

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Parasitología



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS
PROMASTIGOTES DE “LEISHMANIA
INFARTUM” CON EL SUERO NO INMUNE DE
RATÓN.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Carmen Aizpurúa Sánchez

Bajo la dirección del doctor

Alfredo Toraño García

Madrid, 2010

• ISBN: 978-84-693-4099-8

© María del Carmen Aizpurúa Sánchez, 2009

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Parasitología



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS
PROMASTIGOTES DE *Leishmania infantum*
CON EL SUERO NO INMUNE DE RATÓN**

Tesis Doctoral Presentada Por:

Dña. María del Carmen Aizpurua Sánchez

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Madrid, 2009

D. ALFREDO TORAÑO GARCÍA, Jefe del Servicio de Inmunología del Centro Nacional de Microbiología, Inst^º de Salud Carlos III,

CERTIFICA:

Que Dña. María del Carmen Aizpurua Sánchez, ha realizado bajo mi dirección en el Servicio de Inmunología del Centro Nacional de Microbiología del Inst^º de Salud Carlos III, el siguiente trabajo de investigación titulado: “Estudio de la interacción de los promastigotes de *Leishmania infantum* con el suero no inmune de ratón”. Considero que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid a 7 de octubre de 2009

ALFREDO TORAÑO GARCÍA

Este trabajo ha sido financiado gracias a las siguientes instituciones:



Programa de Formación de Personal Investigador (FPI).
Instº de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y
Consumo



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

“Desarrollo de un modelo de infección *ex vivo* en sangre de perro y ratón por *Leishmania infantum*”. PGC, PM99-0012

Agradecimientos

Han pasado más de 10 años desde que llegué al Inst^o de Salud Carlos III con la ilusión de comenzar, algo tarde es verdad, mi Tesis doctoral. Con tantos años encima son muchos los agradecimientos....

Quiero agradecer al Dr. Alfredo Toraño su generosidad al admitirme en el laboratorio del Servicio de Inmunología del CNM. Nunca podré olvidar su continuo e insistente empeño en que aprendiera a pensar en ciencia. Su enseñanza en la preparación de protocolos para plasmar hipótesis e ideas definidas o de última hora, siempre se realizó a pie de pista: trabajando en el animalario, en las cabinas de cultivo, en el microscopio, en la cámara fría con las columnas de afinidad o interpretando datos en los contadores gamma. También quiero agradecerle su enseñanza en la crítica científica, en la obligada generosidad del investigador, en su paciencia para corregir esta Tesis y por supuesto, en su amistad.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Mercedes Domínguez su colaboración “infinita” en la realización de este trabajo. Sus pioneros estudios en el estudio de la infección natural por *Leishmania*, en el modelo humano, son la base de este trabajo y muchos de los protocolos que he utilizado fueron desarrollados por ella. También quiero darle las gracias por su continuo apoyo y amistad a lo largo de estos años.

Todo mi cariño y mi agradecimiento para mi compañera, Inmaculada Moreno. Siempre me ha ayudado en este trabajo aportando ideas, con su buena cabeza. No olvido que en algunos momentos fue ella la que me ayudaba muchos días a terminar protocolos y leer resultados. Y gracias por diseñar y prestarme después tu protocolo de cinéticas de lisis a tiempo real en el citómetro. ¿Qué habría hecho sin él?

También quiero agradecer al Inst^o de Salud Carlos III la concesión de la beca que me permitió formarme y desarrollar esta Tesis doctoral. Especialmente al Dr. José Luis Gutiérrez y al Dr. Carlos Domingo por su confianza en mí. Así mismo agradezco al Dr. Lucas Domínguez su apoyo para la finalización de este trabajo y su amistad, y al Dr. Francisco Bolás, por su gran ayuda y generosidad como tutor en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la U. C. M.

Mi agradecimiento especial para Manuela Díaz por su continua ayuda en el laboratorio, especialmente en el desarrollo de los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio y su enseñanza en el manejo de cultivos celulares.

Agradezco a todos mis compañeros del Servicio de Inmunología su amistad a lo largo de todos estos años: Marta Reina, Dario Cabañas y Sergio González, por su continua amistad. Y especialmente a Sergio por su gran ayuda en la edición de la Tesis.

Quiero agradecer a la Dra. M^a Luisa Gaspar su generosidad por la donación de los ratones deficientes en anticuerpos y numerosos reactivos que se han utilizado en este trabajo. Así mismo mi agradecimiento para Lucinio Millán que tanto me ha ayudado en el animalario.

Los últimos cinco años también han sido mis compañeros en la Unidad de Defensa Biológica del departamento NBQ del ITM los que me han animado a continuar con mi Tesis, gracias especialmente a Patricia de León, Maite Camacho, Susana Aguilar y Begoña Fernández. Y por último agradecer a toda mi familia, especialmente a mi marido Gabriel y a mis hijos, Gabriel, Paloma, Carmen y Beatriz, su paciencia con este trabajo que les ha quitado a ellos muchas horas de mi compañía.

A mis queridísimas hermanas Lilí y Marisol

A mí querido padre

"In Memoriam"

“El mundo es un lugar peligroso. No por aquellos que hacen mal, sino por aquellos que miran y no hacen nada”

ALBERT EINSTEIN

Abreviaturas

a.e.	Actividad específica
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcN	Anticuerpos naturales
AcP	Anticuerpos policlonales
BSA	Seroalbúmina bovina
CAIgGR	Anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulina G de ratón
CARIgG	Suero policlonal de conejo anti IgG de ratón
CRP	Proteína C reactiva
Cy-5	Cianina-5
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etiléntrico bis (β -amino etil eter) N'N'N'N'tetraacético
ELISA	Enzimoimmunoensayo
F	Fracción funcional
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal	Galactosa
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>horse rabish peroxidase</i>)
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina de clase G
IgG1	Subclase de IgG
IgG2a	Subclase de IgG
IgG2b	Subclase de IgG
IgG3	Subclase de IgG
IgM	Inmunoglobulina de clase M
Ka	Constante de asociación
Kd	Constante de disociación
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
MBL	<i>Mannan binding lectin</i>
Mr	Peso molecular relativo

NM	No marcado
P	Properdina
PBS	Tampón 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCL y 137 mM NaCl.
PBS-T	PBS- Tween 0,05%
PE	Ficoeritrina.
RlgG	Inmunoglobulina G de ratón.
SBF	Suero bovino fetal
SBF	Suero bovino fetal
SNC	Suero normal de conejo
SNCF	Suero normal de cobaya
SNH	Suero normal humano
SNHm	Suero normal de hámster
SNP	Suero normal de perro
SNR	Suero normal de ratón
SNRa	Suero normal de rata
SR	Suero de ratón
SR μ .KO	Suero de ratones C57BL/6. μ KO
SR μ .KO/AdsC1q	Suero de ratón μ .KO y adsorbido de C1q
SR μ .KO/AdsMBL	Suero de ratones C57BL/6 adsorbido de MBL
SRAds	Suero de ratón adsorbido de anticuerpos naturales anti- <i>Leishmania</i>
SRRAG 2 ^{-/-}	Suero de ratones C57BL/6. RAG 2 ^{-/-}
TL	Tampón de lavado PBS- 10% SBF-0,01% ázida sódica
U.I.	Unidades internacionales
Vmax	Grado de fijación máxima
YP	Yoduro de propidio

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. infantum*

Figura 2. Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína C1q obtenida a partir de SNR

Figura 3. Análisis de la reactividad del AcM SIM 161 frente a la cadena β (≈ 70 kDa) de la proteína C3 del complemento de ratón

Figura 4. Reactividad del AcM SIM 187 frente a C1q de ratón en ensayo de Western-blot

Figura 5. Curso de la deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum* en presencia de SNR y de SNR tratado con EGTA-Mg

Figura 6 (A-B). Cuantificación del número de moléculas de C3 que se unen por promastigote de *L. infantum* tras opsonización con SNR

Figura 7. Cinética de fijación de los componentes C1q , C4 y C3 del complemento del ratón a promastigotes de *L. infantum*

Figura 8. Efecto de la leupeptina sobre la deposición de C3 en los promastigotes de *L. infantum*

Figura 9. Efecto del tratamiento del SNR con leupeptina en la cinética de deposición de C1q en promastigotes de *L. infantum*

Figura 10. Título de AcN IgG e IgM frente a *L. infantum* en el SNR

Figura 11. Cinética de unión de AcN IgM e IgG del SNR a promastigotes de *L. infantum*

Figura 12. Anticuerpos IgM e IgG en el suero normal de ratones de distintas edades

