. La higromicina B²¹ reúne estas características y, además, el gene que codifica para la fosfotransferasa de higromicina se utiliza en la selección de transformantes, procariones y eucariotes, desde hace más de 10 años.²²

Los vehículos de transformación que hemos construido son novedosos y tienen un potencial muy importante. Son vehículos híbridos entre un plásmido bacteriano y el episoma amibiano, por lo que, en principio, podrían replicarse tanto en la ameba como en *Escherichia coli*. Es importante hacer notar que dos grupos lograron, en 1994, transfección transitoria de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*^{23, 24} y que, recientemente, el grupo de W. Petri logró transformar amebas de manera estable.²⁵ El vector empleado en el último reporte es muy similar al descrito en la primera estrategia descrita en este trabajo, pero utiliza al gene neo a fin de conferir resistencia al antibiótico G418.

Los vectores pBSSK(-)HgrRrDNA y pBSSK(-)HgrRrDNA-ARS1 (segunda estrategia), basados en el rDNA episomal de la ameba, tienen el potencial de ser utilizados también para la expresión de proteínas bajo el control del promotor de la RNA polimerasa I, que es la encargada de transcribir al transcrito ribosomal primario. Palmer y cols.,²⁶ han demostrado que si se introduce un sitio de entrada a ribosomas (IRES) en el extremo 5' de un transcrito de RNA polimerasa 1, se supera el bloqueo a su traducción.

Alternativamente, se pudieran utilizar los promotores, aun no caracterizados, de las hemolisinas codificadas en el cistron de rRNAs del plásmido amibiano.²⁷

Una técnica que hemos implementado es la del crecimiento clonal de amebas en placas de agar (Figura 4). Mueller y Petri²⁸ lograron hacerlo en jarras anaeróbicas. Nosotros lo hemos hecho con una eficiencia de donación del 50%, en una cámara anaeróbica [Forma Científica], con lo que podemos manejar simultáneamente decenas de cajas y revisarlas diariamente. Así, tenemos la capacidad de seleccionar directamente clona transformadas y cuantificar eficiencias. También abre la posibilidad de hacer réplicas para análisis de múltiples colonias de manera simultánea con técnicas estándar de biología molecular.

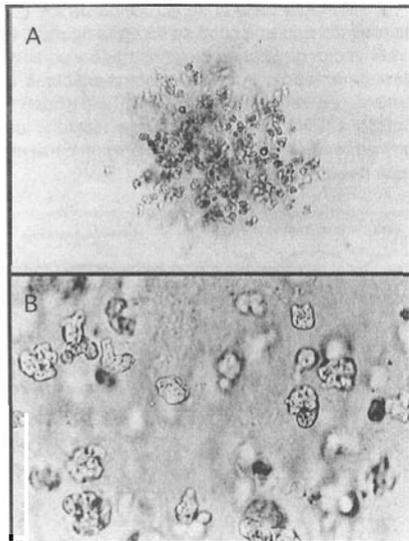


Figura 4. Crecimiento clonal de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en agar y bajo atmósfera anaeróbica.²⁸ A. Colonia de 72 horas. B. Observación de la colonia a mayor aumento

Estamos probando dos métodos para introducir los vectores en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, electroporación y lipofección. El primero ha sido utilizado con éxito en otros protozoarios parásitos como *Leishmania*^{29, 30} y *Trypanosoma*.^{31, 32} de hecho, fue el método utilizado para la transformación, transitoria y estable de la ameba histolítica.^{23 - 25} Estamos utilizando las condiciones de duración de pulso y voltaje descritas por el grupo de William Petri,^{24, 25} quien nos ha proporcionado sus vectores como controles positivos. Para la lipofección, estamos empleando Lipofectamina (una combinación de dos lípidos polycatiónicos), cada vez más usada para introducir ácidos nucleicos en células en cultivo, ya que en muchos casos es más eficiente y reproducible que la electroporación.³³ Los lípidos cargados positivamente forman liposomas y, a su vez, forman complejos con el DNA. Al contacto con las células, el complejo se fusiona con las membranas plasmáticas y transfiere el ácido nucleico hacia su interior. Pensamos que este método puede ser útil en la transformación de *Entamoeba histolytica*

dado que los trofozoítos tienen una membrana celular muy dinámica y poseen una actividad fagocítica elevada.

Entre los parámetros que estamos optimizando están la concentración de los vectores, la relación liposoma: DNA y el tiempo de exposición de los trofozoítos a los liposomas cargados con DNA.

En resumen, consideramos que contamos con todos los elementos necesarios para alcanzar, en el futuro cercano, un sistema un protocolo eficiente para transformar, de manera estable, trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Agradecimientos

Fuentes de financiamiento: DGAPA/UNAM (IN209692) y Comunidad Económica Europea (CII*-CT92-0017)

Referencias

1. **Martínez-Palomo A.** Biology of *Entamoeba histolytica*. En *Amebiasis*. Martínez-Palomo A (Ed.) Human Parasitic Diseases. Vol. 2. Elsevier. Amsterdam. 1986, pp 11-43.
2. **Bakker-Grunwaldt T, Westmann.** *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* 1993;9:27-31.
3. **Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas C, Tannich E.** Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol* 1993;12:925-933.
4. **Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC.** A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:431-432.
5. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
6. **Varios.** *Current Protocols in Molecular Biology on CD-ROM.* Ausubel, FM (Ed), Greene Publishing Associates, Inc and John Wiley & Sons, Inc. Version 3.5, New York, 1993.
7. **Petter R, Rozenblatt S, Nuchamowitz Y, Mirelman D.** Linkage between actin and ribosomal protein L21 genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;56:329-333.
8. **Huber M, Koler B, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S, Garfinkel L.** *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol* 1989;32 285-296
9. **Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS, Soldo AE.** Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool* 1989;36:455-458.
10. **Grodberg J, Salazar N, Oren R, Mirelman D.** Autonomous replication sequences in an extrachromosomal element of a pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5515-5519.

11. **Mittal V, Ramachandran S, Sehgal D, Bhattacharya A, Bhattacharya S.** Sequence analysis of a DNA fragment with yeast autonomously replicating sequence activity from the extrachromosomal ribosomal DNA circle of *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2777.
12. **Zimmermann RA, Cheryl LT, Wower, J.** Structure and function of rRNA in the decoding domain and at the peptidyltransferase center. En: *The Ribosome. Structure, Function and Evolution.* Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR (Eds.), American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1990, pp 331-347.
13. **Spangler EA, Blackburn EH.** The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotic paromomycin and hygromycin. *J Biol Chem* 1985;260:6334-6340.
14. **Ramachandran S, Bhattacharya A, Bhattacharya S.** Nucleotide sequence analysis of the rRNA transcription unit of a pathogenic *Entamoeba histolytica* strain HM-1:1MSS. *Nucleic Acids Res* 1993;21:2011.
15. **Lewicki BT, Margus T, Remme J, Nierhaus KH.** Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly in vivo. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol* 1993;231:581-593.
16. **Vannuffel P, Di Giambattista M, Morgan EA, Cocito C.** Identification of a single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance. *J Biol Chem* 1992; 267:8377-8382.
17. **Brown CM, McCaughan KK, Tate WP.** Two regions of the *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are important for decoding stop signals in polypeptide chain termination. *Nucleic Acids Res* 1993;21:2109-2115.
18. **Gaertig J, Gorovsky MA.** Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1992;89:9196-9200
19. **Michel B, Lizardi PM, Alagón A, Zurita M.** Identification and analysis of the start site of ribosomal RNA transcription of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1995;73:19-30.
20. **Higuchi R, Krummel B, Saiki RK.** A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988;16:7351-7367.
21. **González A, Jiménez A, Vazquez D, Davies J, Schindler D.** Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1978;521:459-469.
22. **Grütz L, Davis J.** Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B fosfotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1983;25:179-188.
23. **Nickel R, Tannich E.** Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7095-7098.
24. **Purdy JE, Mann BJ, Pho LT, Petri WA.** Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica*

- and expression of firefly luciferase. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7099-7103.
25. Vines RR, Purdy JE, Ragland BD, Samuelson J, Mann BJ, Petri WA. Stable episomal transfection of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1995; 71 :265-267.
 26. Palmer TD, Miller AD, Reeder RH, McStay B. Efficient expression of a protein coding gene under the control of an RNA polymerase I promoter. Nucleic Acids Res 1993;21:3451-3457.
 27. Jansson A, Gillin F, Kagardt U, Hagblom P. Coding of hemolysins within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. Science 1994;263:1440-1443.
 28. Mueller DE, Petri WA. Clonal growth in Petri dishes of *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1995;89:123.
 29. Laban A, Tobin JF, Curotto de Lafaille MA, Wirth DF. Stable expression of the bacterial neogene in *Leishmania enriettii*. Nature 1990;343:572-574
 30. Kapler GM, Coburn CM, **Beverley SM**. Stable transfection of the human **parasite** *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. Mol Cell Biol 1990;10:1084-1094
 31. Zomerdijk JC, Ouellette M, ten Asbroek AL, Kieft R, Bommer AM, Clayton CE, Borst P. The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. EMBO J 1990;9:2791-2801.
 32. Moro A, Ruiz-Cabello F, Fernandez-Cano A, Stock RP, Gonzalez A. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase in the mechanism of cell infection. EMBO J 1995;14:2483.
 33. Lucas JM, Lo K, Wilkie NM, Lang JC. Efficient transfection of NIH3T3 and P19 cells with Lipofectamine reagent. Focus 1994;16:87-89.

III. Variación genética intraespecie de *Leishmania mexicana mexicana* y su repercusión sobre la fisiopatogenia de la enfermedad

Miriam Berzunza-Cruz*, Emma Saavedra-Lira**, Ruy Pérez-Montfort**, Oscar Velasco-Castrejón***, José Sotero Delgado-Dominguez*, Ingeborg Becker*

Resumen

Las formas más frecuentes de leishmaniosis en México son la leishmaniosis cutánea localizada (LCL), un padecimiento relativamente benigno, y la leishmaniosis cutánea diseminada (LCD), de evolución generalmente mortal. La caracterización fenotípica de parásitos aislados de pacientes con LCL y LCD ha revelado, que el agente causal de ambos cuadros clínicos es *Leishmania mexicana mexicana*. Sin embargo la resistencia a medicamentos y la virulencia inesperada en algunos pacientes hacen sospechar una posible introducción de nuevas especies en México o bien mutaciones intraespecie.

En este trabajo realizamos un análisis genotípico del kADN de leishmanias aisladas de pacientes con LCL y LCD, mediante endonucleasas de restricción (*Hae III* y *Hpa II*) y RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico con oligonucleótidos no específicos). Encontramos polimorfismo en las digestiones sugestivas de la introducción de nuevas especies en México, lo cual se tendrá que confirmar con PCR especie-específicas. Mediante el RAPD detectamos una ligera diferencia entre un paciente con LCD y otros con LCL. Esta variación intraespecie pudiera ser una de las posibles causas de diseminación del parásito.

Palabras clave: *Leishmania mexicana mexicana*, virulencia, variación genética.

Summary

The most frequent forms of leishmaniosis in Mexico are the localized cutaneous leishmaniosis (LCL), a relatively benign disease, and the diffuse cutaneous leishmaniosis (DCL), which is generally fatal. Phenotypical analysis of parasites isolated from patients with LCL and DCL revealed that both clinical forms of the disease are produced by *Leishmania mexicana mexicana*. Yet the unexpected virulence and the drug resistance found in some of the patients have led to the suspicion of a possible introduction of new leishmania species in Mexico or of intraspecies mutations. In this study we made a genotypical analysis of the kDNA isolated from patients with LCL and DCL using restriction enzymes (*Hae III* and *Hpa II*) and RAPD (random amplified polymorphic DNA). In the digestions we detected polymorphism suggestive of a possible introduction of new leishmania species in Mexico. This will have to be confirmed with species-specific PCR analysis. We also detected a slight difference between a patient with DCL and others with LCL. This intraspecies variation could be one of the possible factors responsible for the dissemination of the parasite.

Key words: *Leishmania mexicana mexicana*, virulence, genetic variation.

* Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM

** Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular UNAM

*** INDRÉ (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas) SSA.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ingeborg Becker, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70641, 04510 México D.F. México Tel. 623-2122 FAX. 616-0844

El parásito protozoario del género *Leishmania* sp., agente causal de la leishmaniosis, puede causar manifestaciones clínicas muy variables, desde una forma relativamente benigna de lesiones cutáneas localizadas, que tienden a la curación espontánea, hasta el polo radicalmente opuesto con las formas muy severas del padecimiento, como son la leishmaniosis cutánea difusa, que cursa con una diseminación metastásica de las lesiones nodulares a toda la piel del paciente. Estas lesiones son altamente mutilantes y desfigurantes y, en estadios finales, frecuentemente hay invasión de las mucosas naso y orofaríngeas, lo cual eventualmente lleva a la muerte del paciente. Otras presentaciones severas de este padecimiento son la leishmaniosis mucocutánea y la visceral, que afortunadamente son muy poco frecuentes en México. Las formas más frecuentes de la leishmaniosis en México son la leishmaniosis cutánea localizada (LCL), la cual se presenta en forma endémica en los estados de Tabasco, Chiapas, Quintana Roo y Campeche^{1,2} y la leishmaniosis cutánea difusa (LCD).

Uno de los grandes enigmas de esta parasitosis sigue siendo la causa de la diseminación incontralada del parásito en los pacientes con LCD. Una posible causa de la diseminación puede radicar en la especie infectante del parásito, ya que la severidad de las manifestaciones clínicas ha sido atribuida a diferentes especies infectantes de leishmania.³ Por otro lado, existen datos controversiales que sugieren la posibilidad de que una misma especie pudiera producir ambos cuadros clínicos con virulencia tan drásticamente opuesta.^{4,5} Una posible explicación de este fenómeno pudiera ser la existencia de pequeñas variaciones genéticas dentro de una misma especie de leishmania que pudieran ser responsables de la amplia gama de presentaciones clínicas en el humano.⁶

En el Continente Americano se ha encontrado que la mayoría de los casos con leishmaniosis son debidos a los dos grandes complejos: *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*.³

La tipificación de las especies infectantes para el registro ante la OMS rutinariamente se realiza mediante anticuerpos monoclonales e isoenzimas.⁴

En México se han aislado parásitos de pacientes con LCL y LCD provenientes de varias zonas endémicas y algunos han sido tipificados mediante zimodemos y por anticuerpos monoclonales. Me-

dante este análisis fenotípico se encontró que, tanto los pacientes con LCL como con LCD, tenían como agente causal a *Leishmania mexicana mexicana*.^{7,8} Sin embargo se ha observado que existe mucha variación en la susceptibilidad al tratamiento y en la severidad de la evolución clínica en algunos de los pacientes estudiados. Como en la actualidad la caracterización de todas las especies aisladas en México se ha basado en expresiones fenotípicas del parásito, existe la posibilidad de que pequeñas variaciones genéticas, no detectables por esta metodología, pudieran ser responsables de la variación en la virulencia encontrada en el humano.

Recientemente se ha introducido la reacción en cadena de polimerasa como herramienta diagnóstica que permite identificar distintas especies de leishmanias debido al descubrimiento de secuencias específicas de especie en los minicírculos del ADN de kinetoplastos (kADN).^{9,10} Sin embargo hasta la fecha, esta metodología no ha sido introducida como herramienta diagnóstica en México.

En este trabajo intentamos analizar genotípicamente a los parásitos aislados de las distintas zonas endémicas y de pacientes con los cuadros clínicos de LCL y LCD mediante dos metodologías. Inicialmente se hizo un análisis comparativo de la digestión kADN del parásito mediante endonucleasas de restricción. La comparación de la longitud de los fragmentos del kADN obtenidos por las distintas endonucleasas permite distinguir diferencias entre especies infectantes de leishmanias.

Hasta la fecha hemos encontrado diferencias en digestiones con las endonucleasas Hae III y Hpa II. Los patrones de digestión se analizaron en geles de agarosa y como control se analizó el kADN de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi* digerido con las mismas enzimas.

Aunado a la búsqueda y caracterización de posibles nuevas especies de leishmanias en México, que pudieran ser responsables de los distintos cuadros clínicos, nos interesó analizar si existían pequeñas variaciones genéticas intraespecie que pudieran correlacionarse con la virulencia expresada en el humano. Para contestar esta pregunta se analizaron los parásitos mediante la reacción en cadena de polimerasa utilizando la prueba RAPD (de las siglas en inglés Random Amplified Polymorphic DNA).¹¹ La sensibilidad de la prueba hace

posible la detección de variaciones en las secuencias de genomas de cepas muy cercanas y permite realizar estudios de epidemiología molecular, ya que no se requieren oligonucleótidos con secuencias específicas.

Posteriormente comparamos los resultados obtenidos por ambas metodologías con la caracterización y nomenclatura dada por los centros de referencia de la OMS de los mismos parásitos.

Los resultados obtenidos hasta la fecha del análisis del kADN por endonucleasas de restricción parecen indicar que *Leishmania mexicana mexicana* puede producir los cuadros de LCL, como de LCD. *Leishmania mexicana mexicana* se encontró en pacientes con LCD de Veracruz, Michoacán y Tabasco y además, en un gran número de pacientes con LCL originarios de toda la República.

