

Evaluación de las histonas de *Leishmania mexicana* como antígenos para el diagnóstico serológico de la Leishmaniasis en equinos

Arianna Ramos
Universidad Internacional SEK
Facultad de Ciencias Ambientales
2016

Summary

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan parasite of the family Trypanosomatidae, genus *Leishmania*. These parasites are spread by bites of sand flies from genus, *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. These biological vectors are endemic from tropical and subtropical areas. Dogs infected with *Leishmania infantum* generate antibodies anti-histone that only recognized histones from parasite. In addition, any study in Ecuador has been made about immune response from equines infected with parasite *Leishmania*. This study evaluated, if the histones H3 and H4 are recognizing by sera from equines infected with *Leishmania*, using western blot. For that, we analyzed eighteen sera from equines taken in the province of Napo Ecuador. Eleven equines were infected with *Leishmania amazonensis* as has been demonstrated by PCR and observation direct to the microscopy. Ten sera from infected equines immuno recognized histone H3 (90.9%), and seven sera immuno recognized H4 (64%). Whereby, we proposed the use of histones from *Leishmania* for serological diagnosis in equine could be useful. However, sera from equines which were apparently healthy, immune recognized histone H3.

Keywords: leishmaniasis, equine, histone

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis es una enfermedad producida por la infección del parásito protozoario perteneciente a la familia Trypanosomatidae dentro del cual encontramos al género *Leishmania* (The Center for Food Security Public Health, 2010). Es una enfermedad endémica en 98 países, se estima que a nivel mundial más de 12 millones de personas están infectadas con *Leishmania* y 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2014). La *Leishmania* es endémica en zonas tropicales y subtropicales, además es transmitida por moscas de arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (The Center for Food Security Public Health, 2010).

El parásito *Leishmania* tiene un ciclo de vida dimórfico, es decir entre huéspedes vertebrados y flebótomos, sin embargo el ser humano y los animales domésticos llegan a hacer huéspedes

accidentales de este parásito (The Center for Food Security Public Health, 2010). Esta enfermedad produce diferentes formas clínicas que son leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, cada una se diferencia la especie de *Leishmania* que infecte al huésped (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En los últimos años se han reportado infecciones de equinos en el viejo mundo como en el nuevo mundo, en el continente Americano los países que han informado de infecciones en equinos son Venezuela, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos, sin embargo no se conoce con exactitud si estos animales son huéspedes reservorios del parásito o son huéspedes accidentales del parásito (Truppel, et al., 2014; Vedovello Filho, Jorge, C. Lonardon, Teodoro, & V. Silveira, 2008).

Debido a que la infección con leishmaniasis en equinos no es muy conocida, y a que estos muchas veces no presentan signos clínicos de tener haber contraído la enfermedad, se han realizado diferentes estudios en zonas endémicas de *Leishmania*, es así que en Brasil, se tomó muestras de sangre de equinos que habitan en zonas endémicas de *L. braziliensis*, muestras fueron analizadas por PCR y ELISAS, los animales no presentaban lesiones cutáneas o signos de haber contraído la enfermedad, sin embargo los resultados mostraron que los equinos estaban infectados con *L. braziliensis*, ya que se detectaron anticuerpos anti-*Leishmania* a demás se encontró ADN del parásito (Truppel , et al., 2014).

Actualmente las técnicas utilizadas para la detección de la enfermedad son: la microscopia, inmunofluorescencia, ELISA, sin embargo en esta última se debe tener en cuenta la calidad de antígenos que se va utilizar, puede existir reacción cruzada con otras enfermedad como chagas, que se encuentra al igual que *leishmania* dentro de la familia Trypanosomatidae(González García, 2003). También se puede utilizar PCR para conocer que especie de *Leishmania* está involucrada en la infección.

Es así que en los últimos años, se ha investigado acerca de antígenos de *Leishmania* que sean altamente específicos, de esta forma se ha encontrado que, las histonas nucleosomales del parásito *Leishmania* son antígenos inmunodominantes, que al ser expuestos al sistema inmunitario del huésped vertebrado durante los procesos de infección natural y experimental, producen anticuerpos anti-histonas que reconocen específicamente a histonas del parásito , pues se ha encontrado estos anticuerpos en sueros de perros , ratones y humanos (Nieto & col., 1999; Requena, Alonso, & Soto, 2000) .