Figura 13. Opsonización de promastigotes de *L. infantum* por AcN del suero de ratones desde el periodo neonatal a la edad adulta

Figura 14. Deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SNR procedente de ratones CD1COB adultos o neonatos

Figura 15 A-B. Efecto de la adsorción del SNR con promastigotes de *L. infantum* sobre la fijación de AcN IgM e IgG y la deposición de C3 en los parásitos

Figura 16. Cinéticas de fijación de C3 a promastigotes de *L. infantum* opsonizados con suero normal de ratón y sueros de ratones carentes de anticuerpos

Figura 17. Eliminación de la lectina MBL del SNR y del SR μ .KO tras la adsorción con Sepharosa-mananos

Figura 18. Deposición de C3 en promastigotes opsonizados con SR μ .KO o SR μ .KO/AdsMBL

Figura 19. Fijación de C1q a promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SNR o con SR μ .KO

Figura 20. Fijación de C1q a promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SR μ .KO, SR μ .KO/AdsC1q, y C1q aislado

Figura 21. Deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum* opsonizados con suero carente de anticuerpos, suero carente de anticuerpos y C1q, y suero carente de anticuerpos y C1q, y suplementado con C1q

Figura 22. Aumento de la deposición de C1q en la superficie de los promastigotes en presencia de AcN anti-*Leishmania*

Figura 23. Estudio de la actividad citolítica del SNR y del SNH sobre promastigotes de *L. infantum*

Figura 24. Análisis de la actividad lítica del SNR y del SNH frente a promastigotes de distintas especies de *Leishmania*

Figura 25. Cinética de incorporación de YP en promastigotes de las fases logarítmica y estacionaria, incubados con sueros de distintos géneros de mamíferos

Figura 26-A-B. Cinéticas de incorporación de YP en promastigotes procedentes de un cultivo axénico en fase logarítmica (A) y fase estacionaria (B), incubados con el complemento del suero normal de distintas especies de mamíferos

Figura 27. Cinética de deposición de C3b y C5b en la superficie de promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SNR

Tablas

Tabla 1. Valores L_{50} (minutos) de incorporación de YP en promastigotes de *L. infantum* de las fases logarítmica y estacionaria, opsonizados con sueros de individuos de distintos órdenes de mamíferos

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Agente etiológico de la leishmaniosis	2
I.2 Patología de la leishmaniosis	3
I.3 Características del vector	5
I.4 Mecanismo natural de la transmisión de la leishmaniosis	7
I.5 Mecanismos de resistencia del hospedador en la leishmaniosis	8
I.5.1 Sistema inmune adaptativo	8
I.5.2 Sistema inmune innato	10
I.5.2.a Anticuerpos naturales	11
I.5.2.b Colectinas	12
I.5.2.c Pentraxinas	13
I.5.2.d Sistema del complemento	14
II. OBJETIVOS.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
III.2 Reactivos y Materiales.....	23
III.1.1 Reactivos químicos y biológicos	23
III.1.2 Parásitos	24
III.1.3 Animales	25
III.1.4 Líneas celulares.....	26
III.2 Reactivos inmunoquímicos	26
III.2.1 Marcaje radiactivo de los anticuerpos con el isótopo [¹²⁵ I]Na	27
III.2.2 Marcaje de anticuerpos con fluorocromos	27
III.2.3 Obtención de los sueros normales (no inmunes) utilizados en el estudio.....	27
III.2.4 Aislamiento de inmunoglobulinas de ratón de las clases G y M	28
III.2.5 Preparación de suero de ratón adsorbido con promastigotes de <i>L. infantum</i>	28

III.2.6 Obtención de suero de ratón deficiente en C1q y de C1q purificado	29
III.2.7 Anticuerpos monoclonales de rata anti-C3 de ratón	30
II.2.8 Anticuerpos monoclonales de rata anti-C1q de ratón	34
III.2.9 Crecimiento y purificación de los anticuerpos monoclonales.....	35
III.2.10 Obtención de suero de ratón carente de MBL.....	35
III.3 Determinación de la fijación de proteínas del complemento en la superficie del promastigote.....	36
III.3.1 Análisis cuantitativo del C3 depositado en los promastigotes.....	37
III.3.1.a Cálculo de la fracción funcional de la preparación del AcM SIM161.....	37
III.3.1.b Cálculo del número de moléculas de C3 que se unen por célula de promastigote.....	38
III. 4 Interacción de los anticuerpos naturales con los promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>. 40	
III.4.1 Determinación del título e isotipo de los anticuerpos naturales	40
III.4.2 Análisis de la cinética de fijación de IgM e IgG.....	40
III.5 Ontogenia de los AcN de ratón frente a <i>Leishmania infantum</i>.....	40
III.6 Análisis cinético en tiempo real de la lisis de promastigotes de <i>Leishmania infantum</i> por los sueros de individuos de distintos órdenes de mamíferos	41
IV. RESULTADOS	43
IV.1 Activación del sistema del complemento de ratón.....	44
IV.1.1 Cinética de opsonización de los promastigotes por C3.....	44
IV.1.2 Determinación del número de moléculas de C3 depositadas por activación de la vía clásica del complemento	45
IV.1.3 Cinética de unión de C1q y C4.....	47
IV.2 Anticuerpos naturales de ratón frente a <i>Leishmania infantum</i>.....	50
IV.2.1 Determinación del título e isotipo de los anticuerpos naturales.....	50
IV.2.2 Cinética de fijación de los AcN a promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	50
IV.3 Ontogenia del mecanismo de opsonización de los promastigotes de <i>Leishmania infantum</i> por anticuerpos naturales.....	51

IV.4 Función de los anticuerpos naturales anti-<i>Leishmania</i> en la activación de la vía clásica del complemento	54
IV.4.1 Activación de la vía clásica del complemento de ratón en promastigotes opsonizados con suero de ratones neonatos.....	54
IV.4.2 Activación de la vía clásica del complemento por promastigotes opsonizados con suero carente de anticuerpos IgM e IgG	55
IV.5 Función de la lectina MBL en la activación de la vía rápida del complemento de ratón por promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>.....	57
IV.6 Función de la subunidad C1q del componente C1, en la activación de la vía clásica del complemento de ratón por promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>.....	59
IV.7 Análisis de la actividad litica del suero normal de ratón en los promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>.....	61
IV.7 Análisis de la actividad litica del suero normal de ratón en los promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>.....	62
IV.7.1 Cinética de incorporación de yoduro de propidio en tiempo real a promastigotes opsonizados por suero normal de ratón y suero normal humano.....	62
IV.7.2 Estudio comparado de la capacidad litica de sueros de distintos taxones de mamíferos frente a promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	65
IV.7.3 Análisis de la deposición del componente C5b en promastigotes opsonizados con suero no inmune de ratón	69
V. DISCUSIÓN	71
VI. CONCLUSIONES	79
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	81

I. Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria de carácter zoonótico causada por protozoos pertenecientes al género *Leishmania*. El vector del parásito es la hembra de un díptero de la subfamilia *Phlebotominae* que transmite el protozoo al hospedador durante la ingesta de sangre. Se registran casos de leishmaniosis en unos 88 países pertenecientes a los más variados ecosistemas; se calcula que 350 millones de individuos viven en habitats de riesgo, y que alrededor de 15 millones se encuentran afectados por la enfermedad. La incidencia de la leishmaniosis es de unos dos millones de casos anuales, de los cuales millón y medio manifiestan dolencias cutáneas y el resto viscerales. La cifra anual de defunciones se estima en 70.000¹. Por su carácter crónico y alto índice incapacitante, la leishmaniosis es la quinta enfermedad infecciosa en días de trabajo perdidos. Junto con la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis humana africana, conforma un trío de grandes enfermedades parasitarias olvidadas que devastan las sociedades de los países en desarrollo¹⁻³.

I.1 Agente etiológico de la leishmaniosis

Es un protozoo dimórfico perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*, cuyas especies poseen entre 35 y 36 cromosomas. *Leishmania infantum*, causante de la leishmaniosis en la Cuenca Mediterránea y Suroeste de Europa, almacena en sus 36 cromosomas un genoma haploide de ~ 32,1 Mb que codifica 8.195 genes, de los cuales más del 99% están localizados en posiciones cromosómicas equivalentes (“sintenia”) en los miembros del género⁴. Los protozoos del género *Leishmania* se reproducen asexualmente por división binaria⁵. Su ciclo biológico es heteroxénico, e incluye el paso desde un vector invertebrado a un hospedador mamífero y viceversa. A lo largo del proceso el parásito adopta dos morfologías claramente diferenciadas: la forma promastigote, extracelular y flagelada, que vive en el lumen del tracto digestivo del vector, y la forma amastigote, intracelular y sésil, que reside como huésped obligatorio en los fagocitos mononucleares del hospedador vertebrado.