Otro dato interesante fue el hallazgo de *Leishmania braziliensis* en un paciente con LCD proveniente de Veracruz.

El análisis del kADN de este paciente presentó un patrón de restricción idéntico al de *Leishmania braziliensis* utilizada como control (Figura 1, flecha). Curiosamente coexisten ambas especies de leishmanias en las mismas zonas endémicas. Un dato inesperado fue el hallazgo de un parásito aislado de dos pacientes con LCL de Comalcalco, Tabasco, que presentaron un patrón diferente al de *Leishmania mexicana mexicana* y *L. braziliensis* pero idéntico al de *Leishmania major*, originaria del Medio Oriente (Figura 1, asterisco).

Esta metodología permitió el diagnóstico y tipificación rápida de las especies de leishmania presentes en las distintas regiones y la detección precisa de la introducción de nuevas especies en las regiones endémicas. Esto potencialmente representa un problema de salud, ya que *Leishmania braziliensis* es muy poco sensible al tratamiento con antimonials pentavalentes (Gluantime), empleado en México para el tratamiento de los pacientes con leishmaniasis.³

Sin embargo, con esta metodología no pudimos detectar variaciones genéticas intraespecie, que pudieran correlacionarse con los distintos grados de virulencia encontrados con *Leishmania mexicana mexicana*.

Este problema se resolvió con el RAPD, ya que logramos detectar que el patrón de amplificación

del kADN del parásito aislado de un paciente con LCD es diferente al encontrado en pacientes con LCL, todos ellos infectados por *Leishmania mexicana mexicana* (Figura 2, flecha). El paciente con LCD es originario de Veracruz y los pacientes con LCL son originarios de Tabasco y Campeche.

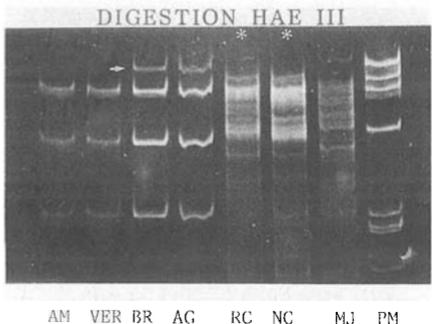
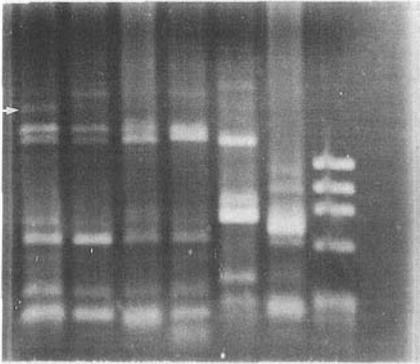


Figura 1. Patrones de restricción del kADN de leishmanias con endonucleasa Hae III en AG (paciente con LCD de Veracruz) lacuai también se encuentra en BR (*Leishmania braziliensis*) utilizada como control y que no está presente en los parásitos de los pacientes Ver y AM, (ambos LCD de Veracruz). Los parásitos aislados de la paciente RC (LCL de Tabasco) presenta un patrón de restricción totalmente distinto (asterisco) a los demás y muy semejante a MJ (*Leishmania major*).

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que la combinación de estas dos metodologías de análisis genotípicos permiten una diferenciación interespecie mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, además de una subsecuente diferenciación intraespecie con la detección de polimorfismos en la secuencia genómica por RAPD. El diagnóstico preciso de la especie y la detección de variaciones genéticas relacionables con grados de virulencia en humano tiene importancia clínica ya que la detección temprana de un parásito con un alto potencial de virulencia implica que el paciente debe recibir un tratamiento y seguimiento muy distinto al resto de la población de enfermos. También tiene relevancia epidemiológica porque permite establecer zonas de alto riesgo en la transmisión del parásito.

RAPD



Ver Sob Rc 527 Maj Trp Pm

Figura 2. Análisis por RAPD del kADN de leishmanias aisladas de pacientes con LCL y LCD. Con los oligonucleótidos GTTTTCCC AGTCACGAC y AGCGGATAACAATTTCACACAGGA encontramos que el parásito aislado de Ver (paciente con LCD de Veracruz) presenta una banda de peso distinto a los parásitos aislados de pacientes con LCL (SOB, RC y 527 originarios de Tabasco y Campeche), ver flecha. Como controles se agregaron Maj (*Leishmania major*) y Trp (*Trypanosoma cruzi*).

Será interesante estudiar si las variaciones genéticas intraespecie son directamente responsables de la innumodulación hacia la respuesta inmune celular tipo TH2 encontrada en pacientes con LCD.

Agradecimientos

Fuentes de financiamiento: DGAPA: IN-203892, Comunidad Económica Europea C11*-CT93-0314, CONACyT F177-1903, 1190-N9203

Referencias

1. Velasco Catrejón O, Guzmán Bracho C, Cruz Rodríguez J, González Domínguez F. Las Leishmaniasis con Especial Referencia a México. Publicación técnica del Indre No. 7, 1993
2. Andrade-Narváez FJ, Simmonds-Díaz E, Rico-Aguilar S, Andrade-Narváez M, Palomo-Cetina A, Canto-Lara SB et al. Incidence of localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in Mexico. *Trans Roy Soc Med Hyg.* 1990;84:219-220
3. Herwaldt BL, Arana BA, Navin TR. The Natural History of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis.* 1992;165:518-527.
4. Barral A, Pedral-Sampaio D, Gnmaldi G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesús A et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(5):536-546.
5. Gradoni L, Gramiccia M. *Leishmania infantum* Tropism: Strain Genotype or Host Immune Status? *Parasitology Today* 1994;10(7):264-267
6. Dujardin JC, Llanos-Cuentas A, Caceres A, Arana M, Dujardin JP, Guerrini F et al. Molecular karyotype variation in *Leishmania (Viannia) peruviana*: indication of geographical populations in Peru distributed along a north-south cline. *Ann Trop Med Parasitol.* 1993;87:335-347.
7. Velasco O, Savarino SJ, Walton B, Gam AA, Neva FA. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(3):280-288.
8. Kreutzer RD. Genetic Analysis of Leishmaniasis mexicana Populations from Texas, Latin America and the Caribbean. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43(4):367-372.
9. Rodríguez N, Guzmán B, Rodas M, Takiff H, Bloom BR, Convit A. Diagnosis of Cutaneous leishmaniasis and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2246-2252.
10. Kennedy WPK. Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and *in situ* hybridization. *Mol Biochem Parasitol.* 1984;12:313-325
11. Bhattacharyya R, Singh R, Hazra TK, Majumder HK. Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identify and differentiate *Leishmania* parasites. *Fems Microbiology Letters* 114 1993;99-104.

IV. Transfección genética con vehículos episomales en *Trypanosoma cruzi*

Roberto Hernández*, Santiago Martínez-Calvillo**

Trypanosoma cruzi es un hemoflagelado parásito del hombre causante de la enfermedad de Chagas. Su gran pleomorfismobiológico reflejado en características de interés biomédico como son virulencia, susceptibilidad a drogas y tropismo de infección diferencial a órganos, hace que el estudio de expresión de su genoma sea no sólo importante sino necesario.

Probablemente por ser protozoarios de origen evolutivo temprano, los tripanosomas (se incluyen todos los géneros y especies donde se ha buscado), presentan mecanismos atípicos en el manejo y expresión de sus genomas. Los genes nucleares codificadores de proteínas se transcriben en forma policistrónica y maduran incorporando por "trans-splicing" un exón no codificante de 39 bases producto a su vez de una unidad de transcripción independiente. Un número variable (dependiendo de la especie) de transcritos mitocondriales son editados post-transcripcionalmente por la inserción y remoción de residuos de uridina. El molde o templado molecular de los sucesos de edición es uno o mas transcritos independientes complementario (-) que guía(n) (de allí su nombre, RNAs guía) las posiciones sobre el transcrito mitocondrial que han de ser editadas. Estas observaciones de biología molecular han situado a los *Trypanosomatídeos* como un grupo de organismos de importancia paradigmática en el estudio del genoma de protozoarios.

El enfoque genético al estudio de problemas biológicos es sin duda uno de los más poderosos. En los últimos años se han desarrollado técnicas y moléculas de DNA recombinante que permiten la transformación genética estable de diferentes especies de tripanosomas. La transformación se ha conseguido por integración genética (recombinación homóloga), o por vectores episomales. De

entre estos últimos destaca el vector de expresión pTEX y sus derivados, usados en especies de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*.¹

El vector de expresión pTEX es un plásmido construido sobre el plásmido comercial *Bluescript* que contiene el marcador de resistencia a ampicilina y un origen de replicación para *Escherichia coli*. En este plásmido se incorporó el gene bacteriano Neo que codifica para una fosfotransferasa que inactiva el aminoglicósido G418, tóxico a eucariontes. Por ello pTEX permite una selección positiva de tripanosomas transfectados crecidos en presencia de G418. La expresión de Neo en los tripanoso-masse consiguió incorporando la construcción molecular (río arriba y río abajo de Neo) secuencias génicas de *Trypanosoma cruzi* que flanquean las regiones codificadoras de los genes para la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Estas secuencias permiten la expresión y el procesamiento post-transcripcional correctos de Neo. En la construcción de pTEX se incorporó también una región de clonación múltiple para insertar genes adicionales que deseen expresarse. Entre los ejemplos publicados de genes expresados en este sistema de transfección puede citarse al de la proteína membranal GP72 que complementa fenotípicamente la posición correcta de emergencia del flagelo (cambiada artificialmente por disrupciones génicas de los alelos silvestres);² o al de una línea celular que sobre-expresa el producto génico, y la actividad enzimática, tripanothion reductasa (enzima equivalente a la glutatión reductasa de mamíferos).³

El plásmido pTEX se mantiene episomalmente en *Trypanosoma cruzi* y en *Leishmania*, a los que confiere el fenotipo de resistencia a G418. Como un comportamiento general, pTEX se encuentra reiterado en los tripanosomas transfectados esta-

* Jefe del Departamento de *Biología Molecular*, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

** Instituto de *Investigaciones Biomédicas*, UNAM.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Roberto Hernández, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM Apartado Postal 70-228, Ciudad Universitaria 04510, México, D. F. E-mail: robher@servidor.unam.mx

bles formando oligómeros en tandem de número variable, cuya amplificación es seleccionable usando diferentes concentraciones de droga.'

Durante el simposio se presentarán datos originales sobre la construcción de un derivado molecular de pTEX que carece de la región promotora originalmente clonada. Este derivado, pTRAP, es un plásmido seleccionable por secuencias que funcionan como promotores en *Trypanosoma cruzi*. Las fusiones preliminares realizadas en pTRAP con el promotor para genes de RNA ribosomal de *Trypanosoma cruzi*, son muy alentadoras y sugieren una gran utilidad de pTRAP para el aislamiento y estudio de promotores en este parásito.

Como consideraciones metodológicas generales para obtener transfectantes estables de *Trypanosoma cruzi*, se menciona lo siguiente: Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, son crecidos hacia la fase media de decrecimiento logarítmico, en medio de infusión de hígado y triptosa (medio LIT) o medio comercial RPMI, suplementados con suero bovino fetal y hemina. Las células son lavadas en aproximadamente un décimo del volumen original con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos (PBS) suplementada con acetato de magnesio (0.5mM) y acetato de calcio (90µM) El DNA (» 50µg) es introducido a las células por electroporación. Hemos estado empleando el electroporador BTX con 1 pulso de 360 V, 1500 Farads y 130 ohms. Las células se recuperan por 3 días en medio de cultivo fresco (sin droga), y las

transfectantes se seleccionan posteriormente en presencia de G418 a 100 mg/ml.

Los sucesos moleculares que se presentan para que el vector se exprese y se mantenga intracelularmente no están caracterizados. Sólo sabemos que estos ocurren y finalmente se seleccionan aquellas células resistentes a la droga, situación que se manifiesta evidentemente entre 4 a 6 semanas de la electroporación. Pensamos que esta situación ofrece una veta rica para la investigación fundamental en el área de expresión y replicación del genoma de tripanosomas.

Agradecimientos

Las investigaciones aquí descritas están siendo apoyadas por el donativo DGAPA UNAM IN502495

Referencias

1. Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:3963-3969.
2. Nozaki T, Cross GAM. Functional complementation of glycoprotein 72 in a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72 null mutant. *Molec and Biochem Parasitol.* 1994;67:91-102.
3. Kelly JM, Taylor MC, Smith K, Hunter KJ, Fairlamb AH. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* with over-expressed trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *Eur J Biochem.* 1993;18:29-37.

V. Dinámica del disparo del filamento polar en el microsporidio *Nosema algerae*, analizada por videomicroscopía de contraste acentuado electrónicamente*

Eugenio Frixione**,***, Lourdes Ruiz**, Moisés Santillán****, Lourdes Vega****
José Manuel Tejero*****, Albert H Undeen*****

Resumen

Por medio de video-microscopía de contraste acentuado electrónicamente, se consiguió el primer análisis cinemático de la descarga del filamento polar y el esporoplasma por esporas de un microsporidio. La estimulación in vitro de esporas de *Nosema algerae*, un parásito de los mosquitos, provoca la salida explosiva del filamento polar con una velocidad instantánea máxima de 105 $\mu\text{m/s}$ en promedio, seguida por la expulsión del esporoplasma en el extremo del filamento luego de un lapso variable con un máximo de 500 ms. La descarga total se completa en menos de 2 s. La morfología de la parte del filamento ya descargada en cada instante no cambia durante la salida, lo que sugiere que el alargamiento ocurre tan solo en el extremo distal, conforme a la opinión de que el filamento es extruido por eversión. Por lo común, la longitud del filamento disminuye entre un 5 y un 10% después de la expulsión del esporoplasma, lo que indica elasticidad del material constitutivo y presurización interna durante el proceso. Una vez liberado el esporoplasma aumenta de volumen, como es de esperar de una alta presión osmótica residual que, de acuerdo con la hipótesis prevaleciente, es ocasionada por la estimulación. Los resultados apoyan el modelo de que las esporas de los microsporidios germinan cuando el estímulo causa un aumento de presión osmótica interna, que a su vez determina un influxo de agua de manera que la presión hidrostática se eleva y finalmente rompe la tapa polar de la spora, por donde son entonces expulsados el filamento y enseguida el esporoplasma.

Palabras clave: Análisis cinemático, citomecánica, mecanismos de invasión, parásitos, motilidad.

Summary

Video-enhanced contrast microscopy allowed the first kinematic analysis of the fast discharge of the polar filament and the sporoplasm by microsporidian spores. In vitro stimulation of spores of *Nosema algerae*, a pathogen of mosquitoes, elicits the explosive ejection of the polar filament with a mean maximum instant velocity of 105 $\mu\text{m/s}$, followed by the expulsion of the sporoplasm at the filament tip after a variable lag with a maximum of 500 ms. The whole discharge is completed in less than 2 s. The morphology of the already discharged extent of the filament at every moment does not change during ejection, suggesting that elongation occurs only at the tip in agreement with the view that the filament is extruded by eversion. The filament usually shortens by 5-10% after sporoplasm expulsion, indicating elasticity of the constituting material and internal pressure during the process. Once released, the sporoplasm increases in volume as expected from a residual high osmotic pressure which, according to the prevailing hypothesis, is caused by stimulation. The results support the view that microsporidian spores germinate in response to a stimulus-driven increase in internal osmotic pressure that in turn determines water influx, so that the intrasporal hydrostatic pressure rises and finally breaks open the polar cap of the spore, through which the filament and then the sporoplasm are expelled.

Key words: cytomechanics, invasion mechanisms, kinematics, motion analysis, parasites, protoplasm flow, video-microscopy.

* Publicado en: *Cell Motil* (Permission Granted John Wiley & Sons, inc.) Cytoskel. 1992;22:38-50

** Departamento de Biología Celular, CINVESTAV

*** Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV

**** Departamento de Ciencias de Materiales, ESFM, IPN

***** Medical and Veterinary Research Laboratory, US Department of Agriculture

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Eugenio Frixione, Departamento de Biología Celular, CINVESTAV, 07000, México, D. F.

Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados que, por reunir varias características muy peculiares, constituyen un *phylum* (Microspora) de gran interés biológico. Además de ser en promedio los más pequeños organismos eucarióticos -muchos de ellos con esporas de menos de 5 μm de diámetro-, los microsporidios tienen un origen filogenético tan antiguo que por lo común se les considera como referencia para el fechado de las primeras líneas divergentes en la base de árboles evolutivos.¹ Su distribución tan amplia que prácticamente no hay grupo zoológico en el que no se encuentren huéspedes para alguna de sus incontables especies.² Debido a esta singularidad, y a su enorme capacidad reproductiva, los microsporidios constituyen probablemente el *phylum* de organismos eucarióticos con el mayor número de individuos.