Manuel Soto y colaboradores fueron los primeros en estudiar la inmunogenicidad de las histonas nucleosomales de *L. infantum* (Soto, et al., 1996; Soto, et al., 1998).

En este sentido, nos preguntamos, si las histonas de *Leishmania mexicana* serán inmunogénicas en la infección de equinos, y si estas podrán ser empeladas para el diagnóstico de la infección en equinos, por ende el presente estudio se plantea evaluar por primera vez, si las histonas de *Leishmania mexicana* son reconocidas por sueros de equinos infectados con *Leishmania amazonensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

Las muestras de equinos fueron tomadas por los investigadores del Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central Del Ecuador, en el límite de la provincia del Napo, entre las parroquias Gonzalo Díaz de Pineda, Santa Rosa de Quijos y Sardinas.

La provincia del Napo, está ubicada en la amazonia Ecuatoriana, tiene una variación altitudinal está entre los 400 y 5700 msnm, la provincia se extiende desde las zonas tropicales bajas de la amazonia, zonas templadas de bosques nublados hasta las zonas alto-andinas de páramo, el clima varía entre templado y permanentemente húmedo (Gobierno Autónomo Descentralizado Provincia de Napo, 2015).

Análisis de los Sueros de equinos

Los sueros de los equinos fueron sometidos a técnicas parasitológicas y moleculares, se encontró que la especie infectante fue *Leishmania amazonensis*, la cual fue identificada mediante el secuenciamiento de productos de amplificación de la región del espaciador ribosomal interno-1 (ITS-1). Once sueros de

equinos fueron diagnosticados como positivos para *Leishmania amazonensis* (comunicación personal Graciela Uzcanga).

Cultivo del Parásito

Promastigotes de *L. mexicana* MHOM / BZ / 82 / BEL21 se cultivaron en medio Schneider suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10%.

Aislamiento de Histonas de *Leishmania mexicana*

Promastigotes de *Leishmania spp.* en fase semi-logarítmica fueron sedimentados, lavados con PBSG frío y congelados. Posteriormente fueron lisados en buffer hipotónico [10 mM TRIS-HCL (pH 8), 1 mM KCL, 1,5 mM Mg CL₂, 1 mM de DTT] suplementado con inhibidores de proteasas. Los núcleos liberados fueron sedimentados por centrifugación 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C, resuspendidos en 0.4 N H₂SO₄ e incubados en toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 16.000 x g por 10 minutos para eliminar el debris celular. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a tubos limpios y las histonas fueron precipitadas mediante la adición de 8 volúmenes acetona fría y la incubación a -20 °C por 3 horas. El precipitado fue centrifugado a 16000 x g por 10 minutos y fue lavado dos veces con acetona. Por último, el sedimento fue secado a temperatura ambiente y re suspendido en buffer 50 mM Tris-HCL, pH 6,8 con inhibidores de proteasas. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Qubit obteniéndose una concentración de 115 µg/ml.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis se realizó en base al método descrito por Laemmli (1970). Se realizó el gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) el buffer de

corrida utilizado fue (25mM Tris NaCl, 192 mM Glicina, 0,1 % SDS, pH 8.5).

Para determinar el peso molecular de las histonas nucleosomales de interés H3 y H4 en el gel de poliacrilamida, nos sustentamos en la comunicación personal de la Dra. Graciela Uzcanga (2015) que comprobó mediante el uso de anticuerpos comerciales anti-histonas que las histonas de *Leishmania mexicana* tienen un peso molecular de 15 Kda y 14kda como se muestra en la figura 1.

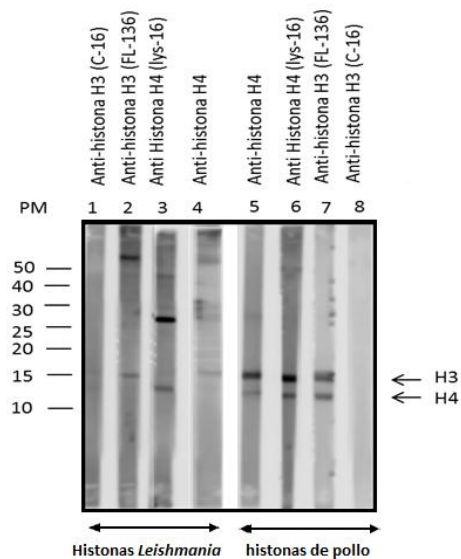


Figura 1. Western blot Histonas de *Leishmania mexicana*
Fuente: comunicación personal GracielaUzcanga (2015)

Las transferencias fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas.