El promastigote aparece al microscopio óptico como una célula fusiforme de 15 a 20 micrómetros de longitud y de 1,5 a 2,5 micrómetros de ancho. Muestra un núcleo central, y en el polo apical presenta una estructura cóncavo-discoidal formada por moléculas de ADN mitocondrial denominada cinetoplasto; posee además diversos orgánulos de carácter secretor (retículo endoplásmico, aparato de Golgi) y metabólico (glicosoma, acidocalcisoma)⁶. La superficie del promastigote presenta diversos glicoconjugados (glicoproteínas, glicolípidos,

enzimas y proteofosfoglicanos) que juegan un papel importante en la interacción del parásito con el vector y con el hospedador vertebrado ⁷. El componente mayoritario es el lipofosfoglicano (LPG), glicolípido de estructura tetrapartita que forma el denso glicocaliz (~1-5 x10⁶ moléculas/célula) que rodea a la membrana plasmática del promastigote ⁸. El LPG de *Leishmania* muestra un notable polimorfismo en sus oligosacáridos posiblemente para regular el tropismo vector-parásito durante el desarrollo del promastigote en el mosquito ⁹. Otros proteofosfoglicanos, entre los que se incluyen el proteofosfoglicano de estructura filamentosa (fPPG) que secretan los promastigotes en la región torácica del tracto digestivo del flebotomo ¹⁰, la fosfatasa ácida¹¹, o glicoproteínas fuertemente antigénicas como la leishmanolisina (gp63) ¹², y los antígenos que constituyen el complejo PSA ¹³, contribuyen a la estructura del glicocaliz, y se cree potencian la infectividad del parásito.

La forma amastigote reside en los macrófagos del hospedador vertebrado. Es una célula ovoide de entre 10 y 30 micrómetros de longitud y 3 a 5 micrómetros de diámetro, dotada de un núcleo voluminoso y de cinetoplasto. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi son muy reducidos; posee, sin embargo, un aparato lisosómico abundante y grandes vacuolas denominadas megasomas. El flagelo está reducido a una pequeña fibrilla rodeada por la bolsa flagelar. El amastigote carece del glicocaliz del LPG. Sus principales componentes de superficie son familias de glicolípidos (10⁷ moléculas/célula) anclados a la membrana mediante un residuo de glicofosfatidilinositol (GPI), que sirven de anclaje a proteínas y polisacáridos, aunque se ha descrito también su participación en la biogénesis de estos componentes. ¹⁴.

I.2 Patología de la leishmaniosis

La leishmaniosis humana es una enfermedad de carácter espectral que incluye dolencias dérmicas localizadas y/o diseminadas, y procesos viscerales. Sus manifestaciones clínicas se clasifican en dos grandes grupos: formas viscerales que incluyen el kala-azar, la leishmaniosis infantil, y la leishmaniosis dérmica post-kala-azar, y formas tegumentarias, con sus variantes cutánea, cutánea diseminada y mucocutánea; no obstante, la leishmaniosis es una enfermedad dinámica, y tanto su clínica como su epidemiología pueden variar dependiendo del estado de salud del hospedador y del ámbito geográfico, factor éste que condiciona las especies de parásito y vector circulantes ¹⁵.

En analogía con los espectros tuberculoide y lepromatoso de la enfermedad de Hansen, las afectaciones dérmicas localizadas de la leishmaniosis se catalogan como tuberculoides y las

diseminadas como lepromatosas. En las afectaciones tuberculoideas, el hospedador conserva activa la inmunidad celular, y en las lepromatosas, la respuesta celular está deprimida y se produce un incremento de la actividad humoral.

En la leishmaniosis cutánea el ciclo del parásito puede ser zoonótico, si se transmite desde un reservorio animal al hombre, o antroponótico, cuando el parásito se transmite entre hospedadores humanos. La manifestación más característica de la forma zoonótica causada por *L. major* es la úlcera cutánea o “botón de oriente”, que suele curar espontáneamente en el transcurso de meses o pocos años. Tras la infección, el parásito induce en el hospedador un estado de inmunitario conocido como inmunidad concomitante que le hace resistente a la reinfección. La forma antroponótica, causada por *L. tropica*, se localiza en urbes populosas de Oriente Medio y Asia Central; su patología recidivante recuerda la lepra tuberculoidea, y se asocia con una potente respuesta inmune del paciente. El agente de la leishmaniosis cutánea diseminada del Viejo Mundo es *L. aethiopica*. Esta enfermedad cursa como un proceso crónico sin cura espontánea; el sistema inmunitario del hospedador se muestra anérgico y no responde a la prueba cutánea de la leishmanina. En las lesiones abundan los amastigotes, y la ulceración primaria de la piel tiende a extenderse a mucosas y cartílagos de las regiones nasal y oro-faríngea produciendo deformaciones faciales.

En el continente americano se da una forma zoonótica conocida como leishmaniosis cutánea americana (ACL), cuyo espectro clínico refleja el estado inmunológico del hospedador y el grado de virulencia de la especie infectante. Su patología es de carácter polar, uno de cuyos polos lo ocupa la leishmaniosis cutánea localizada (LCL), y el opuesto, la leishmaniosis cutánea difusa (DCL). Los pacientes de LCL presentan escasas lesiones nodulares y conservan la inmunidad celular frente al parásito; por el contrario, los afectados por DCL no muestran respuesta inmune celular frente al protozoo y desarrollan numerosas lesiones nodulares.

La DCL se asocia a la infección por *L. amazonensis*, y en menor medida, a otras especies del complejo *L. mexicana*. Formas intermedias de ACL son la leishmaniosis mucocutánea (MCL) y la leishmaniosis cutánea diseminada. La MCL se asocia a la infección por *L. braziliensis*^{1,16}. Es una dolencia crónica de carácter severo que en el 40% de los casos se origina a partir de lesiones cutáneas preexistentes que se extienden a mucosas y cartílagos faciales produciendo deformaciones y mutilaciones del rostro; en regiones de Centroamérica y Suramérica esta afección se conoce como “espundia”. En el Viejo Mundo, los casos de leishmaniosis mucocutánea suelen derivarse de anteriores infecciones por *L. donovani*, y en los enfermos inmunodeprimidos, por *L. infantum*.

La leishmaniosis visceral (“kala-azar”) es una enfermedad sistémica de carácter crónico que sin tratamiento suele ser mortal, aunque un pequeño porcentaje de casos experimenta curación espontánea. La enfermedad puede tener origen zoonótico o antroponótico dependiendo de la combinación vector/parásito infectante. En el Viejo Mundo, los agentes de la leishmaniosis visceral son *L. donovani* y *L. infantum*, y en el Nuevo Mundo, *L. chagasi* (similar a *L. infantum*). Un alto porcentaje de los pacientes tratados de leishmaniosis visceral por *L. donovani* desarrolla como secuela la leishmaniosis dérmica post-kala-azar, síndrome similar a la leishmaniosis cutánea diseminada y a la lepra lepromatosa. Se cree que estos pacientes son el reservorio humano del kala-azar hindú¹⁷.

En la Cuenca Mediterránea y el Suroeste de Europa la leishmaniosis es más frecuente en el perro que en el hombre. El agente de la leishmaniosis visceral y cutánea es *L. infantum*. En España la leishmaniosis es una enfermedad hipoendémica de notificación regional. Todas las Comunidades Autónomas presentan casos de leishmaniosis pero son las provincias mediterráneas y las de la Meseta Central las que presentan el mayor número de casos¹⁸. En individuos inmunodeprimidos drogadictos es frecuente detectar coinfecciones por *L. infantum* y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{19, 20, 17, 21} en estos casos, se ha descrito la ocurrencia de un ciclo antroponótico en el que los individuos infectados por vía endovenosa son reservorios potenciales del parásito, y las jeringas el vector de transmisión de las células parasitadas^{22, 23}.

La leishmaniosis canina es frecuente en el Suroeste de Europa, siendo el perro el principal reservorio de *L. infantum*²⁴. En un estudio realizado en la Comunidad Autónoma de Madrid, se observó que la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en los perros vagabundos alcanzaba el 7,8%. El 79,5% de los perros seropositivos no mostraban signos de leishmaniosis, resultado preocupante, ya que dicha población pudiera constituir el principal reservorio del parásito²⁵. En el Viejo Mundo, el lobo (*Canis lupus*) y el chacal (*Canis aureus*) aparecen igualmente parasitados, pero su baja densidad y lejanía del hábitat humano, disminuye su importancia como reservorios. Sólo el zorro (*Vulpes vulpes*), por su cambio hacia hábitos sinantrópicos, más cercanos a los vertederos que a la caza, pudiera jugar un papel de cierta importancia como reservorio¹⁸.