El interés del grupo es aparejado por su importancia sanitaria y económica. Un microsporidio fue quizás el primer organismo reconocido como causante directo de una enfermedad transmisible cuando, en 1865, Pasteur identificó en los tejidos de larvas de *Bombyx mori* las esporas de *Nosema bombycis* como responsables de la epizootia que en ese tiempo quebrantaba la industria de la seda en Francia. Desde entonces, muchas otras especies de microsporidios han sido estudiadas tanto para prevenir sus estragos en especies útiles (abejas, peces, roedores para experimentación) como para utilizarlas como agentes potenciales de control biológico de plagas (moscos, langostas y grillos). Más recientemente, la atención a los microsporidios ha crecido con el hallazgo de que las especies que parasitan a los humanos, y que no habían significado un problema de salud pública, representan hoy una de las más serias amenazas para los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida.^{3,4}

El proceso de invasión por los microsporidios es uno de los más espectaculares fenómenos de motilidad celular.⁵ La espora madura, liberada con otras muchas por el estallamiento de una célula huésped, contiene en su interior un filamento enrollado en forma helicoidal que en respuesta a un estímulo específico es disparado violentamente. Si la espora se encuentra en posición favorable, el extremo distal de este filamento -que puede medir más de 100 μm de longitud- alcanza y penetra la

membrana de una célula huésped. Inmediatamente después, el esporoplasma abandona la cápsula de la espora y fluye por el interior del filamento -convertido en un tubo durante la expulsión- hasta quedar depositado en el citoplasma huésped. El proceso completo puede ocurrir en menos de 2 segundos. El esporoplasma inyectado inicia entonces una compleja reproducción que da como resultado múltiples nuevas esporas, que finalmente son liberadas cuando la célula infectada estalla a su vez.

El mecanismo responsable de este proceso no se conoce todavía, aunque existen evidencias sugestivas de sus principios de operación. El disparo del filamento es inhibido en medios de alta osmolaridad,^{6,7} por lo que se ha propuesto que la fuerza impulsora deriva de un ingreso de agua que aumenta la presión hidrostática en el interior de la espora, hasta que la pared de la misma alcanza el punto de ruptura en una zona relativamente delgada conocida como "tapa polar" por donde el filamento es entonces proyectado.^{7,8} Dicho ingreso de agua, a su vez, parece obedecer a un aumento de presión osmótica interna ocasionado por la división de moléculas de trehalosa en sus residuos de glucosa constitutivos.⁹ En algunas especies el estímulo que induce este efecto es la exposición a una solución salina, y recientemente se logró establecer que es la entrada del catión Ca^{2+} lo que determina la activación de la espora.¹⁰

El disparo de esporas de microsporidios había sido descrito verbalmente a partir de observaciones directas pero, debido a la velocidad y las dimensiones del filamento, no analizado en términos cuantitativos con el fin de comprender mejor su comportamiento cinético y contribuir así a dilucidar el mecanismo subyacente. Para enfrentar este problema recurrimos al estudio del disparo de esporas de *Nosema algerae*, un parásito de moscos anofelinos, con video microscopía de contraste acentuado electrónicamente. Fue posible así obtener la primera ilustración secuencial del proceso con una resolución temporal de aproximadamente 16 ms y determinar algunos de sus principales parámetros cinemáticos.

Los resultados experimentales son consistentes con la hipótesis de un mecanismo de disparo basado en un aumento de presión hidrostática dentro de la espora, y revelan que el proceso está

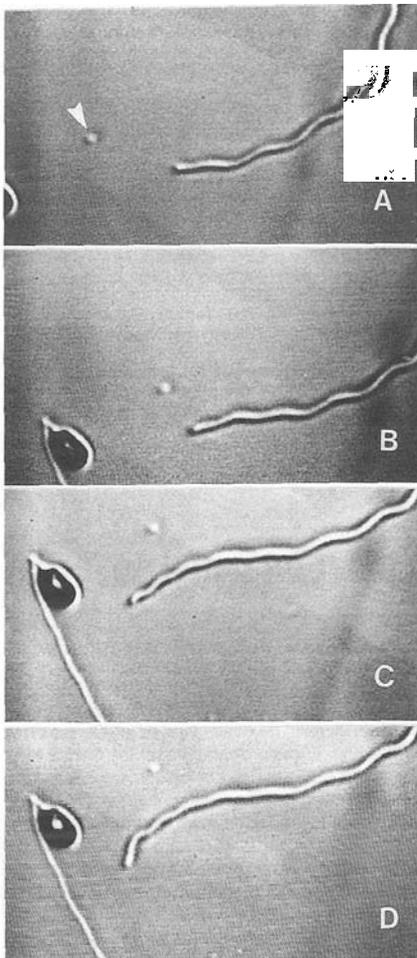


Figura 1. Secuencia videomicrográfrica del alargamiento de un filamento polar disparado por una espora del microsporidio *Nosema algerae*. El cuerpo de la espora se encuentra distante y por consiguiente no aparece en el campo microscópico debido a la amplificación empleada para esta secuencia. Una partícula estática (señalada con la cabeza de flecha en A) en el centro del campo y una espora ya inmóvil después de haber germinado en el lado izquierdo del campo, sirven como referencias posicionales. El extremo del filamento, que crece hacia la izquierda (A), avanza hasta pasar cerca de la partícula (B, C) y

continúa extendiéndose hasta llegar a la vecindad de la espora ya disparada (D). Nótese que la morfología de las porciones ya extruídas del filamento se mantiene inalterada por lo que el crecimiento ocurre en el extremo distal y no en el sitio de emergencia de la espora. Esta observación apoya la idea de que el filamento es extruído por un proceso de eversión. El filamento de la espora de la izquierda aparece doblado o curvado al salir como resultado de un cambio brusco en la orientación del cuerpo de la espora en el momento en que el filamento alcanza su máxima extensión. Dicha sacudida es frecuente y revela el momento de la transferencia del centro de masa, el esporoplasma de un extremo a otro del filamento (X 2 000)

compuesto por dos fases separadas por un intervalo de reposo. El filamento emerge del polo anterior de la espora siguiendo un curso helicoidal de paso uniforme en torno a un eje casi recto, con una velocidad instantánea máxima de 105 mm/s en promedio. La morfología de la parte del filamento ya descargada en cada instante no cambia durante la salida, lo que sugiere que el alargamiento ocurre tan sólo en el extremo distal, conforme a la opinión de que el filamento es extruído por eversión.^{6,7} El filamento totalmente extruído tiene una longitud mayor que la calculada para cuando se encuentra dentro de la espora, por lo que el proceso implica alargamiento. Justo antes de completarse la extrusión, el extremo distal del filamento sigue una trayectoria tortuosa que a menudo resulta en una configuración terminal curvada o espiral. Una vez concluida la extrusión, y luego de un intervalo variable entre 15 y 500 ms, el esporoplasma surge en el extremo del filamento formando un glóbulo que crece rápidamente hasta alcanzar un tamaño mayor que su volumen original dentro de la espora. Esta observación sugiere una presión osmótica relativamente alta en el esporoplasma, como sería de esperar de acuerdo con la hipótesis prevaliente.⁹ La expulsión del esporoplasma es por lo común acompañada por una súbita pérdida de helicidad del filamento, que se vuelve recto, a la vez que la cápsula vacía de la espora sufre un movimiento brusco en dirección de su polo apical. El filamento disminuye entre un 5 y un 10% después de la expulsión del esporoplasma, lo que indica elasticidad del material constitutivo y presurización interna durante el proceso. En medios hipertónicos la extrusión del filamento disminuye su velocidad o se hace más lenta por al menos un orden de magnitud, y con frecuencia se inhibe la expulsión del esporoplasma. Ambos efectos son también indicativos de que, como se ha

hipotetizado,^{6,7,9} la activación de la espora implica un aumento de presión osmótica interna.

Los resultados apoyan el modelo según el cual las esporas de los microsporidios germinan cuando el estímulo causa un aumento de presión osmótica interna, que a su vez determina un flujo de agua de manera que la presión hidrostática se eleva y finalmente rompe la tapa polar de la espora, por donde se entonces expulsados el filamento y enseguida el esporoplasma.

Referencias

1. **Vossbrinck CR**, Maddox JV, Friedman S, **DeBrunner**-Vossbrinck BA and Woese CR. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 1987;326:411-414.
2. Sprague V. The zoological distribution of Microsporidia. En: *Comparative Pathobiology*. Vol. 2: Systematics of the Microsporidia. Bulla LA and Cheng TC (Eds.) Plenum Press, New York, 1977, pp. 1-30.
3. Van Gool T, **Hollister** WS, Schattenkerk JE, Weerman MAV, **Terpstra** WJ, Van **Ketel** RJ, Reiss P, and **Canning** EU. Diagnosis of *Enterocytozoon* bienersi microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. *Lancet* 1990;336:697-698.
4. **Sorvillo** F and Kerndt P. Pathogenicity of the microsporidia. *AIDS* 1995;9:2.
5. Weidner E, Byrd W, Scarborough J, Pleshinger J and Sibley D. Microsporidians pore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *J Protozool.* 1984;31:208-213.
6. Lom J and Vávra J. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool.* 1963;1:81-92.
7. **Undeen** AH. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *J Theor Biol.* 1990;142:223-235.
8. **Undeen** AH, Frixione E. The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema* algerae spores. *J Protozool.* 1990;37:561-567.
9. **Undeen** AH, VanderMeer RK. Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema* algerae (Protista: Microspora) spores: a quantitative study. *J Euk Microbiol.* 1994;41:129-132.
10. Frixione E, **Ruiz** L, **Undeen** AH. Monovalent cations induce microsporidian spore germination *in vitro*. *J Euk Microbiol.* 1994;41:464-468.

VI. ¿Podría el eosinófilo jugar un papel en la amibiasis?

Roberto R Kretschmer*

La ausencia de eosinofilia en la amibiasis invasora - lo mismo que en otras infecciones por protozoario - seguramente mantuvo alejada la atención de los amebólogos con respecto a este curioso leucocito, tan prominente por otra parte en la defensa contra enfermedades por helmintos.¹ Ello, a pesar de que las lesiones tempranas en la invasión amibiana intestinal y hepática regularmente revelan la presencia - transitoria - de algunos eosinófilos.² Cabe señalar que en la actualidad se acepta que la ausencia de eosinofilia circulante y tisular no bastan para descartar una posible participación del eosinófilo en un determinado fenómeno biológico.³ De hecho, sólo la centésima

parte de la masa de eosinófilos se encuentra en la circulación. El resto deambula en los tejidos más diversos.⁴ Además, los eosinófilos son células relativamente lábiles, que suelen sucumbir a consecuencia de las reacciones en las que intervienen, por lo que su ausencia en reacciones inflamatorias tampoco puede usarse como argumento de que no han participado en la misma. Antes bien, resulta mandatorio buscar los detritus naturales de estas células (las proteínas específicas de sus gránulos: MBP, EPO, ECP, EDN y CL) para responder adecuadamente a esta pregunta.³

Por otra parte, el espectro de respuestas inmunes que ocurren en el absceso hepático amibiano

* Unidad de Investigación Médica en Inmunología. Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS México, D. F.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Roberto R Kretschmer. Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS. Avenida Cuauhtémoc 330, colonia Doctores. 06725. México, D. F.

(AHA), sugiere la existencia de un desbalance desventajoso $Th1 < Th2$, con inmunidad celular ($Th1$) deprimida e inmunidad humoral ($Th2$) normal o hasta obsoletamente vigorosa, aunque no necesariamente dañina.

Este tipo de desbalance ha sido observado claramente en otras enfermedades por protozoarios (i. e. leishmaniasis) en donde la desviación puede además modificarse artificialmente mejorando la condición de los animales experimentales o bien puede haber diferencias críticas de esta dicotomía (i. e. $Th1 > Th2$ o $Th1 < Th2$) en distintas cepas de ciertas especies animales.⁵ La dicotomía $Th1/Th2$ no parece ser una estereotipia universal puesto que opera curiosamente a la inversa en las enfermedades por helmintos.⁶ En el caso de la *Entamoeba histolytica* una reflexión obligada sería acerca del balance de respuestas $Th1/Th2$ en los casos que -aunque amenazados (i. e. rectocolitis amibiana) - no llegan a presentar AHA (99%). Como en otras enfermedades por protozoarios (aunque intracelulares, a diferencia de la amiba que es extracelular) una respuesta $Th1 > Th2$ sería la benéfica. Y así dijimos en embargo que en la amibiasis invasora hepática la dicotomía parece ser $Th1 < Th2$. La producción de IL5 y la consecuente movilización/activación de los eosinófilos forma parte del repertorio de respuestas $Th2$. Si hay un exceso de respuestas $Th2$ en la amibiasis invasora hepática, cabría la pregunta ¿Por qué no hay eosinofilia en el absceso hepático amibiano?

No se sabe si la invasión portal por parte de la *Entamoeba histolytica* es un fenómeno frecuente o raro en el curso de la amibiasis invasora intestinal. Contestar esta pregunta sería de gran importancia para la amebiología. Lo que sí sabemos es que menos del 1% de los individuos con amibiasis invasora intestinal padecerán AHA.⁷ Si la invasión portal por *Entamoeba histolytica* es un evento frecuente surge la pregunta ¿quién evita que tantas invasiones portales por *Entamoeba histolytica* culminen en AHA? El polimorfonuclear neutrófilo difícilmente calificaría para esta función, pues ha resultado, absolutamente incapaz, de lidiar con la *Entamoeba histolytica* *in vitro*, aún estando en alevosa ventaja de hasta 2000 neutrófilos por cada amiba, y aún asistido por anticuerpos anti-amibianos y complemento hemolítico.⁸ Además, la amiba produce un factor termoestable de bajo PM (< 1000

Da) capaz de cancelar la explosión respiratoria (quimiluminiscencia) de este leucocito.⁹ Podría ser el macrófago, que ciertamente posee capacidad amebicida cuando es activado antes de interactuar con la amiba *in vitro*; pero el macrófago es una célula inflamatoria de arribo tardío. Además, el mismo factor amibiano que cancela la explosión respiratoria en el polimorfonuclear neutrófilo humano, es capaz de hacer lo mismo en el monocito humano, al que además le inhibe su locomoción.^{9,10} Por ello hemos denominado tentativamente a este factor FILM (factor inhibidor de la locomoción de los monocitos). Así, surge la posibilidad de que los polimorfonucleares eosinófilos de arribo temprano a los focos inflamatorios y de probada capacidad para destruir amibas *in vitro*, pudieran jugar un papel en el control de la invasión hepática amibiana. Sus credenciales generales para intervenir en una acción de este tipo ya fueron señaladas al principio de este escrito. Queda ahora por analizar 'su interacción directa con el parásito *in vitro* e *in vivo*.

Los eosinófilos humanos normales (i. e. no activados) se parecen a los neutrófilos en su ineptitud lítica *in vitro* vs la *Entamoeba histolytica*, aún en presencia de anticuerpos y complemento.¹¹ Sin embargo, si estos eosinófilos son previamente activados (con FMLP por ejemplo), adquieren la capacidad de lisar a la amiba virulenta, aunque al igual que los macrófagos activados, también ellos sucumban secundariamente en el proceso. A diferencia de los macrófagos sin embargo, los eosinófilos humanos activados incrementan sensiblemente su capacidad amebolítica en presencia de anticuerpos anti-amibianos y complemento.¹² Un intento inicial de traducir este hallazgo a un modelo *in vivo* fracasó cuando usamos ratas (animal que por cierto posee inmunidad natural vs *Entamoeba histolytica*) eosinofílicas (por inyección intravenosa de partículas de Sephadex) y un esquema de amibiasis testicular: las ratas eosinofílicas y las normales mostraron lesiones testiculares comparables.¹³ Optamos entonces por un modelo de AHA experimental en gerbos (*Meriones unguiculatus*) hechos eosinofílicos (aproximadamente 5 x los niveles normales) por inyección intramuscular de antígeno de *Toxocara canis* y que luego recibieron la dosis de 100 mil amibas por vía intraportal. Esta dosis relativamente baja se escogió con el fin de darle a los eosinófilos una ventaja, quizás marginal,

para mostrar su eventual bondad defensiva contra la *Entamoeba histolytica*. En un aventa de observación temprana se sacrificaron los animales a las 6, 24 y 96 hs de la inoculación portal con amibas. El número proporcional de gerbos con AHA, así como el número y el tamaño de los abscesos fué comparable en ambos grupos a las 6 y 24 hs. Sin embargo, a las 96 hs., si bien otra vez el número proporcional de gerbos con abscesos siguió siendo igual en los dos grupos experimentales, el tamaño y el número de los abscesos fué significativamente menor ($p < 0.05$) en los gerbos eosinofílicos. En una segunda variante de observación (sobrevida actuarial acumulada hasta 45 días) pudo registrarse una supervivencia en 30% mejor ($p < 0.05$) en los gerbos eosinofílicos que en los gerbos normales; debiéndose las muertes en ambos grupos a la presencia de enormes AHA; el cual ocurrió en el 80% de los gerbos normales acumulados hasta los 45 días; y tan solo en el 50% de los gerbos eosinofílicos.¹⁴ Es posible que un modelo menos apabullante (i. e. inyección de menos de 100 mil amibas, quizás apuntando a una dosis letal 50 (i. e. DL 50) a los 45-60 días) pudiera revelar un papel más claro del eosinófilo activado en el manejo de la *Entamoeba histolytica* que ha logrado llegar al tejido hepático. Igualmente informativos serán los estudios que están por realizarse con gerbos eosinopénicos por inyección de anticuerpos monoclonales anti IL5. Por cierto que en los experimentos arriba señalados no pudimos identificar cambios significativos en los niveles séricos de IL5. Cabe agregar que el FILM, capaz de deprimir tanto la locomoción como el estallido respiratorio en los fagocitos mononucleares, y tan solo este último en los polimorfonucleares neutrófilos, no afectó el estallido respiratorio y todo parece indicar que tampoco en forma significativa la locomoción, de los eosinófilos humanos.¹⁵