Para la inmunodetección, se preparó Tris buffer fosfato salino TBST (20mM Tris 150mM NaCl pH 8,3 0,1% tween 20) se utilizó 30ml de TBST más 5% leche descremada para la solución bloqueante.

Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario para lo cual se realizó la dilución de los sueros de equinos 1:100, se dejó incubar durante 1 hora en movimiento a temperatura ambiente. Para la solución conjugante se utilizó la proteína A-peroxidasa, se diluyo 5µl de conjugado en 30

ml de (TBST). Se colocó 1ml de conjugado en cada frasco, se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.

RESULTADOS

WESTERN BLOT

En el presente trabajo se analizó 11 sueros positivos infectados con *Leishmania* y 7 sueros negativos, el reconocimiento de los sueros positivos para la histona H3 fue de 91% (10/11), mientras que para la histona H4 fue de 63,63% (7/11), también se encontró que todos los sueros negativos reconocieron la histona H3. En la figura 2 se puede observar los resultados.

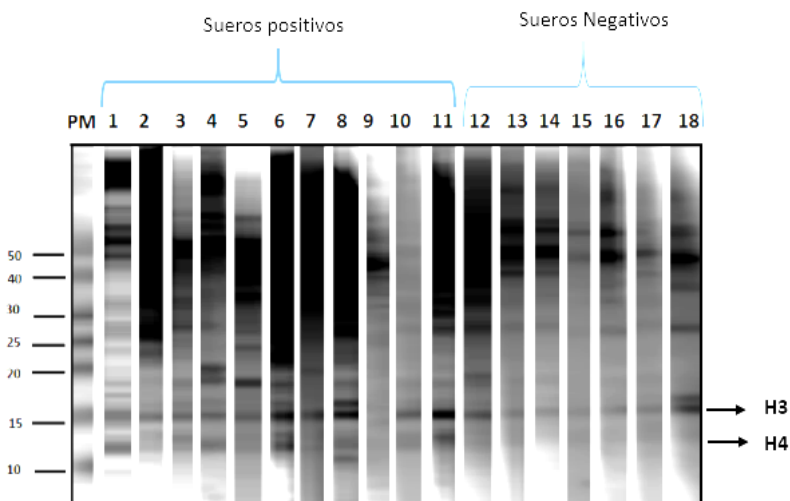


Figura 2. Western blot de sueros de equinos, tirillas de 1-11 sueros positivos, 12-18 sueros negativos

Fuente: (Ramos, 2016)

DISCUSIÓN

En los caballos, es muy difícil detectar la enfermedad a simple vista debido a que muchos no presentan signos clínicos de estar infectados (The Center for Food Security Public Health, 2010), sin embargo cuando se encuentran lesiones cutáneas en el animal se puede utilizar métodos parasitológicos para su diagnóstico (Morales B, et al., 2010).

No obstante para un mejor diagnóstico, se puede utilizar métodos indirectos como; ELISA, PCR entre otros (Alvar, 2001), actualmente la elevada presencia de anticuerpos anti- histonas en sueros de perros y humanos (Soto, et al., 1996; Soto, et al., 1998) generados durante la infección con *Leishmania*, indican que las histonas nucleosomales tiene una alto potencial para el desarrollo de diagnósticos serológicos de *leishmania*.

De acuerdo con Soto (1998) la frecuencia de reconocimiento de anticuerpos anti-histonas en sueros de perros infectados con *Leishmania infantum* son las siguientes: H2A (72%), Histona H3 (68%) Histona H2B, (60%) Histona H4 (44%).

Así también en nuestro estudio se logró determinar que, los sueros de equinos infectados con *leishmania amazonensis*, reconocen las histonas H3 y H4, pero también se encontró que los sueros negativos reconocen la histona H3.