I.3 Características del vector

Los vectores que transmiten la leishmaniosis son insectos nematóceros pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. Los flebotomos son dípteros de pequeño

tamaño, alas lanceoladas y largas patas. Los machos son exclusivamente fitófagos y las hembras hematófagas; éstas últimas utilizan los nutrientes de la sangre para madurar los folículos ováricos (anautogenia) y realizar la ovoposición. El periodo de vida del adulto fluctúa entre 20 y 40 días. En el Viejo Mundo los vectores pertenecen al género *Phlebotomus*, y en América al género *Lutzomyia*. Se han descrito alrededor de 700 especies de flebotomos, de las cuales unas setenta son capaces de transmitir este protozoo²⁶. En la naturaleza existen barreras de compatibilidad vector-parásito y no todas las combinaciones son funcionales; solamente en las combinaciones naturales parece completarse el ciclo intravectorial que genera promastigotes infectantes²⁷.

En las zonas áridas y semiáridas del sur de Europa y del Norte de África *Phlebotomus perniciosus* es el vector principal de *L. infantum*. En zonas más húmedas de Portugal, España y Francia, el papel de vector lo desempeña *Phlebotomus ariasi*^{28,29}.

El desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en combinaciones naturales vector-parásito ha sido descrito detalladamente^{30, 31}. Recientemente, se han realizado estudios comparando el ciclo de desarrollo del parásito en el vector y en cultivos axénicos^{32,33}, en los que el desarrollo de *Leishmania* se describe como un proceso secuencial de diferenciación a lo largo del cual se alternan cuatro o cinco morfotipos de promastigote: procíclicos → nectomónadas → haptomónadas → leptomónadas → metacíclicos, unidos entre sí por una relación precursor → producto. El desarrollo del parásito comienza cuando la hembra del mosquito ingiere la sangre de un hospedador infectado y adquiere amastigotes libres o leucocitos parasitados. Tras la ingestión, en la región abdominal del intestino medio del flebotomo se forma la membrana peritrófica que engloba la sangre ingurgitada³⁴. En su interior, los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, y tras intensa multiplicación generan formas nectomónadas no proliferantes que consolidan la infección del tracto digestivo y la desplazan en sentido oral.

Alrededor de las 48-72 horas post-infección los promastigotes nectomónadas ocupan el lumen del intestino medio, y en su región anterior se observan formas leptomónadas que a las 96 horas constituyen el morfotipo mayoritario en tórax y cardias. También se observan pequeños promastigotes en división (formas haptomónadas) dotados de un largo flagelo por el que se unen a los microvilli del epitelio y a la íntima cuticular de la válvula estomodeal. Los promastigotes se fijan a las PpGalectinas del epitelio del vector a través de monosacáridos pertenecientes al LPG, a los proteoglicanos y a otras glicoproteínas, y a través de receptores como el de la heparina³⁵. Estas interacciones son cruciales para la supervivencia del parásito, ya que determinan la compatibilidad promastigote-flebotomo en el desarrollo intravectorial, y evitan su expulsión al excretar los desechos de la ingesta⁷. Alrededor de las 96 horas, los morfotipos mayoritarios

(leptomónadas y metacíclicos) de los promastigotes que colonizan la región torácica se encuentran embebidos en un gel filamentososo de proteoglicanos (fPPG) secretado por los parásitos.

Entre el cuarto y quinto día post-ingesta termina la excreción de los desechos, se completa el desarrollo de los huevos, y comienza la ovoposición. La válvula estomodeal se encuentra masivamente infectada por formas haptomónadas adheridas a la íntima de su cutícula. Los parásitos embebidos en el fPPG obstruyen el canal alimentario del mosquito y le inducen a regurgitar la ingesta, lo que facilita la transmisión del parásito. En las fases terminales de la diferenciación del promastigote, se hace presente en el esófago y la faringe un parásito de morfotipo pequeño, flagelo largo, que no se divide, y muy activo, denominado promastigote metacíclico. Su presencia en el aparato bucal del flebotomo coincide con el agotamiento de los nutrientes de la sangre, cuando el mosquito se apresta a realizar la nueva ingesta y reiniciar el ciclo gonotrófico.

Durante el desarrollo intravectorial de la forma amastigote a promastigote, el parásito experimenta profundos cambios morfológicos y estructurales que culminan en la aparición del morfotipo metacíclico. Se postula que dicho morfotipo está dotado de mayor capacidad infectante y preadaptado a sobrevivir en las condiciones hostiles del hospedador vertebrado. Se acepta, que en los cultivos axénicos los promastigotes de *Leishmania* recapitulan el proceso metaciclogénico que experimentan en el vector, y que durante la fase estacionaria del cultivo, se generan formas infectantes que semejan funcionalmente a los promastigotes metacíclicos. Dichas formas se utilizan habitualmente en los estudios de infección por *Leishmania*.

I.4 Mecanismo natural de la transmisión de la leishmaniosis

Durante la ingesta de sangre, el flebotomo infectado regurgita promastigotes en el hematoma dérmico del hospedador. En contacto con la sangre humana el promastigote fija anticuerpos naturales (AcN) anti-*Leishmania* y activa el sistema del complemento ³⁶⁻³⁸ depositándose fragmentos del componente C3 en la superficie del parásito. Sin solución de continuidad los promastigotes opsonizados se unen a los eritrocitos del hematoma en una reacción de inmunoadherencia ³⁹, reacción que en los mamíferos no primates se produce con las plaquetas ⁴⁰. Acto seguido, los promastigotes unidos a los eritrocitos se transfieren a los leucocitos del hematoma (principalmente granulocitos y monocitos) y son endocitados a través de un mecanismo en el que participan los receptores celulares para los componentes C3b (CR1; CD35)

e iC3b (CR3; CD11b/CD18) del complemento^{41,42}. En el interior del fagolisosoma macrófago el promastigote se transforma en amastigote e interfiere con los mecanismos de activación de la célula, lo que facilita que se implante la infección⁴³. La proliferación del parásito produce la muerte de la célula hospedadora, y los amastigotes liberados invaden los macrófagos del tejido circundante y se diseminan por vía hematológica colonizando órganos distales al lugar de la inoculación: médula ósea, hígado y bazo⁴⁴⁻⁴⁶

Durante la opsonización del promastigote se activa la cascada lítica del complemento, y en un tiempo no superior a 3 minutos el 90% del inóculo de promastigotes incorpora yoduro de propidio (YP) en su ADN, lo que señala la muerte celular⁴⁷. En el proceso de transmisión de la leishmaniosis el complemento humano ejerce una fuerte presión selectiva sobre el parásito al reducir el tamaño del inóculo infectante, hecho que favorece el control de la infección por el hospedador. De este modo, el complemento humano establece la primera barrera defensiva frente a *Leishmania*.

I.5 Mecanismos de resistencia del hospedador en la leishmaniosis

Los animales metazoos poseen dos sistemas inmunitarios de defensa de la integridad denominados innato y adaptativo. La función protectora del sistema inmune adaptativo se basa en la capacidad de los linfocitos T y B para reconocer el universo antigénico propio de la especie. Los linfocitos expresan un extenso repertorio de parátomos que alcanza $\sim 10^7$ - 10^9 especificidades, generado por recombinación somática a lo largo de la vida del individuo, los cuales se encuentran distribuidos clonalmente entre los receptores de los linfocitos T y B y los anticuerpos secretados por éstos últimos. Este gran potencial de reconocimiento y el desarrollo de memoria inmunológica capacitan al sistema inmune adaptativo para anticiparse a futuras infecciones. El sistema inmune adaptativo ha compartimentalizado las funciones efectoras: la respuesta humoral esta mediada por los linfocitos B y los anticuerpos, y la inmunidad celular por los linfocitos T.