Con estos datos, la hipótesis de que el eosinófilo pudiera constituir un elemento celular importante en el eficaz (aprox. 99%) y silencioso control de la invasión hepática por la *Entamoeba histolytica*, adquiere visos de plausibilidad. Esto obligaría a estudiar posibles peculiaridades (i. e. propensión genética?) (HLA DR3+) para la inducción de respuestas desbalanceadas Th1 < Th2 usando epítopes apropiados, en el desafortunado 1% de individuos con amebiasis invasora intestinal que cursan con AHA.¹⁶

Para terminar, si la invasión amibiana de la vena porta es por el contrario un evento muy raro (aprox. 1% o menos de los casos con rectocolitis amibiana) debe por otra parte ser un fenómeno muy eficaz. La fase crítica de defensa no sería entonces al nivel hepático - donde la catástrofe ya sería inevitable - sino al nivel intestinal (o en el torrente circulatorio portal, lo cual resulta menos probable). Un posible papel del eosinófilo activado a este nivel sería un ejercicio meramente especulativo, pero a lo mejor no estéril, como lo sugieren las observaciones de López Revilla y col. sobre la posible participación de los eosinófilos en la invasión amibiana intestinal.¹⁷

Referencias

- 1 **Butterworth AE, Thorne, KJI.** Eosinophils and parasitic diseases. En: Immunopharmacology of Eosinophils. H Smith and RM Cook, eds. Academic Press, San Diego, CA. USA 1993 pp. 119-150.
- 2 **Tsutsumi V, Martínez-Palomo A.** Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. Am J Pathol 1988; 130: 1112.
- 3 **Weller P.** The immunobiology of eosinophils. N Engl J Med. 1991; 324: 1110.
- 4 **Gleich GJ.** Current understanding of eosinophil function. Hospital Practice 1988; 23: 137.
- 5 **Mossman TR, Coffman S.** Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. Adv Immunol. 1989; 46: 111.
- 6 **Romagnani S.** Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunol Today. 1991; 12: 256.
- 7 **Walsh JA.** Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis. 1986; 8: 228.
- 8 **López-Osuna M, Contreras BA, Kretschmer RR.** *In vitro* interaction of polymorphonuclear leucocytes and *Entamoeba histolytica*. Arch Inves Med. (Méx.) 1986; 17 (S-1): 247.
- 9 **Rico G, Díaz-Guerra O, Giménez-Scherer JA, Kretschmer RR.** Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leucocytes. Arch Med Res (Mex.) 1992; 23 (2): 157.
- 10 **Kretschmer RR, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López Osuna M, Lecuona M, Castro EM, Arellano J.** Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 1985; 7: 257.
- 11 **López-Osuna M, Kretschmer RR.** Destruction of normal human eosinophils by *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol. 1989; 11: 403.

12. López-Osuna M, Arellano J, Kretschmer RR. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Parasite Immunol.* 1002; 14:579.
13. López-Osuna M, Pérez-Tamayo R, Frenk P, Kretschmer RR. *Entamoeba histolytica* and eosinophils. I. Testicular lesions produced by amebac in eosinophilic rats. *Arch Invest Med (Mex.)* 1990;21:263.
14. Velazquez JR, Laguno P, Fernández-Díez J, Pérez M, Arellano J, Lopez-Osuna M, Kretschmer RR. Antigen induced eosinophilia protects gerbils (*Meriones unguiculatus*) against experimental amebic abscesses of the liver. *Arch Med Res.* 1995;26:583.
15. Rico G, Kretschmer RR. Comunicación personal.
16. Arellano J, Pérez-Rodríguez M, López Osuna M, Vázquez JR, Granados J, Justiniani N et al. Increased frequency of HLA-DR3 and composite SC01 in Mexican mestizo children with amebic abscesses of the liver. *Parasite Immunol.* (En prensa) 1996.
17. López-Revilla R. Comunicación personal.

VII. Aportes de la ingeniería genética y de la síntesis de péptidos en el estudio de la inmunidad celular contra *Toxoplasma gondii*

Pascal Héron,* Rafael Saavedra*

Toxoplasma gondii, un parásito protozoario intracelular obligatorio, está presente en todas las áreas del mundo y puede infectar aves y mamíferos. En el ser humano, la toxoplasmosis es asintomática en la mayoría de los casos, pero se vuelve un problema médico importante cuando afecta a las mujeres embarazadas y a los individuos inmunodeficientes. Una vacuna contra esta parasitosis sería muy valiosa y su desarrollo parece factible ya que la infección primaria con *Toxoplasma gondii* induce una inmunidad específica y de larga duración contra una reinfección.

La inmunidad celular tiene un papel esencial en la protección contra este parásito y el interferón-gamma es considerado como el principal mediador de la resistencia.¹ Los antígenos protectores del parásito deben, por lo tanto, inducir linfocitos T productores de interferón-gamma. Con el fin de identificar tales antígenos, se construyó una biblioteca de cDNA de *Toxoplasma gondii* en el vector de clonación y expresión λ gt11 y se seleccionaron en una primera etapa las clonas productoras de antígeno por medio de un pool de sueros de donadores inmunes. Los antígenos recombinantes así seleccionados, se probaron posteriormente por su

capacidad de inducir la proliferación de una clona de linfocitos T específica del parásito, aislada de un individuo inmune y productora de un alto nivel de interferón-gamma. Uno de los antígenos recombinantes indujo la proliferación de la clona de linfocitos T y fue caracterizado.² Este antígeno es una proteína denominada ROP2 que forma parte de las roptrias, organelos del complejo apical del parásito involucrados en la invasión de la célula huésped. Se encuentra en los tres estadios del ciclo de vida del parásito, así como en la membrana de la vacuola parasitófora que rodea al parásito intracelular.^{3,4}

La secuencia de ROP2 contiene una región hidrofóbica en su extremo N-terminal que corresponde probablemente a una secuencia señal y una segunda región hidrofóbica predicha como transmembranal en su parte carboxiterminal. ROP2 es sintetizada bajo forma de un precursor de 65 kDa; un procesamiento post-traduccional lleva a la forma madura de 55 kDa.^{2,5} El epitopo definido por la clona de linfocitos T humanos sobre este antígeno, está conservado en cepas de *Toxoplasma gondii* de diferentes orígenes geográficos y de diferentes fenotipos (virulento o formador de quistes) y es

* Departamento de inmunología Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Pascal Héron. Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Apartado Postal 70-228, 04510 México, D. F.

reconocido por la clona T en asociación con la moléculadelcomplejomayordehistocompatibilidad HLA-DPw4, el alelo más frecuente en la población (40-70% de los caucásicos).² Además, anticuerpos contra este antígeno fueron detectados en el suero de todos los ratones infectados experimentalmente con once aislados independientes de *Toxoplasma gondii*.⁸ El alto grado de conservación de este antígeno sugiere que pudiera tener una función esencial (probablemente en el proceso de invasión de la célula huésped) y refuerza también su valor como candidato para vacuna. Con el fin de localizar epitopos de ROP2 reconocidos por linfocitos T humanos, la secuencia de esta proteína, se sometió a tres métodos de predicción de epitopos T. Tres secuencias (197-216, 393-410, 501-524) resultaron predichas simultáneamente por los tres métodos y los péptidos correspondientes fueron sintetizados. Se demostró que el péptido 197-216 contiene el epitopo definido por la clona de linfocitos T humanos restringida por DPw4 mencionada anteriormente. Además, los linfocitos T circulantes de una alta proporción (64%) de individuos inmunes fueron estimulados por al menos uno de los tres péptidos, mientras que los linfocitos de donadores no inmunes no respondieron a ninguno de los péptidos. Los péptidos más frecuentemente reconocidos fueron el 197-216 (45%) y el 501-524 (36%). El alto porcentaje de individuos inmunes con linfocitos T específicos de péptidos derivados

de ROP2 apoya la propuesta de este antígeno como candidato a vacuna.

Agradecimientos

Colaboraron en estas investigaciones MA Becerril, A Bollen, F Bosman, JL Decourt, F De Meuter, C Dubeaux, JF Dubremetz, R Hernández-Pando, R Lippens, P Van Gelder y H Van Heuverswyn.

Referencias

1. Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*. 1993;7:299-316.
2. Saavedra R, De Meuter F, Decourt JL, Hérion P, Hurnan T. Cell clones identified as potentially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*. 1991;147: 1975-1982.
3. Hérion P, Hernández-Pando R, Dubremetz JF, Saavedra R. Subcellular localization of the 54-kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1993;79:216-222.
4. Beckers CJM, Dubremetz JF, Mercereau-Pujalon O, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol*. 1994;127:947-961.
5. Sadak A, Taghy Z, Fortier B, Dubremetz JF. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988;29:203-211.
6. Van Gelder P, Bosman F, De Meuter F, Van Heuverswyn H, Hérion P. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1993;31:9-15.

VIII. Señales celulares en *Entamoeba histolytica*. El papel del Ca²⁺

Isaura Meza,* Eloísa Carbajal,* Rebeca Manning-Cela,* Alberto Piña*

Cada día existe más evidencia que indica que la interacción de los receptores para matriz extracelular, en forma general conocidos como integrinas, con su ligando, tiene un papel importante en la transducción de señales en las células eucarióticas. La interacción de los trofozoítos de Enta-

moeba *histolytica* con la fibronectina (FN) promueve la adhesión de las células a la proteína y más adelante su degradación *in situ*.¹ La unión se lleva a cabo a través de péptidos específicos localizados en la superficie del parásito.² La unión a superficies cubiertas con FN induce además la reorganización

Departamento de *Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D. F.*
Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Isaura Meza, Departamento de *Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Avenida Politécnico Nacional No. 2508, Zacatenco, México, D. F.*

del citoesqueleto de los trofozoitos dando como resultado la formación de placas de adhesión de actina múltiples contactos focales entre las amibas y el sustrato.^{1,3}

Los mecanismos de transducción de señales que conducen a la respuesta de las amibas a la FN no se conocen totalmente; sin embargo, hay indicios de que el inositol trifosfato y la proteína cinasa C actúan como mensajeros secundarios una vez que interactúa la FN con su receptor.⁴ Hay además una fosforilación específica de proteínas del citoesqueleto y rearrreglos de la actina inducidos por activadores de la proteína cinasa C. El efecto contrario se produce por antagonistas de la cinasa.

El Ca^{2+} es otro de los mensajeros secundarios que en la mayoría de las células eucarióticas se activan durante la transducción de señales. Las modificaciones en los niveles citoplásmicos de Ca^{2+} regulan a su vez la activación de otras vías de señalización interna que regulan diversas funciones celulares.^{5,6} En este trabajo, examinamos las modificaciones del calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) inducidas en los trofozoitos por la interacción con la FN y su efecto sobre la adhesión y la organización del citoesqueleto de actina. La FN produce un incremento rápido y continuo de $[Ca^{2+}]_i$, que podría estar relacionado con el incremento en la adhesión también muy rápida, de los trofozoitos a superficies cubiertas con FN. Encontramos que los ionóforos de calcio A23187 y ionomicina incrementaron significativamente la adhesión de los trofozoitos a FN, mientras que la disminución de $[Ca^{2+}]_i$, producida por el tratamiento con los ionóforos en presencia de EGTA o usando un quelante de Ca^{2+} como BAPTA/AM, bloqueó la adhesión casi totalmente. Estos resultados sugieren una participación importante del calcio externo en la respuesta a FN, así como un mecanismo de regulación de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de los trofozoitos.

Para estudiar el posible papel del calcio interno, probamos la droga tapsigargina (TG), que se ha reportado que produce un incremento del Ca^{2+} citosólico debido a la inhibición de las Ca^{2+} ATPasas del retículo endoplásmico. TG produjo en las amibas un incremento transitorio y pequeño de $[Ca^{2+}]_i$, lo cual junto con la ligera estimulación que produjo en la adhesión, apoya la idea de que la acción de la FN depende principalmente del flujo externo del Ca^{2+}

hacia el citoplasma de los trofozoitos estimulados. Una mejor organización de las placas de adhesión y de los contactos focales así como el cambio de actina soluble hacia la forma F-actina filamentososa que se observaron como resultado del estímulo con la FN, fueron también resultado de los incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ y fueron afectados negativamente por su disminución, sugiriendo una correlación entre los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y la organización del citoesqueleto.

Evidencia adicional para suponer que Ca^{2+} es un mediador en la respuesta, fue obtenida de experimentos en los que utilizamos antagonistas de calmodulina, una proteína que se une a y es regulada por Ca^{2+} . Observamos una adhesión pobre y una organización de las placas de actina muy defectuosa en los trofozoitos tratados con 3 diferentes antagonistas de calmodulina. Esto se podría explicar puesto que al inhibirse la calmodulina se tendría un efecto negativo sobre proteínas que regularmente se asocian a la actina para formar y organizar a los filamentos de actina, que son los elementos estructurales de las placas de adhesión. Este estudio presenta las primeras observaciones obtenidas sobre la regulación de Ca^{2+} en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y proporciona evidencias sobre la participación de Ca^{2+} en los mecanismos de transducción de señales de este parásito.

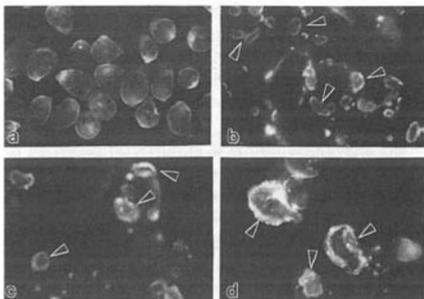


Figura 1 Placas de adhesión en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a. Trofozoitos sobre vidrio b. Trofozoitos sobre un sustrato de fibronectina c. Trofozoitos sobre un sustrato de fibronectina y tratados con el ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina d. Trofozoitos tratados con un éster de forbol (PMA) La actina filamentososa que forma las placas de adhesión señaladas por cabezas de flecha, se tiñó con el colorante de fluorescencia y se observaron al celularo microscopio equipado para epifluorescencia

Referencias

1. Talamás-Rohana P, Meza I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeletal organization. *J Cell Biol.* 1988;106:1787-1794.
2. Vázquez-Prado J, Meza I. Fibronectin "Receptor" in *Entamoeba histolytica*. Purification and association with Cytoskeleton. *Arch Med Res.* 1992 23:125-128
3. Vázquez J, Franco E, Reyes G, Meza I. Characterization of Adhesion Plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell Motil and Cytoskeleton.* 1995;32:37-45
4. Santiago A, Carbajal ME, Benítez-King G, Meza I. *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Exp Parasitol* 1994;79:436-444.
5. Gimound C, Aumailley M. Cellular interactions with the extracellular matrix are coupled to diverse transmembrane signaling pathways. *Exp Cell Res.* 1992;203:365-373
6. Schwartz MA. Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevations of intracellular free calcium. *J Cell Biol.* 1993;120:1003-1010.

IX. Motilidad en *Toxoplasma gondii*

Ricardo Mondragón,* Isaura Meza,** Eugenio Frixione.**

Introducción

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado con una amplia distribución geográfica e invade a un gran número de huéspedes, incluyendo animales de interés veterinario y al hombre. En humanos es un importante patógeno con la capacidad de producir graves daños orgánicos incluso fatales, principalmente en pacientes inmunodeprimidos como ocurre en los enfermos de SIDA, en los casos de trasplante de órganos, en personas con tratamientos anticancerígenos, en el feto y en recién nacidos, ocasionando en ellos cuadros como la coriorretinitis y consecutiva pérdida de la visión, daños en el sistema nervioso central, pulmones, corazón y el sistema retículo endotelial, y en casos extremos, aborto o incluso la muerte de adultos infectados.⁹

En individuos sanos e inmunocompetentes la infección con el parásito ocurre de manera transitoria e incluso inaparente, sin producir daños de importancia, debido a la eficacia del propio sistema inmune que es capaz no sólo de limitar la infección, sino de eliminarla completamente y dejar al individuo inmune a posteriores contactos.

En México se ha encontrado una alta prevalencia de anticuerpos producidos por infecciones con toxoplasma, principalmente en las regiones costeras del Golfo y en una menor proporción en el norte del país, lo cual significa que este tipo de poblaciones está expuesta frecuentemente a este parásito y, aunque no sufren una enfermedad grave, bajo condiciones propicias, el parásito puede proliferar provocando los efectos antes descritos.²⁸

Mecanismos de invasión

Toxoplasma gondii invade a casi todas las células del organismo, independientemente de sus características fisiológicas.^{13,30} Afecta tanto a células fagocíticas como a no fagocíticas. Se han descrito dos formas por las cuales el taquizoito, es decir la forma invasiva del toxoplasma puede penetrar al citoplasma. Una es mediante la fagocitosis del parásito por macrófagos y células fagocíticas generalmente implicadas en la defensa del organismo, en donde el parásito se aloja y prolifera en

* Departamento de Inmunoparasitología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. S. Sa.