De acuerdo con las investigaciones realizadas por Soto (1996) (1998), Ramírez (2009) los anticuerpos anti-histonas de *Leishmania*, generados durante la infección, son capaces de reconocer específicamente histonas del parásito, sin embargo existe otro parásito que se encuentra dentro de la familia Trypanosomatidae, enfermedad conocida como chagas producida *Trypanosoma cruzi*, debido a que las histonas son proteínas muy conservadas evolutivamente se cree que puede existir una reacción cruzada con las histonas de parásitos de la familia Trypanosomatidae, sin embargo esto no ha sido comprobado.

Por lo tanto se cree que en nuestro trabajo puede existir una reacción cruzada con las histonas de parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatide, también se plantea otra hipótesis para el reconocimiento de la histona H3

por parte de los 7 sueros de equinos negativos. De acuerdo la investigación realizada por Fernández y colaboradores (2005) señalan que los equinos infectados con *Leishmania* son capaces de generar respuesta celular y humoral, generando así la producción de anticuerpos.

CONCLUSIONES

- Los promastigotes de *Leishmania mexicana* pueden ser cultivados *in vitro* en medio Schneider suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10%.
- El método de extracción ácida es apto para el aislamiento de las histonas de *Leishmania mexicana*.
- Los equinos infectados con *Leishmania amazonensis* generan anticuerpos anti histonas de *Leishmania*.
- Las histonas de *Leishmania* pueden ser utilizadas para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis en equinos.

AGRADECIMIENTO

Al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador, por haber donado el cultivo de *Leishmania mexicana* MHOM / BZ / 82 / BEL21 y los sueros de equinos.

BIBLIOGRAFÍA

Alvar, J. (2001). *Las leishmaniasis: De la Biología al control*. Madrid.

Carneiro, M., Santos, D., Fukutani, K., Clarencio, J., Miranda, J. C., Broskyn, C., . . . de Oliveira, C. (2012). Vaccination with *L. infantum* changai Nucleosomal Histones Confers Protection against New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*.

Carrión, J., Folguera, C., & Alonso, C. (2008). Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: The results of immunogenicity and multicomponent properties of Histone DNA vaccine. *ELSEVIER*.

Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., & Lluís, F. (2005).

Inmune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Elsevier*.

Galanti, N., Galindo, M., Espinoza, I., & Toro, G. C. (1998). Histone Genes in Trypanosomatids. *Elsevier*.

Galanti, N., Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I., & Toro, G. C. (1998). Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today*, 64-70.

Gobierno Autónomo Descentralizado Provincia de Napo. (2015). *Plan de Desarrollo Provincial y de ordenamiento territorial*.

González García, A. C. (2003). Tesis. *Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a leishmaniasis*.

Iborra, S., Soto, M., Carrión, J., Alonso, C., & Requena, J. M. (2004). Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Elsevier*.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosomal core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*.

Morales B, A. A., García, F., Rossini, M., Comerma S, S., Chacón, T., Herrera, L., & Gómez, M. S. (2010). Lesiones Cutáneas Parasitarias en el asno equus asinus de Choroni, Estado Aragua, Venezuela. *Neotropical Helminthology*, 4(2), 179-182.

Organización Mundial de la Salud. (2010). *Control de las leishmaniasis*. Ginebra.

Organización Panamericana de la Salud. (2014). pequeñas picaduras grandes amenazas. *Organización Panamericana de la Salud*. Obtenido de www.paho.org/leishmaniasis

Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Gomez, L. C., Guzman, F., Patarrayo, M. E., & Alonso, C. (1996). Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Blackwell Science*.

Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Perez, M. J., Nieto, C. G., Guzman, F., & Patarroyo, M. E. (1998). Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Blackwell Science*, 342-349.

The Center for Food Security Public Health. (2010). Leishmaniasis (cutánea y visceral). 1-9.

Truppel, H. J., Otomura, F., Teodor, U., Massafera, R., Viera Costa-Ribeiro, M. C., Motter Catarino, C., .

. . Thomas-Soccol, V. (2014). Can Equids Be a Reservoir of *Leishmania braziliensis* in Endemic Areas ? *PLOS ONE*.

Vedovello Filho, D., Jorge, F. A., C. Lonardoni, M. V., Teodoro, U., & V. Silveira, T. G. (2008). American

Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the North -Central Mesoregion of Paraná State , Brazil. *Zoonoses Public Health*, 149-155.