I.5.1 Sistema inmune adaptativo

En la leishmaniosis, la respuesta humoral no desempeña un papel relevante en la eliminación del parásito; por el contrario, más bien parece contribuir a exacerbar la patología de la enfermedad. La respuesta inmune protectora frente a *Leishmania* es de carácter celular, y se

expresa principalmente a través de los linfocitos T y los macrófagos activados^{42, 48}. Los linfocitos T se subdividen funcional y antigénicamente (marcadores CD) en subpoblaciones T coadyuvantes (“T helper”), T citolíticas (CTL), y T reguladoras (“Tregs”) ^{49, 50}. El estímulo antigénico induce la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes en al menos dos subpoblaciones funcionales denominadas Th1 y Th2, cuyas respuestas se asocian con los perfiles de citoquinas que secretan. La subpoblación Th1 se activa en las respuestas frente a parásitos intracelulares y secreta IL-12, TNF α e IFN γ ; las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13, y participan en la respuesta humoral frente a agentes extracelulares y procesos alérgicos⁵¹. Igualmente, se ha descrito una subpoblación de células T CD4+ efectoras denominada Th17 por su capacidad para producir la interleucina IL-17A y otras citocinas de dicha familia como IL-17F. Las células Th17 parecen jugar un papel crucial en el desarrollo de procesos autoinmunes y en la defensa frente a bacterias extracelulares Gram-negativas y hongos⁵².

En el desarrollo conceptual del modelo de inmunidad celular Th1/Th2 frente a *Leishmania* fueron determinantes los experimentos realizados con ratones BALB/c infectados por *L. major*⁵³. En la mayoría de las cepas endógamas de ratón, la infección por *L. major* induce respuestas celulares tipo Th1 que eliminan el parásito. En la cepa BALB/c, sin embargo, la infección por *L. major* induce la expansión de una población de linfocitos CD4+ que a través de la secreción de IL-4 polariza la respuesta adaptativa al tipo Th2 y antagoniza el desarrollo de los linfocitos Th1. Los factores que inducen respuestas Th2 en ratones BALB/c infectados por *L. major* son, aparentemente, muy diversos, e incluyen la especie de *Leishmania* infectante, la constitución genética del hospedador (la resistencia a *Leishmania* esta bajo control multigénico)⁵⁴, el contexto de citoquinas en el que se activa el sistema inmunitario en la infección, el fenotipo de célula dendrítica presentadora de antígeno, etc.; un fallo en el mecanismo inductor de las células Th1 pudiera también, por defecto, favorecer la activación de la respuesta Th2^{54, 55}.

En los hospedadores inmunocompetentes, las infecciones causadas por especies de tropismo cutáneo suelen ser autolimitantes y de carácter crónico. En estos casos, el parásito activa un tipo de inmunidad denominado premunición o inmunidad concomitante, en el que las células Th1 controlan la multiplicación del parásito eliminando la mayoría de los parásitos pero sin llegar a erradicarlos; de este modo, el mecanismo preinmunitario contiene el foco infectante e induce un estado de inmunidad permanente frente a la reinfección⁵⁶.

Recientemente, se ha descrito una población de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ (T_{regs} naturales) que juegan un papel inmunorregulador en las infecciones de parásitos controlando la magnitud de la respuesta efectora Th1⁵⁷. En ratones BALB/c infectados con *L. major*, la respuesta efectora

Th1 elimina los parásitos pero genera daños inmunopatológicos en el hospedador. En este caso, las células T_{reg} $CD4^+$ $CD25^+$ bien por contacto directo o través de IL-10 limitan la intensidad de la respuesta efectora Th1⁵⁸. En la leishmaniosis murina, las células T_{reg} mantienen un cierto equilibrio entre el hospedador y el agente infectante, reduciendo el daño inmunopatológico causado por la respuesta celular a costa de tolerar la presencia del parásito en el organismo.

I.5.2 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato se caracteriza por ser de naturaleza no clonal y estar los receptores para los antígenos codificados por genes de la línea germinal, lo que reduce considerablemente su capacidad de reconocimiento⁵⁹. Pese a ello, el sistema inmune innato está capacitado para controlar adecuadamente los patógenos propios de la especie, como lo demuestra que en el 98,6 % de las especies animales sea el único mecanismo protector⁶⁰. El sistema inmune innato está constituido por células y componentes solubles plasmáticos. Las células son, principalmente, de estirpe mieloide: dendríticas, NK, fagocitos mononucleares, granulocitos y células de los epitelios y mucosas. Todas ellas expresan receptores extra e intracelulares denominados receptores PRR (“pathogen recognition receptors”) que reconocen estructuras antigénicas muy conservadas en el mundo microbiano denominadas PAMPs (“pathogen-associated microbial patterns”). Los PRR pertenecen a diversas familias e incluyen receptores celulares de superficie para mananos y β -glucano (receptores lectina tipo-C), y receptores tanto de superficie como citosólicos pertenecientes a las familias TLR (“Toll-like receptors”), NLR (“NOD-like receptors”), y RLR (“RIG-like receptors”) ⁶¹. Los componentes plasmáticos son en su mayoría de carácter opsónico: AcN, colectinas, pentraxinas, las proteínas de la cascada del complemento, el receptor soluble para el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, y una diversidad de citocinas y quimiocinas de naturaleza inflamatoria⁶².

En la infección humana por *Leishmania* los AcN y el complemento son la primera barrera de defensa frente al promastigote. El parásito une AcN y activa el complemento; la opsonización del parásito por fragmentos de C3 potencia la activación no clonal de los linfocitos B y rebaja el umbral de sensibilidad requerido para inducir la respuesta anamnésica⁶³. A su vez, la liberación de anafilatoxinas activa un proceso inflamatorio que atrae a células presentadoras de antígeno (dendríticas, macrófagos y linfocitos B) al lugar de la infección, promoviendo la fagocitosis del agente infectante y la presentación de los antígenos del parásito a los linfocitos T. En este proceso, los receptores TLR/PRR de las células presentadoras de antígeno reconocen a los PAMPs

del parásito y alertan al sistema inmunológico de su presencia y naturaleza a través del patrón de citoquinas que secretan; dichas citoquinas conforman el contexto en el que se produce la presentación antigénica y se induce la respuesta adaptativa Th1/ Th2.

En el modelo de leishmaniosis de ratón apenas existen estudios a cerca de las reacciones de los componentes plasmáticos del sistema inmune innato con el promastigote durante la infección. En lo que sigue, se describen sucintamente las principales reacciones de las opsoninas del suero de mamíferos con los promastigotes de *Leishmania*.

1.5.2.a Anticuerpos naturales

Los AcN son inmunoglobulinas presentes en el suero de la práctica totalidad de vertebrados en ausencia de estimulación antigénica intencionada^{64, 65}. Los AcN se caracterizan por que sus regiones variables no experimentan mutaciones somáticas al estar codificadas en la línea germinal. Funcionalmente destacan por su alta avidéz, baja afinidad y polirreactividad, si se comparan con los anticuerpos inducidos en una respuesta adaptativa. Se producen principalmente durante el desarrollo fetal y neonatal del individuo, actúan de primera línea de defensa neutralizando virus y bacterias en sangre y tejidos, y participan en el aclaramiento fisiológico de células senescentes y apoptóticas^{66, 67}.

En el ratón se ha estudiado en profundidad el origen celular de los AcN. En esta especie existen dos poblaciones de linfocitos B, denominadas B-1 y B-2, que se diferencian por su ontogenia y función. Las células B-1 participan en respuestas frente a antígenos T-independientes, abundan en el peritoneo y cavidades pleurales, y experimentan su ontogenia durante el periodo neonatal manteniéndose como población autorrenovable en la vida adulta⁶⁸. La población B-2, engloba los linfocitos B convencionales que recirculan en sangre y folículos linfoides y desencadenan respuestas humorales frente a antígenos T-dependientes. De acuerdo con la expresión del marcador antigénico CD5, las células B-1 se subdividen en B-1a (CD5⁺) y B-1b (CD5⁻)⁶⁸. La subpoblación B-1a constituye la principal fuente de AcN, produce el 50% de la IgM del suero^{65, 68}, y juega un papel activo en la inmunidad innata. Las células B-1b mantienen actividad progenitora en la médula ósea a lo largo de la vida, participando en respuestas humorales de tipo IgM e IgG3 frente a microorganismos⁶⁹.

El suero no inmune o normal de individuos de la práctica totalidad de taxones de mamíferos analizados posee AcN anti-*Leishmania*^{65, 66, 68, 70-72}, lo que sugiere la existencia de un mecanismo humoral innato que reconoce antígenos conservados de tripanosomátidos y protege

al individuo en las etapas iniciales de la infección. En el suero de humanos, monos superiores y monos catarrinos (Viejo Mundo), el ~1% de los AcN IgG reaccionan con el epítipo α Gal (Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1-4GlcNAc-R). Estos anticuerpos aparecen en la sangre durante el periodo neonatal, probablemente inducidos por la flora bacteriana normal al colonizar el intestino⁷³. AcN anti- α Gal del suero humano reaccionan con parásitos de *T. cruzi*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*, en los que reconocen el epítipo α Gal probablemente presente en el LPG u otra glicoproteína del promastigote⁷⁴. En suero normal humano, los AcN IgM anti-*Leishmania* constituyen entre el 15% y el 30% del total de anticuerpos IgM; estos anticuerpos se fijan con gran rapidez a los promastigotes y activan la vía clásica del complemento, disparando la opsonización y subsecuente lisis de los parásitos⁴⁷. En humanos, se han detectado igualmente anticuerpos de clase IgM e IgG que reaccionan con residuos 9-O-acetil sialoconjugados del promastigote que activan la vía clásica del complemento y causan la lisis del parásito^{66,75}.