** Departamento de Biología Celular

*** Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados. IPN.

Correspondencia y solicitud de sobretiros Dr Ricardo Mondragón, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas, Departamento de Inmunoparasitología, Prolongación Carpio #470, 2° piso, Delegación Miguel Hidalgo. C.P. 11340. México D. F.

el fagosoma sin ser destruido.^{1, 12, 16} La segunda, que corresponde a la penetración por vía activa, generalmente ocurre en las células no fagocíticas, es decir, la mayoría de las células del cuerpo.^{16, 30} Este tipo de invasión se lleva a cabo mediante una compleja serie de sucesos y se desarrolla en sólo 15-40 segundos mientras que el proceso de fagocitosis requiere de aproximadamente unos 120 segundos.

La penetración activa involucra varias etapas, y se inicia con la activación de la motilidad del parásito, seguida por la extrusión del conoide, un organelo ubicado apicalmente que tiene la capacidad de proyectarse o retraerse dependiendo de si el parásito se encuentra en reposo o invadiendo a su célula huésped respectivamente, y finalmente se lleva a cabo la secreción de componentes de tipo enzimático con funciones facilitatorias de la penetración, provenientes de organelos con función de almacenaje conocidos como roptrias.^{11, 30} El vaciamiento de estos componentes se lleva a cabo en la vecindad de la membrana de la célula blanco y genera una alteración en la integridad de la membrana celular facilitando así la penetración del parásito mediante movimientos de deslizamiento y de tipo tornillo, alojándose y proliferando dentro de la vacuola parasitófora.^{13, 30} Una vez dentro, el parásito se multiplica mediante endodiogenia llenando el espacio intravacuolar. Bajo condiciones aun desconocidas, pero que probablemente incluyen la elevación de calcio citoplásmico, el parásito sale de la célula infectada, al parecer a través de un proceso activo con una serie de sucesos similares a los involucrados durante la penetración.¹ La exteriorización destruye a la célula huésped, y el parásito invade a nuevas células vecinas. No obstante la importancia de la motilidad del *Toxoplasma gondii* y en general de los apicomplexa en la invasión de las células huésped, existen pocos estudios dirigidos a conocer las bases moleculares de la locomoción y las señales inductoras de la motilidad.^{2, 19, 22, 26, 27} En las líneas que siguen, se presentan resultados obtenidos en relación con la activación de la motilidad y la extrusión del conoide en parásitos aislados, en ausencia de células huésped, así como el análisis de los mecanismos de regulación iónica de estos

procesos. Finalmente se comentará sobre la estrategia seguida para el análisis cinemático de la motilidad inducida, utilizando para ello un modelo digital del *Toxoplasma gondii*.

Inducción de la motilidad *in vitro*

Para el estudio de la motilidad de los taquizoítos se utilizó un sistema de videomicroscopía con contraste acentuado electrónicamente, y mediante el uso de una cámara de incubación especial se realizaron recambios de las soluciones en estudio con el fin de determinar condiciones inductoras de la motilidad. Los resultados fueron registrados en cintas magnéticas y su análisis se realizó mediante la reproducción de la secuencia grabada a velocidad normal, lenta o cuadro por cuadro.

Toxoplasma gondii se mantiene mediante la inoculación intraperitoneal de ratones Balb/c con la suspensión de taquizoítos. Recién obtenidos, los taquizoítos son poco móviles, entre un 5 - 7% de la población muestran una motilidad transitoria. Adicionalmente, el conoide que es un organelo con características móviles muy particulares y que tiene la propiedad de proyectarse durante la invasión por vía activa, se encuentra generalmente retraído.

Dentro de las diversas condiciones evaluadas, se encontró que el tratamiento suave con tripsina, una enzima proteolítica, induce la motilidad de los taquizoítos.¹⁴ La activación se logra con concentraciones de la enzima del orden de 0.002 - 0.005% en PBS, induciendo una rápida activación del movimiento hasta de un 25% de la población y que disminuye con el tiempo.

Se lograron inducir *in vitro*, dos tipos de movimientos en el parásito, equivalentes a los descritos que ocurren durante la invasión de la célula blanco, uno es el movimiento rotativo, y el otro es el movimiento de deslizamiento.^{6, 19, 30}

El movimiento rotativo se caracteriza por la adhesión del parásito al sustrato (poli-L-lisina sobre vidrio) por su extremo posterior y por giros dirigidos por el extremo anterior en el sentido de las manecillas del reloj (Figura 1). Al mismo tiempo, el parásito rota en torno a su eje sin un aparente desplazamiento. El sentido del movimiento descri-

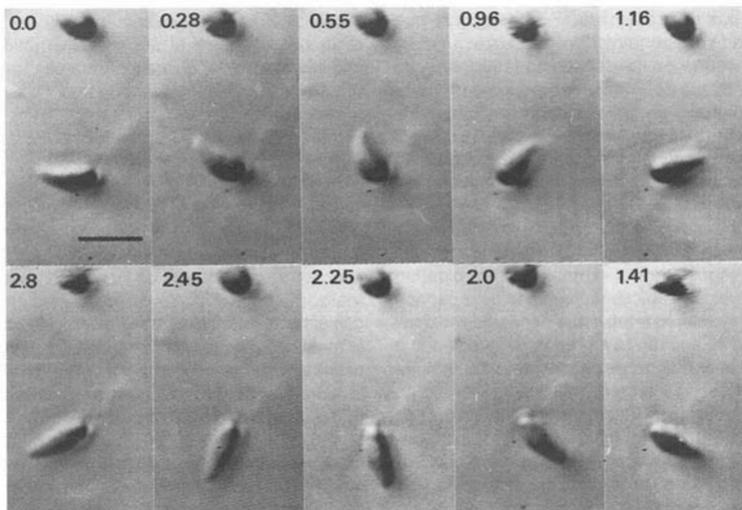


Figura 1 Secuencia videomicrográfica del movimiento rotativo en un taquizoito activado por una tripsinización suave (escala = 5 μ m).

to, parece estar relacionado con la orientación helicoidal de los 22 microtúbulos subpeliculares que conforman el citoesqueleto del *Toxoplasma gondii* y que están dispuestos en sentido contrario al de las manecillas del reloj,¹⁷ (Figura 2). Adicionalmente, el sentido del movimiento rotativo está relacionado con la dirección que presenta el parásito cuando se desplaza sobre el sustrato o cuando se introduce a una célula. La rotación en sentido contrario ocasionaría un movimiento en reversa que no ha sido observado en el laboratorio.

El segundo tipo de movimiento que presenta el toxoplasma cuando es activado es el de torsión y deslizamiento (Figura 3), mediante el cual el parásito se desplaza varias micras sobre el sustrato mediante giros y deslizamientos a lo largo de su eje longitudinal. Los giros que el parásito tiene el mismo sentido que el descrito para el movimiento rotativo. Este tipo de movimientos le permiten al parásito desplazarse y encontrar la zona de la célula a través de la cual penetrará al citoplasma. En ocasiones ambos movimientos, el de rotación y el de deslizamiento, se presentan consecutivamente en un mismo individuo.¹⁴

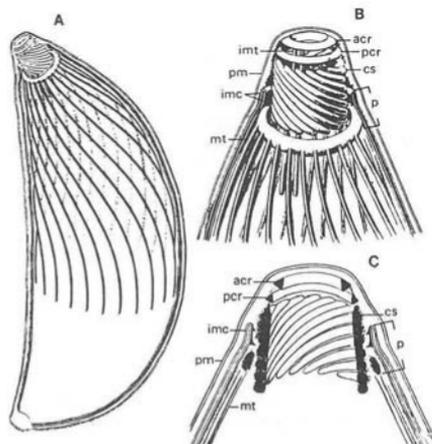


Figura 2. Diagrama del citoesqueleto de microtúbulos (A) y de las estructuras conoidales (B, C). imt, microtúbulos internos; pm, membrana plasmática; imc, complejo intramembranal; mt, microtúbulos; acr, pcr, anillos conoidales; cs, subunidad del conoide; p, películo. C, corresponde a un corte transversal del conoide. Modificado de Nichols & Chiappino, 1987.

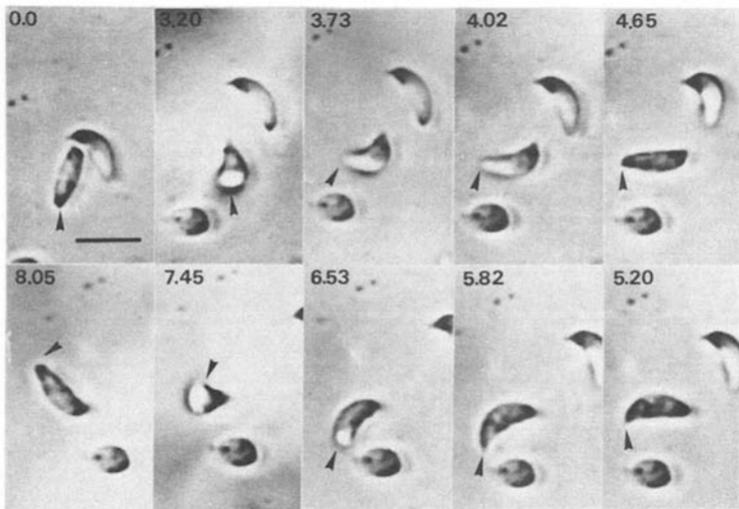


Figura 3. Secuencia videomicrografica del movimiento de deslizamiento de *Toxoplasma gondii* (escala = 5 μ m)

Por lo que respecta al efecto de la tripsina, se ha encontrado que éste se debe específicamente a su acción enzimática, ya que el efecto inductor no se presenta al adicionar el inhibidor de soya de esta enzima. Bajo el microscopio electrónico de transmisión, los taquizoítos tripsinizados mostraron la presencia de pequeñas zonas de discontinuidad en la membrana plasmática, reveladas mediante la infiltración con rojo de ruteno presente durante la fijación química (Figura 4). Este colorante penetra y tiñe sólo el espacio entre la membrana plasmática y el complejo pelicular interno. La acción de la enzima no afectó las membranas internas ni la morfología general del toxoplasma. Los taquizoítos no tripsinizados no presentan estos parches. Una vez eliminada la tripsina de los taquizoítos, se regeneran en un breve tiempo las zonas de la membrana digeridas por la acción de la enzima sin afectar al parásito.

Los taquizoítos activados pierden el movimiento cuando se elimina la tripsina del medio mediante lavados con solución salina amortiguada (PBS). Sin embargo la adición consecutiva de iones como calcio o magnesio en presencia de ATP y en ausen-

cia de la enzima, indujo una segunda activación de la motilidad en una proporción mayor que la observada con la tripsina, ya que cerca del 60% de los parásitos son activados (Figura 5). La presencia del catión es necesaria, ya que la adición de EGTA al medio inhibe la activación de estos elementos de manera individual sólo genera activación parcial. Se ha sugerido que las zonas digeridas por la enzima, permiten la entrada temporal de componentes externos como los iones y son de esta manera susceptibles a sus efectos fisiológicos. La integridad estructural del parásito no se ve mayormente alterada por estas perforaciones, debido por una parte a la limitada exposición a la tripsina y por otra a la gran estabilidad que le confiere el complejo pelicular interno y la red de microtúbulos subpeliculares.

La motilidad es un requisito para la invasividad. Durante la penetración activa el toxoplasma se desliza sobre la membrana de la célula blanco en búsqueda probablemente de un sitio adecuado por el cual penetrar. Cuando los parásitos no son móviles por lo tanto pierden su capacidad invasiva.²⁰

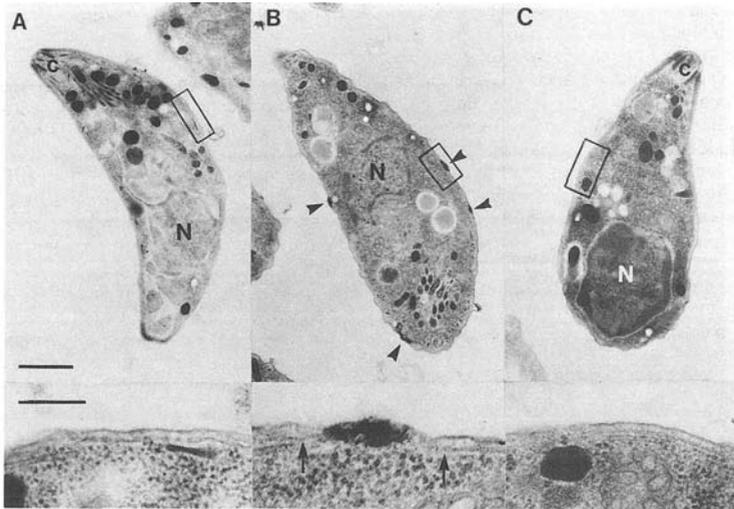


Figura 4 Ultraestructura de taquizoitos control (A) y tripsinizados (B, C) correspondiente a taquizoitos tripinizados y a taquizoitos control para inducir la regeneración de la membrana. Las células fueron fijadas en presencia de ruthenium. Las cabezas de flecha indican los sitios donde actuó la tripsina [Paneles superiores: escala = 1 μ m, Paneles inferiores: escala = 200 nm].

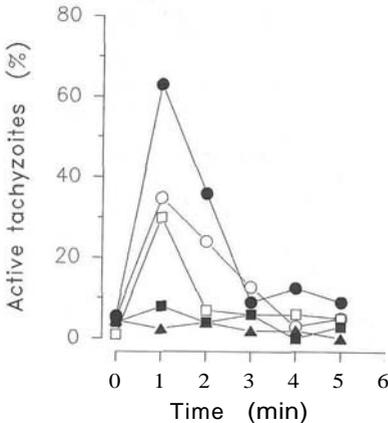


Figura 5. Cinética de inducción de la motilidad por calcio y ATP en taquizoitos pre-tripsinizados: círculo lleno, 1mM CaCl₂, 1mM ATP; cuadro vacío, 1mM ATP; círculo vacío, 5mM ATP; cuadrillo lleno, 1mM CaCl₂; triángulo lleno, PBS.

Los taquizoitos activados bajo nuestras condiciones, son altamente invasivos. Ensayos de invasión realizados en células epiteliales (MDCK) cultivadas *in vitro* demuestran que los parásitos tripsinizados y activados con calcio y ATP, no sólo retienen su capacidad infectiva, sino que la incrementan hasta 4 veces con respecto a los controles. Estos hallazgos sugieren que la motilidad inducida estimula la capacidad invasiva de los taquizoitos.

A través del uso de una serie de drogas de acción específica es posible conocer que elementos del citoesqueleto están involucrados en la motilidad de un sistema celular.^{3,5}

La motilidad espontánea de varios apicomplexas se ha podido inhibir mediante el uso de las citocalasinas B y D sin que haya una aparente alteración morfológica.¹⁰ Ambos alcaloides obtenidos de diversos hongos, son moléculas que se unen a los extremos de los filamentos de actina despolimerizándolos e inhibiendo una posterior polimerización.⁵ El efecto de estas drogas sugiere que el movimiento del parásito está determinado

por la acción de este tipo de filamentos como ocurre en muchos sistemas celulares móviles. No obstante, hasta el momento sólo se ha encontrado actina en su forma monomérica y no en la filamentososa, lo cual dificulta la interpretación del fenómeno.^{4, 8, 31} Sin embargo, no se ha excluido la posibilidad de que estos componentes estén constituidos no como las típicas fibras de tensión conformadas por decenas de filamentos individuales descritas en otros eucariontes, sino como filamentos únicos con idéntica función, lo cual dificulta su observación por medio de los métodos convencionales.

Otro componente del citoesqueleto son los microtúbulos. La incubación con drogas como la colchicina y el nocodazol, que los despolimerizan, no altera la motilidad de los toxoplasmas, pero sí su morfología, lo cual es lógico considerando que estos componentes determinan y estabilizan la típica forma de este parásito (Figura 6).

Extrusión del conoide *in vitro*

Un segundo proceso de motilidad que se desarrolla durante la invasión de la célula huésped es la extrusión del conoide. El conoide es una estructura con forma de bobina ubicada en la porción apical del toxoplasma, y está constituida por subunidades dispuestas helicoidalmente¹⁷ (Figura 2). El conoide interviene como un órgano de ataque durante la invasión celular.³⁰ Durante la invasión, el parásito busca una zona apropiada en la membrana celular por la cual penetrar, posteriormente extruye el conoide y secreta el contenido de las roptrias.³⁰ Se desconocen los factores que inducen la extrusión del conoide, así como los mecanismos motores involucrados y su regulación durante la penetración.

Mediante el uso de los ionóforos para calcio ionomycinina y A23187,^{18, 24} se logró inducir en medios químicamente definidos y en ausencia de

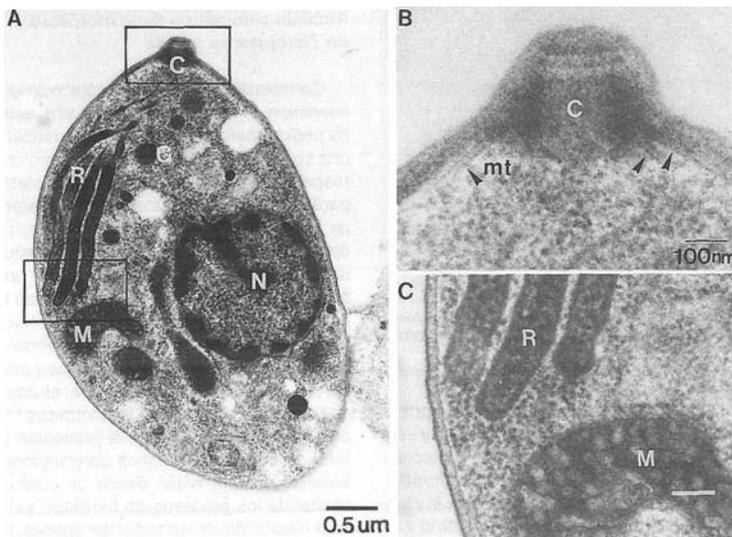


Figura 6. Ultraestructura de un taquizoito tratado con colchicina 5 mM. Nótese que los extremos distales de los microtúbulos desaparecen, conservándose solo aquellos asociados al anillo conoidal. A, escala 0.5 μ m; B, C, escala 100 nm.

células blanco la extrusión del conoide de manera reversible (Figura 7).¹⁵

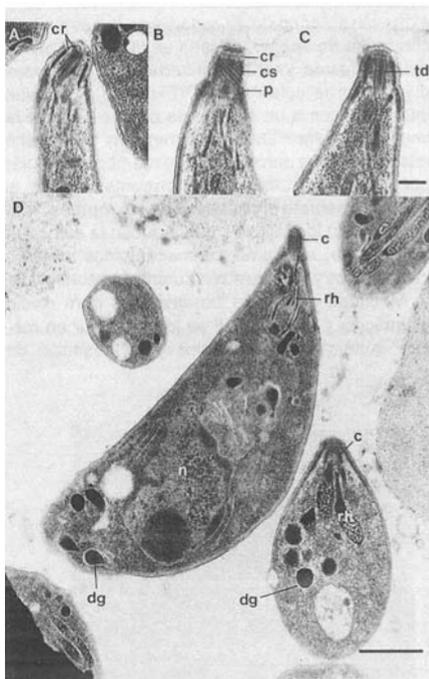


Figura 7. Ultraestructura de un taquizoito con el conoide extruido inducido por el ionóforo para calcio, A23187. A, B, C: escala = 100nm; Q: escala = 1 μ m. (cr, anillos conoidal; cs, subunidades del conoide; p, anillo polar; td, ducto; C, conoide; rh, roptrias; dg, gránulos densos).

La activación de este proceso ocurre de manera rápida en un gran porcentaje de la población y está determinada por una elevación de calcio citoplásmico proveniente probablemente de reservorios intracelulares sensibles al ionóforo, ya que el efecto se observa en presencia de EGTA externo y es bloqueado parcialmente por BAPTA, un componente que es capaz de atravesar la membrana plasmática del parásito y que el calcio depleta en un momento dado a la célula de este catión.²⁵

Adicionalmente la cafeína y la tapsigargina, drogas que inducen una elevación intracelular de calcio sea por la salida de este catión a partir del retículo endoplásmico o por una inhibición de la bomba de calcio encargada de mantener los niveles internos de calcio, respectivamente,^{23,29} activan la extrusión del conoide aunque en una proporción menor que con el ionóforo. Se encontró también que la citocalasina D bloquea la extrusión del conoide inducida por los ionóforos para calcio, lo cual indica que en este proceso de motilidad intervienen los filamentos de actina. La colchicina no pareció afectar a este proceso. Otros investigadores han descrito en la zona del conoide, la presencia de actina y miosina,^{4, 8, 21, 31} ambas moléculas involucradas en la generación de fuerza motriz en la mayoría de las células eucariontes, lo cual apoya la conclusión de que la actina participa en la motilidad de *Toxoplasma gondii*, como sugiere también la inhibición del proceso con la citocalasina D.

Análisis cinemático de la motilidad de *Toxoplasma gondii*

Con relación al análisis mecánico de los tipos de movimiento inducidos en el parásito, éste sólo se ha podido realizar de una manera parcial debido a una serie de limitaciones, tanto de tipo conceptual respecto a la estructura de citoesqueleto en este parásito, como de carácter técnico referente al tipo de información que proporcionan el microscopio óptico o electrónico. En cuanto al citoesqueleto, se desconoce el tipo de organización que presenta la actina en estos parásitos y de hecho en todos los Apicomplexa. Los filamentos de actina, que en otros sistemas celulares se han detectado y se les han demostrado funciones motoras junto con diversas proteínas accesorias, en el caso de los Apicomplexa no han sido encontrados.^{4, 8, 21, 31} Por otro lado, la perspectiva que presentan los sistemas de microscopía óptica convencionales, que consiste en una visión desde un punto de vista cenital de los procesos de motilidad así como la baja resolución de los sistemas ópticos, no permiten la identificación inequívoca de los elementos individuales del citoesqueleto en acción. En el caso de la microscopía electrónica es necesaria la fijación de las muestras antes de su observación, lo

cual anula la posibilidad del estudio de procesos dinámicos celulares.

Una alternativa metodológica que estamos desarrollando para el análisis de la motilidad del *Toxoplasma gondii* es la reconstrucción tridimensional del taquizoito como un modelo digital a partir de micrografías electrónicas, y la animación del modelo conforme a secuencias videomicrográficas de la célula en movimiento, obteniendo así los datos cinemáticos del movimiento de este parásito.

Para la generación del modelo tridimensional, se procesaron taquizoitos purificados por métodos convencionales para microscopía electrónica de transmisión, y se hicieron cortes seriados de taquizoitos embebidos en resinas plásticas. Posteriormente en las micrografías del taquizoito seleccionado, se delineó el perfil de la membrana plasmática y se digitalizaron las imágenes correspondientes. Posteriormente las imágenes fueron interpoladas otorgándoles un espesor de 300 nm a cada sección y se contruyó el modelo digital respectivo.

El modelo fue animado conforme a los datos morfológicos y temporales obtenidos mediante videomicroscopía de contraste por iluminación asimétrica.¹⁴ Utilizando las imágenes videomicrográficas, se manipuló el modelo digital de tal manera que la conformación general del cuerpo celular así como patrón sombreado correspondiera. Hasta el momento, los resultados obtenidos ofrecen una simulación bastante cercana a la realidad de la actividad motil de *Toxoplasma gondii*, que permite un análisis más completo desde diversas perspectivas de observación. Además de la información cualitativa, el método nos ha permitido distinguir las diferencias de varios movimientos típicos del parásito en términos de parámetros cinemáticos. Adicionalmente, la asignación de estos datos a un modelo de citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*, ofrece la posibilidad de visualizar las transformaciones estructurales que muy probablemente experimenta el parásito durante la actividad mótil.

Conclusión

Existen varios aspectos por estudiarse respecto a los motores biológicos que posee el *Toxoplasma*

gondii y que utiliza eficientemente para poder infectar a una célula blanco.

Posiblemente el conocimiento de estos procesos permita en un momento dado proponer estrategias dirigidas hacia la inhibición de los fenómenos de motilidad de esta célula como alternativas para disminuir su capacidad infecciosa.

Referencias

1. Aikawa M, Komata Y, Asai T, Midorikawa O. Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. *Am J Pathol*. 1977;87:285-296
2. Augustine CP. Effect of polyions. Ca²⁺ and enzymes on penetration of cultured cells by *Eimeria meleagridis* sporozoites. *J Parasitol*. 1980;66:498-501.
3. Brady D. Cell movements. Gariand Publishing, Inc. New York. USA. 1992, pp. 3-16.
4. Cintra WM, De Souza W. Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Submicroscopiol*. 1985;17:503-508.
5. Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987;105:1473-1478.
6. Doran DJ. Behavior of *Coccidia in vitro*. In: Long P.L. (ed). The biology of the Coccidia. Edward Arnold Publishers. London. 1982;Pp: 229-285.
7. Endo T, Sethi KK, Piekarski G. *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187 mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp Parasitol*. 1982;53:179-188.
8. Endo T, Yagita K, Yasuda T, Nakamura T. Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 1988;75:102-106.
9. Calil KF, Falleiros CL. *Toxoplasmosis*. *Infectologia*. 1981;2:119-133.
10. Jensen JB, Edgar SA. Effects of antiphagocytic agents on penetration of *Eimeria magna* sporozoites into cultured cells. *J Parasitol*. 1976;62:203-206.
11. Joiner KA, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect Immun*. 1993;61:1169-1172.
12. Jones TC, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 1972;136:1173-1182.
13. McLeod R, Mack D, Brown C. *Toxoplasma gondii*. New advances in cell biology and molecular biology. *Exp Parasitol*. 1991;72:109-125.
14. Mondragón R, Meza I, Frixione E. Divalent cations and ATP dependent motility of *Toxoplasma gondii* tachyzoites after mild treatment with trypsin. *J Euk Microbiol*. 1994; 41(4):330-337.
15. Mondragón R, Frixione E. Ca²⁺ dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Euk Microbiol*. 1996;43(2):120-127.

16. Nichols BA, O'Connor GR. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab Invest.* 1981;44:324-335.
17. Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool.* 1987;34:217-226.
18. Pressman BC. Biological applications of ionophores. *Ann Rev Biochem.* 1976;45:501-530.
19. Russell DG, Sinden RE. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J Cell Sci.* 1981;50:345-359.
20. Ryning F, Remington JS. Effect of cytochalasin on *Toxoplasma gondii* cell entry. *Infect Immun.* 1978;20:739-743.
21. Schwartzman JD, Pfefferkorn ER. Immunofluorescent localization of myosin in the anterior pole of the coccidian *Toxoplasma gondii*. *J Protozool.* 1983;30: 657-661.
22. Speer CA, Datus MH, Gary LK. Stimulation of motility in merozoites of five *Eimeria* species by bile salts. *J Parasitol.* 1970;56:927-929.
23. Thastrup O, Cullen PI, Drobak K, Hanley MK, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *P.N.A.S. USA.* 1990;87:2466-2470.
24. Toeplitz BK, Cohen AI, Funke PT, Parker WL, Gougoutas JZ. Structure of ionomycin. A novel diacidic polyether antibiotic having high affinity for calcium ions. *J Amer Chem Soc.* 1979;191:3344
25. Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties of prototype structures. *Biochem.* 1980;12:2396-2404.
26. Upton JS, Tilley M. Effect of selected media supplements on motility and development of *Eimeria nieschulzi* *in vitro*. *J Parasitol.* 1992;78:329-333.
27. Vanderberg JP. Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *J Protozool.* 1974;21:527-537.
28. Velasco O, Sepúlveda Amor J, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra-Izaba R. Encuesta nacional seroepidemiológica III. Toxoplasmosis. *Epidemiologia. Sistema Nacional de Salud.* 1990;5(11):161-172.
29. Weber A, Herz R. The relationship between caffeine con-tracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J Gen Physiol.* 1968;52:750-759.
30. Werk R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells?. *Rev Infect Dis.* 1985;7:449-457.
31. Yasuda T, Yagita K, Nakamura T, Endo T. Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1988;75:107-113.

X. Actualidades en el estudio de la inmunología local y su aplicación en parasitosis

Marco A Vega-López*

Resumen

La inmunología de las mucosas ha adquirido gran importancia, principalmente por la necesidad de comprender mejor la manera de estimular respuestas inmunes que prevengan enfermedades. En México donde se reconoce la importancia de las enfermedades infecciosas que afectan mucosas (diarreas, neumonías, parasitosis) y existe un aumento preocupante de hipersensibilidades (asma, intolerancia alimentaria) no hay suficientes grupos dedicados a la investigación en esta área.

El objetivo principal de los mecanismos de defensa de las mucosas es impedir la entrada del antígeno (Ag) (exclusión inmune) y evitar respuestas sistémicas indeseables (hipersensibilidad, autoinmunidad), por ejemplo contra Ags de la dieta. Una cantidad considerable de parásitos tienen como blanco o emplean las mucosas del organismo en alguna fase de su vida. A pesar de su indudable importancia, la inmunología de las mucosas en las infecciones parasitarias no ha sido estudiada en profundidad. Solo algunos estudios han abordado este tema usando animales de laboratorio y, afortunadamente, en los últimos años tienden a incrementarse.

*En el CINVESTAV, se estudia la inmunidad de las mucosas empleando un enfoque multidisciplinario, en proyectos que involucran parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichinella spiralis*. Tales estudios utilizan metodologías de vanguardia que se describen brevemente en este artículo.*

Palabras clave: *Inmunología de las mucosas, intestino, parásitos, exclusión inmune, ELISPOT, inmunohistoquímica, PCR, hibridación in situ, citosinas.*

Summary

Mucosal immunology has become one of the main subjects of immunology due to its importance in the development of local immune responses. In Mexico, where mucosal infectious diseases (diarrhea, pneumonia and parasitosis) are still a major health problem and where there is an increased number of hypersensitivity reactions in humans (asthma, food intolerance), there are not enough research groups devoted to this area.

The mucosal immune system prevents the antigens from reaching the organism by a mechanism known as immune exclusion. In a similar way it also prevents the onset of systemic deleterious immune responses such as autoimmunity and hypersensitivity to harmless antigens. A considerable amount of parasites infect mucosal surfaces. In spite of this, there are few studies on the local immune response elicited against parasites.

*In the Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Mexico), mucosal immunology is being studied in a multidisciplinary way involving research of the local immune response against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichinella spiralis*. In these, animal models such as the mouse, gerbil, rat and even the pig are used. A brief description of the state-of-the-art methodologies used in these studies is given in this paper.*

Key words: *Mucosal immunology, gut, parasite, ELISPOT, immunohistochemistry, PCR, in situ hybridization, cytokines.*

*Profesor Adjunto, Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Marco A Vega López, Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN. Av. IPN 2806, Col. Zacatenco, México 07360, D. F., MÉXICO. e-mail. mavega@gene.cinvestav.mx.

Introducción

El estudio de la inmunología local o de las mucosas del organismo ha adquirido gran importancia en los últimos quince años, principalmente por el acelerado avance tecnológico en el área biomédica y por las cada vez más apremiantes necesidades de desarrollar inmunógenos orales para la creciente población del tercer mundo.¹

La inmunología de las mucosas tiene relevancia particular si consideramos que la mayoría de los agentes patógenos que infectan a un organismo tienen como blanco o vía de entrada una mucosa corporal. Esto puede apreciarse mejor al saber que la superficie cubierta por las mucosas es 200 veces mayor que la que ocupa la piel (2 m² vs 400 m²), el tejido más grande del cuerpo humano.² Los mecanismos de defensa de esos lugares son especialmente efectivos para resolver la mayoría de los problemas infecciosos. A pesar de ello, las principales causas de muerte infantil en el tercer mundo siguen siendo las enfermedades diarreicas y las neumonías,³ de ahí la necesidad de comprender mejor los mecanismos de defensa locales y la manera de estimular respuestas inmunes en las mucosas que prevengan estas enfermedades.

Estudio de la inmunología de las mucosas

Desde principios de siglo, Besredka estableció que existen respuestas inmunes locales que no es posible medir sistémicamente. A pesar de ello transcurrieron más de 40 años antes de que se reconociera la importancia de la inmunidad secretoria al descubrirse la IgA de secreciones (IgAs).⁴ Parte de este lento desarrollo en el estudio de la inmunidad de mucosas se debió a la falta de modelos experimentales adecuados y de herramientas técnicas apropiadas para medir las respuestas locales. Quizá más importante aún, dicho retraso se debió a la idea preconcebida de que las respuestas locales debían seguir un comportamiento similar a las sistémicas.

El desarrollo de técnicas más sensibles de evaluación de anticuerpos en fluidos diferentes al suero y, sobre todo, el uso de anticuerpos monoclonales (MAb), facilitaron la tarea de determinar minutas cantidades de células y productos del sistema inmune local, permitiendo el avance de esta área.

Debido a las perspectivas que tiene en el control de enfermedades infecciosas, parasitarias y autoinmunitarias, la inmunología de mucosas se ha expandido en los últimos quince años hasta tener un lugar importante en el estudio de la inmunología. Fiel testimonio de ello lo tenemos en el reciente 8^o Congreso Internacional de Inmunología de Mucosas efectuado en San Diego, Cal. EU en el verano de 1995, que reunió a casi 900 asistentes de todo el orbe.

Resulta paradójico que en México, donde se reconoce la importancia de las enfermedades infecciosas que afectan mucosas (diarreas, neumonías, parasitosis) y existe un crecimiento preocupante de hipersensibilidades (asma, intolerancia alimentaria) no haya grupos dedicados a la investigación en esta área.