En el suero fresco de conejos, cobayas y ratas se ha descrito la existencia de un factor que inmoviliza los promastigotes de *Leishmania* y modifica (redondea) su morfología, factor que, según los autores, parecía estar ausente, o en muy baja concentración, en los sueros de ratón y jerbo⁷². Por el contrario, en un estudio realizado con sueros de siete géneros de roedores se concluía que tanto el suero normal de ratón como el de jerbo eran capaces de aglutinar y lisar promastigotes de tres especies de *Leishmania*; no aportaban, sin embargo, datos específicos de la actividad de dichos sueros⁷¹. Un estudio posterior dirigido a analizar la capacidad del suero normal de individuos de ocho géneros de mamíferos para inhibir el crecimiento de promastigotes de *L. tropica* y *L. enriettii*, confirmó la ausencia de actividad anti-*Leishmania* en el suero normal de ratón⁷⁰. Como se ve, los datos existentes son contradictorios, y apuntan, a lo sumo, a que el suero normal de ratón posee una muy débil reactividad natural aglutinante frente a los promastigotes.

1.5.2.b Colectinas

Son proteínas que poseen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) característico para cuya función requieren la presencia de iones Ca^{++} (lectinas tipo C)⁷⁶. La molécula prototípica de la familia de colectinas es la lectina que une preferentemente residuos de manosa (“mannan binding lectin”, MBL), además de otros residuos sacarídicos como la N-acetilglucosamina y la fucosa. La unidad estructural de la proteína MBL es una cadena polipeptídica de M_r entre 28.000 y 32.000 (24.000 de proteína y un 5% de oligosacárido). La unión de tres de estas

cadena da lugar a trímeros que, a su vez, se asocian formando oligómeros de subunidades triméricas. Estas estructuras oligoméricas dotan a la MBL de entre 3 y 18 parátomos para interactuar con los sacáridos, lo que incrementa considerablemente su avidéz y capacidad opsonizantes. La proteína MBL oligomérica se asocia a tres serina proteasas denominadas MASP-1, 2 o 3, y a una proteína no enzimática, Map19⁷⁷. La proteasa MASP-1 tiene homología con el componente C2 de la vía clásica y con los factores B (fB) y D (fD) de la vía alternativa, y las MASP-2 y MASP-3 con las subunidades C1r y C1s del componente C1⁷⁸⁻⁸⁰. La MBL se sintetiza en los hepatocitos que la secretan a la sangre⁸¹, y en el ratón se ha detectado expresión extrahepática en el intestino delgado⁸². En humanos, existe una forma de MBL con una concentración media en el suero de ~70 µg/ml; el conejo, la rata, el mono Rhesus y el ratón poseen dos formas de MBL (MBL-A y MBL-C). En el suero del ratón, la concentración media de MBL-A es 7,5 µg/ml y de MBL-C 45 µg/ml⁸³. En respuesta a estímulos inflamatorios, la concentración sérica de MBL puede duplicarse, por lo que se la encuadra como proteína de fase aguda.

La MBL es, probablemente, el activador más antiguo del complemento, una reliquia de un primitivo mecanismo de vertebrados supuestamente dirigido a eliminar microbios, inmunocomplejos y células senescentes⁸⁴. La interacción de la MBL con su ligando (manosa) es de baja afinidad ($K_a \sim 10^5 M^{-1}$); sin embargo, la interacción con mananos de levadura alcanza una afinidad de $K_a \sim 10^{11} M^{-1}$, debida a la disposición espacial del patrón de ligandos que reconoce la lectina. La MBL actúa como opsonina en concierto con el sistema del complemento, activándolo por una vía independiente de anticuerpos. Ratones mutantes nulos para el gen de la MBL son susceptibles a la infección por *Staphylococcus aureus*⁸⁵; ratones nulos para C3 muestran una alta mortalidad frente a *S. aureus*, y ratones doblemente nulos para MBL y C3 (MBL x C3) son aún más susceptibles, sugiriendo que la MBL desempeña una función efectora paralela a la del complemento⁸⁶. En el presente, desconocemos la existencia de datos a cerca de la interacción de la MBL del suero del ratón con tripanosomátidos del género *Leishmania*. En el modelo humano se ha descrito la interacción de la proteína MBL del suero y del complejo MBL-MASP aislado con residuos de azúcares de la superficie de promastigotes de *L. amazonensis*, interacción que dispara la subsecuente activación del sistema del complemento⁸⁷.

1.5.2.c Pentraxinas

Constituyen una superfamilia de proteínas de estructura multimérica que por su tamaño se clasifican en pentraxinas cortas y largas. La proteína C reactiva (CRP) y el componente amiloide

P del suero (SAP) integran la clase de pentraxinas cortas. La CRP esta formada por cinco cadenas polipeptídicas no glicosiladas que se asocian no covalentemente en una estructura discoidal con simetría pentamérica. Al igual que el SAP, la proteína CRP se sintetiza en el hígado, y está presente en el plasma de individuos sanos en concentraciones traza (concentración media: 0,8 mg/L). En respuesta a señales inflamatorias como la IL-6, su síntesis aumenta considerablemente llegando a superar en menos de 48 horas los 300 mg/L, por lo que se la considera la proteína prototípica de fase aguda⁸⁸. La CRP se fija en reacción dependiente de Ca^{++} al disacárido fosforilado del LPG de *L. donovani*⁸⁹, y en promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se deposita en toda su superficie⁹⁰. Se ha propuesto, que la unión de CRP al LPG del promastigote transmite una señal que induce su transformación en amastigote⁹¹.

1.5.2.d Sistema del complemento

El complemento constituye el principal mecanismo efector del sistema inmune innato. Su origen data de aproximadamente 700 millones de años, cuando en el genoma de deuterostomos primitivos (equinodermos y tunicados) hacen su aparición genes ortólogos a los de los componentes C3 y factor B⁹². Esta compuesto por unas 30 proteínas solubles presentes en el plasma, y en la superficie de células de la sangre y de otros tejidos. Muchos de sus componentes son zimógenos, proteasas que se activan por digestión en forma de cascada proteolítica mediante un proceso amplificador que genera respuestas efectoras con gran rapidez y de gran intensidad. Semejante mecanismo precisa un estrecho control, por lo que un 25% de sus componentes desempeñan funciones reguladoras^{93 94}. La principal y más antigua actividad del complemento es la opsonización, que consigue depositar fragmentos de los componentes C3 y C4 en las superficies antigénicas. Otras de sus funciones son el desarrollo de respuestas inflamatorias liberadoras de potentes anafilatoxinas (C3a y C5a), la destrucción de células y microorganismos por activación de la cascada citolítica (C5b-C9), y la solubilización y eliminación de inmunocomplejos opsonizados por fragmentos de C3 y C4. Además, el complemento desempeña un papel primordial en la inducción y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa⁹⁵.

El sistema del complemento se activa por tres mecanismos o vías denominados vía clásica, vía alternativa, y vía de la lectina. Recientemente, se ha descrito que la properdina pudiera constituir una nueva vía de activación del complemento⁹⁶. Aunque estos mecanismos se describen como vías independientes, su activación ocurre simultáneamente confluyendo en la deposición del componente C3 sobre la superficie antigénica. La vía clásica se activa al unirse la

proteína C1q del componente C1 a las inmunoglobulinas de los inmunocomplejos. La vía alternativa, por su parte, no requiere la participación de anticuerpos para activarse. Una pequeñísima fracción de moléculas de C3 se activa constantemente en el plasma por hidrólisis ("C3 tick-over") generando moléculas de C3(H₂O) metaestables; estas moléculas se unen al fB formando el complejo C3(H₂O)B que, digerido por el factor D, da lugar a la C3 convertasa de la vía alternativa: C3(H₂O)BbC3(H₂O). Esta enzima cataliza la formación de nuevos fragmentos de C3b que al depositarse sobre superficies activadoras las opsonizan. La activación de la vía de la lectina es, igualmente, independiente de anticuerpos y se dispara al unirse la MBL a sacáridos neutros, principalmente manosa y N-acetil-glicosamina.

Activación de la vía clásica del complemento

El principal mecanismo que activa la vía clásica es la formación de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo. El grado de activación depende de la clase de anticuerpo presente en el inmunocomplejo. Para los anticuerpos humanos la capacidad activante se ordena según IgM > IgG3 = IgG1 > IgG2; la subclase IgG4 carece de actividad. En el ratón, los isotipos IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ activan C1 eficazmente; sin embargo, la subclase mayoritaria IgG₁, homóloga a la IgG₄ humana, es un débil activador⁹⁷⁻⁹⁹.

La unión del componente C1 al inmunocomplejo dispara la vía clásica. Este componente posee dos entidades estructural y funcionalmente diferenciadas: la subunidad C1q por la que se une al inmunocomplejo, y las subunidades C1r y C1s que forman un zimógeno tetramérico (C1r₂-C1s₂) con actividad serina proteasa¹⁰⁰. El C1q está compuesto por 18 cadenas polipeptídicas que se asocian en trímeros formando una estructura hexamérica con seis cabezas globulares en la región C-terminal y seis tallos N-terminales de naturaleza colagénica que se ensamblan por puentes disulfuro. Los trímeros tienen M_r de 29.000 (A), 26.000 (B) y 19.000 (C). El proenzima C1r₂-C1s₂ se fija a los tallos de la molécula, y las cabezas globulares son el nexo de unión al anticuerpo del inmunocomplejo. La conformación pentamérica del C1 requiere la presencia de iones Ca²⁺ para que interaccionen los subcomponentes C1r y C1s.

El mecanismo de opsonización de los promastigotes de *Leishmania* por el complemento es un tema de investigación controvertido. En el caso del suero humano hay trabajos que apoyan que los promastigotes activan el complemento por la vía clásica^{45, 101}, mientras que otros, más abundantes, sugieren que dicha activación ocurre con independencia de anticuerpos^{37, 38, 89, 94, 102-}

Por otra parte, estudios realizados en condiciones próximas a las fisiológicas con promastigotes de tres géneros de tripanosomátidos: *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas characias* y *Leishmania* (cuatro especies de *Leishmania*: *L. major*, *L. amazonensis*, *L. donovani* y *L. infantum*), sostienen que los parásitos activan el complemento de modo simultáneo por ambas vías: la clásica y la alternativa, aunque el proceso se dispara por la vía clásica mediado por AcN anti-*Leishmania* ⁴⁷.

Algunos estudios indican que el C1q del suero humano se une directamente a antígenos bacterianos y activa la vía clásica sin participación de anticuerpos; ejemplos de este mecanismo son la unión del C1q al lípido A del LPS de las formas rugosas de *Salmonella minnesota* ¹⁰⁷, y a proteínas de la membrana externa (OMP) de bacterias Gram-negativas de los géneros *Klebsiella* ¹⁰⁸, *Legionella* ¹⁰⁹, *Mycoplasma* ¹¹⁰ y *Escherichia coli* ¹¹¹. En el ratón, los AcN IgM anti-*Streptococcus pneumoniae* activan la vía clásica, la cual desempeña un papel fundamental en la respuesta innata frente a esta bacteria ¹¹²; sin embargo, otros estudios sugieren que tanto los AcN como la CRP juegan un papel secundario en la respuesta innata, y que el principal mecanismo protector frente a *S. pneumoniae* es el complemento ^{113, 114}. Con respecto al modelo de ratón se sabe que los promastigotes de *Leishmania* activan el complemento del suero normal ⁷²; sin embargo, se desconoce cual es el mecanismo de activación y los factores que participan en el mismo. Resolver estos interrogantes ha sido uno de los objetivos de esta Tesis.

La unión del C1q bien al inmunocomplejo o directamente a la superficie antigénica dispara la autoactivación del zimógeno C1r-C1s, y determina la digestión del componente C4 por el C1s. La molécula del C4 es heterotrimérica, y en su cadena α posee un grupo metaestable tioléster. La proteólisis por C1s genera dos fragmentos denominados C4a (M_r 8.758) y C4b (M_r 193.000). El C4a se libera al medio, y tiene propiedades anafilatóxicas. Tras la digestión, el componente C4b se une a través del enlace tioléster al antígeno opsonizándolo, y de éste modo, el C4b participa en la reacción de inmunoadherencia de los inmunocomplejos a los eritrocitos de primates ¹¹⁵. Subsecuentemente, el componente C2 se une a la molécula del C4b y es digerido por el C1s en dos fragmentos, C2a y C2b; el C2b se libera al medio, y el C2a, de mayor tamaño, permanece unido al C4b formando el complejo C4b2a que posee actividad serina proteasa dependiente de Mg^{2+} , y se conoce como "C3 convertasa de la vía clásica". La actividad de la convertasa es escindir la molécula de C3 en dos fragmentos: C3a (M_r 9.000) y C3b (M_r 180.000). El péptido C3a se libera al medio y actúa como potente anafilatoxina, mientras que el C3b se une covalentemente a la superficie diana a través de su grupo tioléster y actúa como opsonina en las reacciones de inmunoadherencia ^{116, 117}.

El componente C3 es la molécula central del complemento sobre la que pivotan la mayoría de las funciones del sistema ¹¹⁸. Es una glicoproteína dimérica cuyas subunidades α (Mr 115.000) y β (Mr 75.000) se encuentran unidas por puentes disulfuro. Al igual que el componente C4, la cadena α del C3 posee un grupo tioléster reactivo que queda expuesto tras la liberación del fragmento C3a por la acción de la convertasa; de este modo, el fragmento C3b se une covalentemente por el grupo tioléster a la superficie antigénica y la opsoniza. A su vez, la adición de una molécula de C3b naciente a la convertasa de la vía clásica genera el enzima C5 convertasa (C4b2a3b). Este enzima digiere al C5 en dos fragmentos: C5a y C5b; el C5a se libera al medio como anafilatoxina quimiotáctica, mientras que el C5b pasa a formar parte, como primer eslabón, de la cascada citolítica. La digestión del C5, es el último mecanismo enzimático en la activación del complemento.

Activación de la vía de la lectina

Esta vía se dispara al fijarse el complejo MBL/MASP-2 a residuos de manosa, principalmente. La serina proteasa MASP-2 del complejo digiere a C4 y a C2 dando lugar al complejo enzimático C4b2a (C3 convertasa de la vía clásica). Como mecanismos adicionales de activación de esta vía se han descrito la proteólisis directa del C3 por la MASP-1 ¹¹⁹, y la deposición directa de C3 en sueros deficientes en C2, C4 o MASP-2 ¹²⁰. Ambos mecanismos son probablemente ineficaces. En lo que respecta a los tripanosomátidos, desconocemos estudios previos a cerca de la interacción de la MBL de ratón con promastigotes de *Leishmania*, por lo que es probable que los experimentos descritos en esta Tesis sean los primeros a cerca de esta interacción.

Activación de la vía alternativa

Se considera a esta vía como el componente más genuino del sistema inmune innato, dado que para activarse no requiere sensibilización previa ni la participación de un factor específico adicional de reconocimiento como los anticuerpos, las colectinas o las pentraxinas. La vía alternativa está formada por el componente C3, común a las tres vías, y los factores B (fB), D (fD), H (fH), I (fI), y P (Properdina). Se dispara al depositarse el C3b en superficies activadoras de muy variado origen y naturaleza: microorganismos (virus, paredes bacterianas, levaduras), hongos,

parásitos, componentes autólogos (células senescentes, factor nefrítico), enzimas alógenas (factor del veneno de cobra), etc. Las moléculas de C3b reaccionantes se generan por la vía clásica, o en el "tick over" del C3 en el plasma. Las superficies activadoras de la vía alternativa se caracterizan por la ausencia de residuos de ácido siálico y polianiones en su composición. Al C3b depositado sobre la superficie activadora se une el fB, el cual es escindido por acción del fD en dos fragmentos, Ba (M_r 33.000) que se libera al medio, y Bb (M_r 66.000); el fragmento Bb permanece unido al C3b formando el enzima C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb). Las superficies no activadoras favorecen la fijación del fH al C3b depositado; esta interacción desplaza competitivamente la unión C3b-fB e inhibe la formación de la C3bBb convertasa y la activación de la vía alternativa. La activación indeseada de la vía alternativa es causa de inmunopatologías, por lo que está regulada por componentes del complemento solubles: fH, fI y P, y de membrana: DAF, MCP y CR1. El fH (M_r 150.000) es el principal factor regulador en fase fluida; además de su afinidad por el C3b y por sustancias polianiónicas (no activadoras), el fH participa como cofactor del fI en la digestión del C3b en iC3b inhibiendo la activación del complemento. La properdina, por el contrario, potencia el desarrollo de la vía alternativa, y al unirse a la convertasa formando el complejo C3bBbP la dota de mayor estabilidad e incrementa su vida media.