Generalidades de la inmunología de las mucosas

Los principios generales de la inmunología sistémica son aplicables a la de mucosas, sin embargo existen diferencias importantes que debemos tener en cuenta para su estudio. Por ejemplo, el objetivo principal de los mecanismos de defensa, tanto inespecíficos (innatos) como específico (inducibles) de las mucosas es impedir la entrada del antígeno (Ag) (exclusión inmune), sea éste un microorganismo, parásito o toxina y, por ello, esta respuesta no es de tipo esterilizante como la sistémica. Además, las defensas locales están diseñadas para evitar respuestas sistémicas indeseables (hipersensibilidad, autoinmunidad), por ejemplo contra Ags de la dieta, ya sea tolerizando o suprimiendo la respuesta circulante.⁶ Por lo tanto sus mecanismos de regulación parecen diferir de manera importante de los de la inmunidad sistémica y éste es un campo de investigación en pleno auge en la actualidad.

El reconocimiento tardío de esas dos características de la respuesta inmune en mucosas ha contribuido al retraso en su estudio, ya que las investigaciones en el campo casi siempre han perseguido la búsqueda de parámetros similares a los sistémicos (inmunidad esterilizante y respuesta circulante de memoria) por lo que por mucho tiempo se le consideró una respuesta poco efecti-

va e incapaz de generar memoria. El desarrollo de nuevas técnicas de medición y sobre todo la aparición de grupos de investigación especializados en esta área han demostrado, inequívocamente, que las respuestas locales son altamente efectivas en el manejo de infecciones y, sobre todo, en la generación de respuestas protectoras de la magnitud, especificidad y localización adecuadas para evitar problemas como la autoinmunidad.

El sistema inmune en las mucosas tiene como característica estructural la existencia de sitios inductores, como las placas de Peyer del tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y las tonsilas del asociado a nariz (NALT) donde ocurre el estímulo antigénico. Este último activa a los linfocitos T y B vírgenes que se diferencian, proliferan y abandonan el órgano para distribuirse en otras mucosas y sitios efectores, como la lámina propia del intestino y el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) que representan la mayor parte del tejido mucosal y en donde residen las células de memoria generadas en los sitios inductores.⁶

Considerando que la superficie que debe proteger es la mayor del organismo,⁷ que la inmunoglobulina de mayor producción en el organismo es la IgA, superando la cantidad producida de todos los demás isotipos,⁸ que la mayor cantidad de células del sistema inmune se encuentra en el intestino, siendo superior a la del total de los órganos linfáticos secundarios,⁹ indudablemente el sistema inmune de las mucosas ocupa el primer lugar entre los mecanismos de protección del organismo. Así, llama la atención que su estudio no haya sido más amplio hasta la fecha.

Papeles de la inmunidad de mucosas y la sistémica

Los parásitos, por su naturaleza, deben alojarse en sitios del organismo en los que causen el menor daño posible al hospedero, asegurando de esta manera su crecimiento y reproducción. Un sitio idóneo para cumplir con estos objetivos es establecerse "fuera" del organismo, en las mucosas, donde los mecanismos internos de defensa (por ej. inmunidad sistémica esterilizante) no los puedan alcanzar.

Una cantidad muy considerable de parásitos de todos tipos tienen como blanco o emplean las muco-

sas del organismo en alguna fase de su vida parasitaria. En la mayoría de casos las defensas inespecíficas del hospedero (barreras físicas, químicas y flora normal) son suficientes para eliminarlos o mantenerlos bajo control. En algunas ocasiones esto no es suficiente y el organismo debe echar mano de los mecanismos específicos de defensa locales (secreción de inmunoglobulinas, células citotóxicas) y sólo en casos muy particulares y, sobre todo cuando las barreras anteriores han sido superadas, la defensa sistémica entra en acción. Esto sugiere que el papel fundamental de la defensa local probablemente sea el controlar la mayoría de las agresiones externas del medio hacia el organismo y sólo en casos extremos hay necesidad de que el sistema inmune sistémico intervenga.

Estas observaciones hacen reflexionar acerca de los posibles papeles diferenciales de la inmunidad sistémica y la local. Es posible que el sistema inmune sistémico tenga como propósito principal conservar la homeostasis eliminando todo aquello que internamente ponga en peligro la integridad del organismo (cáncer, aberraciones fisiológicas, daños internos, envejecimiento, etc.), dejando al sistema inmune local la defensa contra las agresiones externas. Si esto es correcto, posiblemente hemos estudiado al sistema inmune durante un siglo con un enfoque equivocado y las funciones hasta ahora descritas del sistema inmune sistémico están diseñadas para reconocer lo propio y eliminar lo "alterado" más que lo "extraño". Esto explicaría hasta cierto punto la importancia que tiene la ontogenia del sistema inmune en el reconocimiento de lo "propio", empleando una estricta selección positiva y negativa. Por otro lado, también explicaría la presencia de poblaciones celulares que maduran extralímicamente, sobre todo en las mucosas, con capacidad de reconocer una limitada variedad de Ags pero de reacción casi inmediata.¹⁰ Sólo hasta ahora estaríamos en condiciones de empezar a entender como puede el organismo defenderse eficazmente de las infecciones y mantener su homeostasis, discriminando a la perfección lo propio de lo extraño.

Estudios en infecciones parasitarias

Apesar de su indudable importancia la inmunología de las mucosas en las infecciones parasitarias no ha sido estudiada en profundidad. Sería de los

estudios en parásitos abordan las características propias del agente (Ags, ciclo biológico, especiación, etc.) o su efecto en la inmunidad sistémica con fines de diagnóstico y de prevención. Solo algunos estudios en animales de laboratorio han abordado este tema¹¹ y¹² y, afortunadamente, en los últimos años tienden a incrementarse.

En el CINVESTAV, se pretende abordar el estudio de la inmunidad de las mucosas con un enfoque multidisciplinario. Los Departamentos de Biología Celular, Patología Experimental y Genética y Biología Molecular tienen proyectos de estudio que involucran parásitos como la Entamoeba *histolytica*, Giardia lamblia y Trichinella *spiralis*. Tales estudios emplean la metodología disponible de vanguardia y la que describiré brevemente para finalizar este artículo.

Metodologías en uso

El avance tecnológico en el área biomédica en los últimos 20 años ha sido impresionante. Gracias a ello ha sido posible estudiar con detalle aspectos de la inmunología que habían sido relegados previamente. Un ejemplo de ello es la inmunología de las mucosas cuyo estudio se ha visto impulsado con el desarrollo de la tecnología de MAb, las determinaciones de anticuerpos por ELISA, el uso de sondas de DNA recombinante y de amplificación de RNA y DNA (PCR). Con estas herramientas es posible abordar los tres aspectos fundamentales en la investigación de esta área:

1. La caracterización *in situ* de los componentes del sistema inmune mucosal.
2. La determinación de las relaciones fisiológicas entre esos componentes.
3. El estudio de los mecanismos de regulación de la inmunidad local y su posible manipulación.

Para ejemplificar el incipiente interés que ha despertado el estudio de la inmunología local en el área de la parasitología, a continuación describiré brevemente algunas líneas de investigación desarrolladas en el CINVESTAV y delinearé las herramientas técnicas que se están usando.

Evaluación de la respuesta inmune local *in situ*

Uno de los propósitos fundamentales del estudio del sistema inmune de las mucosas es determinar con exactitud su estructura. Para alcanzar este objetivo el empleo de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y de hibridación *in situ* (HIS) han sido herramientas fundamentales.

A través del uso de MAb en IHQ, sobre cortes histológicos del tejido mucosal, se ha descrito la estructura básica de los sitios inductores y efectores de la mucosa intestinal, el fenotipo de las células que contienen y la relación anatómica que guardan entre ellas,^{13,14} información fundamental para inferir su fisiología y regulación. También se ha descrito la ontogenia de tales células en la mucosa intestinal,¹⁵ conocimiento de capital importancia para entender la posible susceptibilidad a infecciones en esos sitios en los organismos jóvenes, así como para el diseño óptimo de esquemas de inmunización, para el control de infecciones.

Un apoyo trascendental en el estudio inmunohistoquímico lo ha dado el análisis de imágenes por computadora (AIC) que ha permitido la cuantificación exacta de los componentes del sistema inmune *in situ*. El sistema consiste de una cámara de video acoplada a un microscopio en donde las preparaciones histológicas (o de cualquier naturaleza) son observadas. La imagen es transmitida a una computadora misma que la procesa y la hace aparecer en una pantalla de monitor. A su vez, el sistema tiene un programa de medición que permite que la imagen presentada en la pantalla pueda ser analizada en parámetros como número de partículas o células, área a medir, perímetro, distancias, etc.

Antes de la aparición y uso de esta tecnología, resultaba muy difícil hacer determinaciones cuantitativas, lo que impedía la comparación adecuada entre individuos y grupos. El AIC permite la determinación exacta del área de medición que, aunada a la tinción de marcadores de superficie de poblaciones celulares específicas por IHQ con MAb, ha facilitado la medición de la densidad de células de determinada estirpe en los diferentes sitios de la mucosa. De esta manera es posible medir los efectos de las infecciones parasitarias en las mucosas al comparar los números de células presentes en los animales normales y en los parasitados.

Esos datos también facilitan el desarrollo de protocolos de separación de células del tejido ya que un error muy común en el pasado era el de obtener poblaciones muy reducidas de células después de seguir protocolos de separación muy prolongados, que no representaban fielmente las poblaciones de la mucosa, por lo que los resultados obtenidos no eran confiables. Conociendo el tipo y número de células presentes en las mucosas, los procedimientos de separación se han refinado a tal grado que actualmente es posible obtener rendimientos cercanos al 80% de las células totales, en comparación del 5-15% que se obtenían en el pasado.

Complementando los estudios inmunohistoquímicos, la técnica de HIS usando DNA clonado permite la cuantificación de células activadas productoras de mediadores de la respuesta inmune (interleucinas) y la de células blanco para ciertos Ags (virus, parásitos intracelulares), información valiosa para conocer el grado de infección y de reacción inmune de las mucosas. La exquisita especificidad que se logra al hibridar cadenas complementarias de ácido nucleico permite medir la presencia de genes en las células y, sobre todo, la producción de RNAm de proteínas de interés. Estos estudios se complementan con el uso de MAb contra los productos proteicos para determinar el grado de traducción de tales mensajeros.

Un aspecto que se está estudiando ampliamente en la respuesta inmune es su dicotomía en respuestas de tipo celular, mediadas por linfocitos Th1 y respuestas de tipo Abs, mediadas por linfocitos Th2. Una forma de abordar dicho estudio es determinando la frecuencia y localización de células que producen diferentes perfiles de citocinas, sabiendo que las células Th1 producen principalmente IL-2 e IFN-gama, mientras que las Th2 elaboran IL-4 e IL-6. Con MAb contra estas interleucinas es posible cuantificar las células tipo Th1 y Th2 en un tejido usando IHQ y AIC. También se puede determinar el número de estas células usando sondas de cDNA contra dichas interleucinas y hacer la misma cuantificación por HIS. Ambas aproximaciones se están empleando en nuestro laboratorio en el estudio de la respuesta inmune intestinal a la fase entérica del parásito *Trichinella spiralis* en el cerdo.

Evaluación de la respuesta inmune local *in vitro*

El estudio funcional de la respuesta inmune mucosal ha tomado más tiempo en desarrollarse, principalmente debido a las limitaciones tecnológicas de hasta hace unos pocos años. Un escollo particularmente importante fue la obtención de poblaciones celulares representativas del tejido mucosal. Al conocerse con exactitud su estructura y el número de células albergadas en el tejido, por medio de IHQ y AIC, se pudieron desarrollar métodos eficientes para la separación de células que incluyen tratamientos con agentes quelantes y enzimas proteolíticas.

Para cumplir con el segundo objetivo de la investigación del sistema inmune local, existen una gran cantidad de herramientas técnicas. Las más usadas actualmente en el CINVESTAV son la citofluorometría de flujo (FACS), el cultivo de células obtenidas de la mucosa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayos inmunoenzimáticos como ELISA en mancha y la electrofisiología.

Una vez obtenidas las poblaciones celulares de los diferentes compartimentos mucosales (epitelio y lámina propia), se analizan por FACS, para conocer su fenotipo y proporción, así como para detectar cambios en esos parámetros entre animales normales y parasitados y se cultivan *in vitro* con técnicas convencionales. El cultivo se realiza con Ags de interés y se espera la activación de células reactivas comparándose dicha reactividad entre los animales normales y los infectados. De esta manera se evalúa la respuesta inmune local a Ags de *Trichinella spiralis* y de *Entamoeba histolytica* en distintos modelos animales. Estos estudios se complementan con la medición de productos de la respuesta inmune mucosal, como Abs de diferentes isotipos en secreciones (contenido intestinal, heces, bilis) durante las diferentes etapas de la infección o inmunización empleando técnicas como ELISA e inmunoelectrotransferencia (Western blot).

Otra forma de abordar estos estudios es mediante la detección de los productos del cultivo por técnicas más sensibles como la PCR. Tal es el caso de la detección de RNAm para IL-2 e IL-4 a partir de los cultivos de células de animales parasitados con *Trichinella spiralis*. Esta herramienta técnica nos permite conocer lo que ocurre después de que las células extraídas de la mucosa intestinal se

ponen en contacto con Ags del parásito. Con esta propuesta se pretende saber si existe alguna predominancia en las respuestas inmunes de tipo Th1 o Th2 durante la parasitosis y si este tipo de respuestas son exclusivas de algún tejido en especial.

También es posible medir dichos productos mediante la técnica de ELISA en mancha o ELISPOT, la que tiene amplias ventajas en economía y rapidez. En estos ensayos se trata de fijar en un soporte de nitrocelulosa un MAb contra IL-2 o IL-4 o, alternativamente, en la medición de anticuerpos específicos se fija el Ag del parásito, para posteriormente colocar una suspensión de células (por ejemplo extraídas de la lámina propia intestinal) e incubarlas durante un período corto. Los productos secretados por tales células se fijan al soporte sólido y luego de eliminar las células se hacen evidentes con un conjugado adecuado. De esta manera se ha medido la respuesta isotipo específica contra *Entamoeba histolytica* después de intentar diversos protocolos de vacunación.¹⁶

Finalmente, la medición de la reactividad tisular a ciertos Ags se ha medido *in vitro* por electrofisiología. Así se ha determinado el efecto de ciertos Ags y toxinas sobre segmentos de epitelio intestinal obtenidos de animales inmunizados y sin inmunizar. Tanto el efecto fisiológico, medido por los cambios en el transporte iónico del epitelio, como la confirmación histológica del efecto causado en dichos segmentos han dado información importante sobre los mecanismos de invasión de *Entamoeba histolytica* y el posible papel que juega la inmunidad local.¹⁷

Conclusión

El estudio de la inmunología de las mucosas se ha ampliado enormemente en los últimos quince años siendo una de las áreas más activas de la inmunología. Su trascendencia estriba en la posibilidad de manipular las respuestas locales para generar protección contra los patógenos más comunes que utilizan las mucosas como blanco o como vía de entrada. Además, el esclarecimiento de su fisiología permitiría modular las respuestas indeseables de hipersensibilidad y autoinmunidad que también se generan en las mucosas. En la parasitología, se tienen avances incipientes pero

firmer, y en nuestro país se hacen esfuerzos significativos en el entendimiento de la respuesta inmune con miras al desarrollo futuro de inmunógenos efectivos.

Referencias

1. Sack DA, Freij L, Holmgren J. Prospects for public health benefits in developing countries from new vaccines against enteric infections. *J Infect Dis.* 1991;163:503-506.
2. Brandtzaeg P, Krajci P, Lamm ME, Kaetzel CS. Epithelial and hepatobiliary transport of polymeric immunoglobulins. En *Handbook of mucosal immunology*, editado por PL Ogra *et al.*, Academic Press, Inc. San Diego, CA, EU. 1994. pp. 113-126.
3. Hanson LA, Ashraf R, Carlsson B, Stranstedgard IL, Porras O, de Soto M, Zaman S, Ahlstedt S. The immunologist and the developing world. *Scan J Immunol.* 1990;31:127-131.
4. Besredka A. De la vaccination contre les états typhoïdes par la voie buccale. *Ann Inst Pasteur* 1919;33:882-9039.
5. Choridker WB, Tomasi TB Jr. Gamma-globulins: Quantitative relationships in human serum and non vascular fluids. *Science* 1963;142:1080-1081.
6. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccines development. *Vaccine* 1992;10(2):75-88.
7. Kato T, Owen RL. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. En *Handbook of mucosal immunology*, editado por PL Ogra *et al.*, Academic Press, Inc. San Diego, CA, EU. 1994. pp.11-26.
8. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: Two separate but related systems of immune defense? *Ann Int Med.* 1987;106:892-899.
9. Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett2 K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989;97:1562-1584.
10. Lefrancois L. (1994). Basic aspects of intraepithelial lymphocyte immunobiology. En *Handbook of mucosal immunology*, editado por P.L. Ogra *et al.*, Academic Press, Inc. San Diego, CA, EU. 1994;pp.287-297.
11. Bell RG, Liu WM. *Trichinella spiralis*: quantitative relationships between intestinal worm burden, worm rejection and the measurement of intestinal immunity in inbred mice. *Exp Parasitol.* 1988;66(1): 44-56.
12. Bell RG, Isekeutz T. Expression of a protective intestinal immune response can be inhibited at three distinct sites by treatment with anti-alpha 4 integrin. *J Immunol.* 1993;151(9):4790-4802.
13. Vega-López MA, Telemo E, Bailey M, Stevens K, Stokes CR. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organised compartmentalisation in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993;37:49-60.

14. Vega López MA. Sistema Inmune Intestinal Porcino. *Ciencia Veterinaria* Vol. 6, R. Moreno Chan (Editor), Mexico, D. F., UNAM, 1994; pp 145-172.
15. Vega-López MA, Bailey M, Telemo E, Stokes CR. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig's small intestine. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995;44:319-327.
16. Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles MC, Enríquez-Rincón F. *Entamoeba histolytica*: Induction and isotype analysis of antibody-producing cell responses in Peyer's patches and spleen after local and systemic immunization in male and female mice. *Exptl Parasitol*. 1995;80:541-549.
17. Navarros-García F, Chávez-Dueñas L, Tsutsumi V, Posadas del Río S, López-Revilla R. E. *histolytica*: increase of enterotoxigenicity and of 53- and 75- kDa cysteine proteinase in a clone of high virulence. *Exptl Parasitol*. 1995;80:361-372.

XI. Nueva herramientas en el diagnóstico y en la identificación de parásitos del género *Trichinella*

Lilian Yépez-Mulia*

Trichinella spiralis es un nemátodo parásito causante de la triquinosis, enfermedad que tiene amplia distribución en todo el mundo, constituyendo un problema de salud tanto médico como veterinario. La fuente principal de transmisión de la enfermedad es la carne de cerdo infectada con la larva muscular de este parásito, aunque existen casos de triquinosis relacionados con el consumo de carne de oso, caballo y animales silvestres. En particular en México, se han reportado diversos brotes de triquinosis en diferentes localidades de la República Mexicana.^{1, 2, 3} Recientemente, se documentó un brote de triquinosis en ciudad Delicias, Chihuahua, que involucró a 166 personas y se originó por consumo de chorizo mal cocido.³

La detección de cerdos infectados con *Trichinella spiralis* constituye un aspecto importante en el desarrollo de medidas de control y erradicación de esta parasitosis. A este respecto, el diagnóstico de la triquinosis porcina se realiza en los rastros mediante triquinoscopia. Este método se basa en la detección directa del parásito en músculo, sin embargo, el tamaño tan pequeño de la muestra que se analiza, restringe la detección del parásito en el músculo de animales aun con cargas parasitarias altas y por tanto animales con cargas parasitarias bajas pueden pasar inadvertidos.

Una alternativa a la detección directa del parásito, son los métodos serológicos. Por medio de los cuales se determina la presencia en el suero u otros fluidos corporales de anticuerpos específicos contra el parásito. El ELISA es uno de los métodos más ampliamente usados que permiten el diagnóstico de triquinosis porcina de manera sensible. Sin embargo en este tipo de ensayos, la utilización de extracto total de la larva muscular de *Trichinella spiralis* aumenta la inespecificidad del ensayo, ya que existen reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos.⁴

Por otro lado, diversos estudios han demostrado en ELISA el valor diagnóstico tanto de los antígenos de superficie como de los productos de excreción/secreción de la larva muscular de *Trichinella spiralis*, los cuales confieren una detección sensible y específica de cerdos infectados con *Trichinella spiralis* en condiciones experimentales y naturales, ofreciendo perspectivas reales en el diagnóstico de triquinosis porcina.^{5, 6} (Figura 1).

La evaluación de estas moléculas en poblaciones abiertas requiere de su producción en grandes cantidades, que sea rápida y de bajo costo. En este contexto, la obtención de los componentes de superficie y de excreción/secreción de *Trichinella spiralis*, se puede realizar mediante métodos bioquí-

* UIMEIP-Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Lilian Yépez Mulia, UIMEIP-Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, 06725, México, D. F.

micos e inmunoquímicos, sin embargo, el rendimiento de éstos puede ser un obstáculo para su obtención constante y en cantidades suficientes para su uso a gran escala. Una alternativa a estos métodos consiste en la aplicación de herramientas moleculares para la obtención de péptidos recombinantes mediante la donación y expresión de genes que codifican para antígenos con potencial diagnóstico.

nocida por sueros de cerdos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo se vió reducida debido a la presencia de anticuerpos dirigidos contra beta galactosidasa en los sueros de animales no infectados.⁷

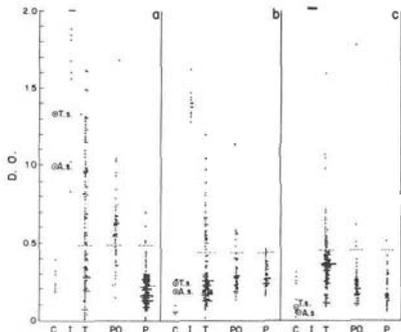


Figura 1. Valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos con sueros de cerdos a través de tres tipos de ELISA empleando tres diferentes preparaciones antigénicas de la larva muscular de *Trichinella spiralis*: a) extractos totales solubles b) antígenos de superficie purificados con el anticuerpo monoclonal NIM-M1 c) antígenos de excreción/secreción. Como controles se utilizaron sueros de cerdos no infectados (C) y sueros de cerdos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis* (I), *Ascaris suum* (A. s.) o *Trichuris suis* (T. s.). Los cerdos de trasplante provinieron de Toluca, Edo. de México (T), Paso de Ovejas, Veracruz (PO) y Paracho, Michoacán (P). Tomado de Ariaga y cols.⁶

En este contexto, en nuestro laboratorio se preparó un banco de expresión de la larva muscular de *Trichinella spiralis* en el vector lambda gt11. A partir de este banco se seleccionaron cuatro clones recombinantes (Ts-1, Ts-2, Ts-3 y Ts-4), las cuales expresan proteínas híbridas con pesos moleculares entre 118 y 121 kDa. Asimismo, se determinó mediante el empleo de anticuerpos seleccionados con las proteínas de fusión producidas por las clonas seleccionadas, que éstas comparten determinantes antigénicos con los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis* (Figura 2). Las proteínas de fusión se purificaron y se probaron en ELISA, demostrándose que el péptido recombinante producido por la clona TS-3 era reco-

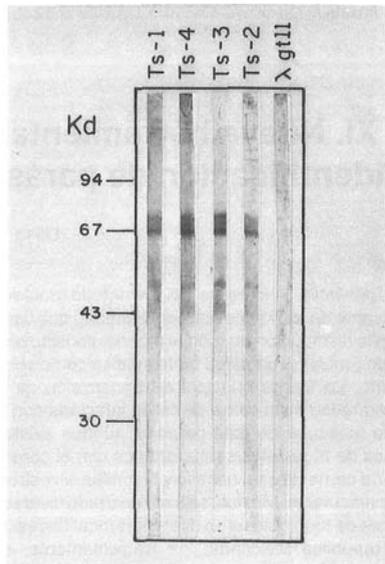


Figura 2. Determinación de las proteínas nativas de *Trichinella spiralis*, que comparten determinantes antigénicos con los péptidos recombinantes expresados por las clonas TS-1, TS-2, TS-3 y TS-4. Los extractos totales de la larva muscular de parásito se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida a 10% en presencia de SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (NC). Posteriormente las tiras de NC se incubaron con los anticuerpos seleccionados con las clonas recombinantes. Como control se utilizaron anticuerpos específicos contra beta galactosidasa (C) y pesomoléculas de las proteínas empleadas como marcadores se indican a la izquierda de la figura.

Posteriormente, con la finalidad de expresar y purificar eficientemente el péptido recombinante de *Trichinella spiralis*, además de obtenerlo fusionado a otra molécula que no interfiriera con la especificidad y sensibilidad del ensayo, se procedió a subclonar el inserto de cDNA de la clona TS-3 en el vector pGEX-3X. Este vector expresa el péptido de interés fusionado a la enzima glutatión-S-transferasa, la cual permite la purificación del

peptido de fusión mediante cromatografía de afinidad empleando al sustrato de la enzima. Así, el péptido recombinante se purificó y se probó en ELISA empleando sueros de cerdos infectados naturalmente experimentalmente con el parásito. Como controles se incluyeron sueros de cerdos infectados experimentalmente con *Ascaris suum*, *Trichinella suis* o *Cysticercus cellulosae*. El ensayo desarrollado tuvo una sensibilidad del 81% y una especificidad del 100%, sugiriéndose el uso potencial de este péptido recombinante en el diagnóstico de triquinosis porcina⁸ (Figura 3).

Por otro lado, el diagnóstico de la presencia de *Trichinella spiralis*, se puede realizar mediante la detección del material genético del parásito empleando sondas de ácidos nucleicos.

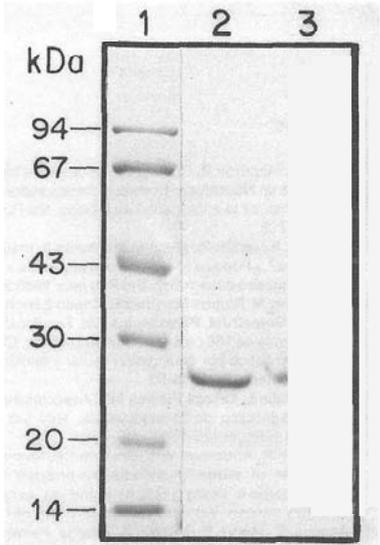


Figura 3. Análisis electroforético del péptido recombinante purificado de la clona TS-3. La purificación de la proteína de fusión expresada en el vector pGEX-3X se llevó a cabo mediante una columna de sefarosa 4B acoplada a un gel de fusión y se analizó en geles de acrilamida al 10% en presencia de SDS (carril 3). Como control se usó la GST de la clona parental purificada siguiendo el mismo método (carril 2). El peso molecular de las proteínas empleadas como marcadores (carril 1) se indican a la izquierda de la figura.

Así, Dupouy-Camet y cols.⁹ demostraron la presencia de *Trichinella spiralis* en ratones infectados experimentalmente mediante el empleo de oligonucleótidos complementarios a la secuencia repetida de 1.7 Kb de *Trichinella spiralis*, en un ensayo de PCR. El uso de esta sonda permitió la detección específica de la infección con *Trichinella spiralis* y no las que ocurren con otras especies de *Trichinella* como *Trichinella nativa*. En consecuencia, el empleo de esta sonda podría ser de utilidad en el diagnóstico de triquinosis porcina (Figura 4).

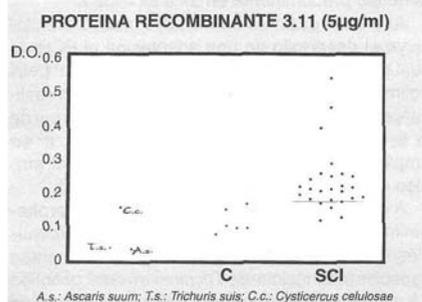


Figura 4. Evaluación por ELISA de péptido recombinante de la clona TS-3 su clonación en el vector pGEX-3X en el diagnóstico de triquinosis porcina. Muestras de sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito (SCI) se diluyeron 1:100 y la proteína de fusión se empleó a una concentración de 5 µg/ml. Como controles se incluyeron sueros de cerdos no infectados con *Trichinella spiralis* (C) y sueros de cerdos infectados experimentalmente con *Ascaris suum* (A s), *Trichinella suis* (T s) y *Cysticercus cellulosae* (C c). La línea punteada indica el valor de corte para las muestras positivas.

Recientemente, Dick y cols.¹⁰ prepararon oligonucleótidos complementarios a secuencias presentes en la clona pPRA (la cual contiene el fragmento de 1.6 Kb) con la finalidad de identificar mediante PCR aislados de *Trichinella spiralis* provenientes de muestras de músculo de cerdos infectados con la larva muscular del parásito. Mediante el uso de esta sonda fue posible detectar desde una larva en el tejido muscular de cerdos, además no se detectó amplificación de esta secuencia en aislados provenientes de animales silvestres, siendo entonces específica para aislados porcinos.

Por otro lado, la utilización de sondas ha permitido determinar el tipo de *Trichinella* predominante en animales silvestres de diferentes localidades. De esta forma, Zarlanga y cols.¹¹ seleccionaron a partir de un banco genómico de un aislado de *Trichinella* T5 proveniente de un oso negro, una clona que contiene un inserto de 482 bp. Al emplearse esta secuencia como sonda en ensayos de hibridación con aislados de *Trichinella spiralis* no hubo reactividad cruzada. Además, al estudiarse la prevalencia de *Trichinella* T5 en animales silvestres en Indiana, EU, se evidenció que éste es el genotipo predominante en esta localidad.

Avances recientes en técnicas moleculares incluye el desarrollo de una adaptación al PCR, la cual se conoce como amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD). Esta técnica es fácil de realizarse y no se requiere tener información acerca de la secuencia a amplificarse, sino que al azar se amplifican diversas secuencias mediante el empleo de oligonucleótidos sintéticos de 10 pb.

A este respecto, Dupouy-Camety cols.¹² probaron mediante un análisis de RAPD-PCR, 9 oligonucleótidos con la finalidad de identificarlas diferentes especies reconocidas de *Trichinella* más el genotipo T5 y otros dos aislados los cuales no habían sido identificados. Con uno de los oligos se obtuvieron patrones de bandas característicos de cada especie, observándose que T5 era muy semejante a *Trichinella* nativa y a *Trichinella* britovi. Los aislados no identificados, mediante este análisis se clasificaron como *Trichinella* britovi, lo cual fue confirmado posteriormente por un análisis isoenzimático (Figura 5).

Con base en lo anteriormente expuesto, es evidente que la aplicación de herramientas moleculares al estudio de *Trichinella* permite mediante el empleo de péptidos recombinantes y de sondas de DNA, el diagnóstico sensible y específico de la triquinosis porcina tanto en rastros como en el campo, contribuyendo al conocimiento de la prevalencia de la triquinosis porcina en México. Asimismo, el empleo de sondas en estudios epidemiológicos de *Trichinella spiralis*, resulta útil para seguir la transmisión del parásito entre los cerdos domésticos y animales silvestres, los cuales son reservorios importantes de triquinosis e implementare entonces medidas adecuadas para el control de esta parasitosis.

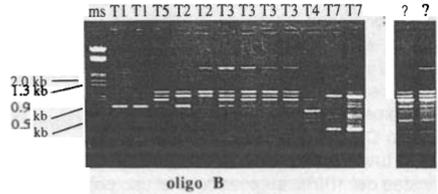


Figura 5. Productos de amplificación del DNA obtenidos de diferentes especies y aislados de *Trichinella* empleando la técnica de amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD). El DNA de aislados de *Trichinella spiralis* (T1), T5 (T5), *Trichinella* nativa (T2), *Trichinella* britovi (T3), *Trichinella pseudospiralis* (T4) and *Trichinella nelsoni* (T7), así como de dos aislados no identificados se amplificó mediante RAPD empleando el oligonucleótido B (TGTCGCGGC), los productos obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1.4%. Tomado de Dupouy-Camety y cols.¹²

Referencias

- Martínez Maraño R. Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. *Sal Pub Méd* 1983;25:712.
- Martínez Maraño R. ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría ser eso una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo?. *Sal Pub Méd* 1985;27:40.
- Hernández M, Ramos Martínez E, Casco Sánchez EJ, Morales Gómez JM, Pérez Matos EM. Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias. Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. *Gac Méd Méx* 1992;128(1):45-50.
- Yépez Mulia L, Ortega Pierres MG. Aspectos actuales sobre diagnóstico de la triquinosis. *Rev Lat Amer Microbiol* 1994;36:127-138.
- Gambie EIR, Anderson WR, Graham CE, Murrell KD. Diagnosis of swine trichinosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet Parasitol* 1983;13:349-361.
- Arriaga C, Muñoz E, Morilla A, Ortega Pierres MG. *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Exp Parasitol* 1989;69:363-372.
- Yépez Mulia L, Montañez CS, Ortega Pierres MG. Surface antigens from *Trichinella spiralis*. muscle larva expressed by *Escherichia coli*. En: *Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis*. Tanner CE, Martínez Fernández AR, Bolas Fernández F (Eds.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España, 1989, pp 47-52.

8. Yépez Mulia L, Arizmendi N, Ortega Pierres MG. Production of *Trichinella spiralis* recombinant peptide useful in diagnosis of swine trichinellosis. **Abstracts**: Proceedings of the 8Th International Conference on Trichinellosis. Campbell WC, Pozio E, Bruschi F (Eds.) Istituto Superiore di Sanita Press, Rome, Italy, 1994, pp395-400.
9. Dupouy Camet J, Soulé C, **Guillow JP**, Rouer E, **Lavareda de Souza S**, **Ancelle T**, Benarous R. Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitol Res* 1991;77:180-182.
10. Dick TA, Lu M, de Vos T, Ma K. The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of *Trichinella*. *J Parasitol* 1992;78(1): 145-148
11. Zarlenga DS, Al Yaman F, Minchella DJ, La Rosa G. A repetitive DNA probe specific for a North American sylvatic genotype of *Trichinella*. *Mol Biochem Parasitol* 1991;48: 131-138.
12. Dupouy **Camet J**, Kobert F, **Guillow JI**, **Vallet C**, Perret C, Soulé C. Identification of *Trichinella* isolates with random amplified polymorphic DNA markers. *Parasitol Res* 1994;80: 358-360.