Vía lítica

Las tres vías de activación del complemento conducen a la formación de las C3 convertasas de las vías clásica (C4b2a) y alternativa (C3bBb). La adición de nuevas moléculas de C3b a dichas convertasas altera la especificidad de estos enzimas que pasan a reconocer al C5 como sustrato preferente. La molécula de C5 es una glicoproteína (M_r 196.000) estructuralmente homóloga al C3 que carece del enlace tioéster metaestable. Su digestión genera dos fragmentos: C5a (M_r 11.000), una potente anafilatoxina inflamatoria, y C5b que se deposita en la superficie antigénica y nuclea la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El fragmento C5b es inestable, y se estabiliza por la unión del C6. La subsecuente fijación del C7 dota al complejo trimolecular C5b, 6, 7 del carácter anfifílico que le ancla en la bicapa lipídica. La fijación del C8 a dicho complejo genera pequeños canales en la membrana celular y la hace más permeable al agua y a pequeños solutos. Con la deposición de las primeras moléculas de C9 se inicia un proceso de oligomerización. La composición del MAC incluye una molécula de cada uno de los componentes C5b, C6, C7 y C8, y entre 10 y 12 moléculas de C9 que se organizan como polímeros tubulares en forma de anillo. Tras su ensamblaje en la membrana celular, el

MAC forma canales transmembrana por los cuales fluyen los solutos que causan la lisis osmótica de la célula. La inserción del MAC en la bicapa lipídica es inhibida por las proteínas S (vitronectina) y SP-40,40 (clusterina) del suero. Otras dos proteínas reguladoras de membrana: CD59 (protectora) y HRF (factor de restricción homóloga), bloquean la actividad efectora del complemento sobre células propias¹²¹.

II. Objetivos

A lo largo de los últimos diez años en el Servicio de Inmunología del Centro Nacional de Microbiología, laboratorio donde se ha gestado esta Tesis Doctoral, se han estudiado en detalle las reacciones que tienen lugar entre el promastigote y el hospedador humano durante los momentos iniciales de la infección por *Leishmania*.

Dado que la leishmaniosis es una zoonosis, y que los principales reservorios naturales y accidentales del parásito son mamíferos no primates, hemos considerado que el análisis del mecanismo de infección en individuos de estos géneros podría arrojar luz sobre la estrategia infectante de *Leishmania*. Aparte del sistema humano, los modelos experimentales no primates de leishmaniosis más estudiados son el de perro y el de ratón. El perro actúa de reservorio accidental del parásito y ocupa una posición estratégica en la cadena epidemiológica de la parasitosis humana. Por el contrario, los miembros del género *Mus* no parecen actuar de reservorio natural del parásito, aunque quizás lo sean de modo accidental. *Mus musculus* es la especie animal universalmente utilizada en los estudios biomédicos, y gran parte de los avances en el conocimiento de la respuesta inmune adaptativa anti-*Leishmania* derivan de su estudio. Sorprende, por ello, que los trabajos dirigidos a analizar las etapas tempranas del mecanismo infectante del parásito en esta especie sean tan escasos, o más bien, inexistentes.

En la infección de individuos humanos por *Leishmania*, los AcN y el complemento establecen la primera barrera a la entrada del parásito, y probablemente jueguen un papel en el desarrollo subsecuente de la infección⁴⁷.

En este estudio nuestros objetivos son los siguientes:

1. La investigación de la interacción de los promastigotes de *L. infantum* con las principales opsoninas del plasma del ratón: AcN, MBL y sistema del complemento, incluyendo la descripción del desarrollo ontogénico de los distintos isotipos de AcN anti-*Leishmania*, y la caracterización de las vías y mecanismos de activación del complemento de ratón por los promastigotes.
2. El análisis de la actividad lítica del suero normal de ratón frente a promastigotes de *L. infantum* comparándola con la que poseen los sueros de individuos de otros órdenes de mamíferos.

III. Materiales y Métodos

III.2 Reactivos y Materiales

III.1.1 Reactivos químicos y biológicos

[¹²⁵I]Na], New England Nuclear.

1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenil-glicoluril (Iodógeno), Pierce Chemical Co.

2,6,10,14-tetrametil-pentadecano (Pristane), Sigma.

3,3-diamino-bencidina (DAB), Sigma.

Ácido bincinconínico, Pierce Chemical Co.

Ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA), Sigma.

Acido etilén-glicol-bis (β-amino-etil-éster)-N, N, N',N'-tetraacético (EGTA), Sigma.

Adyuvantes completo e incompleto de Freund, Difco.

Affigel-proteína A, Bio-Rad.

Agarosa-anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón (específica para la cadena μ), Sigma.

Agarosa-mannan, Sigma.

Albúmina bovina, Sigma.

Aminopterina, Sigma.

Azul brillante de Coomassie R-250, Bio Rad.

Concentradores de muestras biológicas, Vivapore.

Estreptavidina-peroxidasa (HRP), Southern Biotechnology Associates.

Estreptomina (20.000μg/ml), Sigma.

Filtros 0,45 y 0,22 μm, Millipore.

Glicerol, Sigma.

Glutamina, Sigma.

Glutaraldehido, Sigma.

Hipoxantina, Sigma.

Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Sigma.

Leupeptina, Sigma.

Mananos de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma.

Marcadores de peso molecular para proteínas, Bio-Rad.

Medio de cultivo de células RPMI-1640, Innogenetics.

Membranas de nitrocelulosa, Bio-Rad.

Nonidet P40 (NP-40), Sigma.

Orto-fenil-diamina, Sigma.
Penicilina (20.000 UI/ml), Pierce.
Piruvato sódico, Sigma.
Proteína A, Amersham Biosciences.
Proteína G, Amersham Biosciences
Reactivo FACS-Flow para Citometría de Flujo, Becton Dickinson.
Reactivos para el marcaje de anticuerpos con Cianina-5, Amersham Biosciences.
Reactivos para electroforesis de proteínas en SDS-PAGE, Bio-rad.
Reactivos químicos generales, Panreac, Merck y Fluka.
Sephadex G-25 y Sepharosa CL-4B, Amersham Biosciences.
Sepharosa-proteína A y Sepharosa-proteína G, Amersham Biosciences.
Suero bovino fetal, TDI.
Sulfo-NHS-LC-biotina, Pierce Chemical Co.
Tween 20, Sigma.
Yoduro de propidio (YP), Sigma.
Zimosán, Sigma.

III.1.2 Parásitos

Promastigotes de *Leishmania infantum* cepa MHOM/Fr/LEM75 (PB75), y del aislado primario de perro denominado 10445, se cultivaron a 26°C en RPMI- 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (tratado térmicamente a 56°C durante 30 minutos), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U.I./ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (medio completo). Cuando el cultivo alcanzaba la fase estacionaria, una alícuota del mismo se diluía en medio completo fresco para reiniciar el cultivo.

En los ensayos para determinar la capacidad citolítica del suero normal de distintos géneros de vertebrados, los promastigotes procedían de las fases logarítmica (día 4) y de la fase estacionaria temprana de crecimiento (día 8). Los promastigotes utilizados en el resto de los experimentos del estudio procedían de la fase estacionaria temprana de crecimiento.

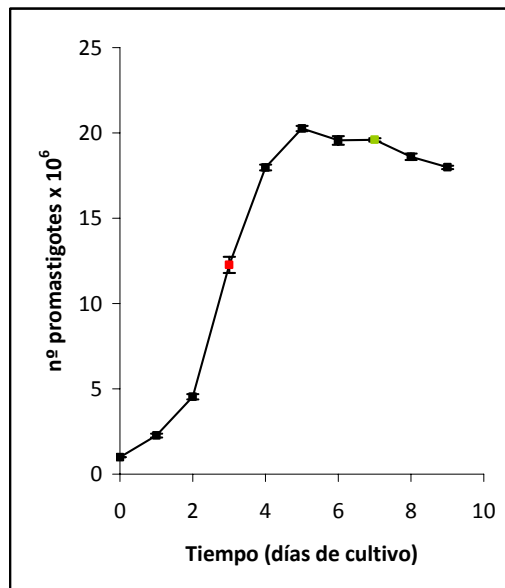


Figura 1. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. infantum*. El cultivo se inició a día 0 con 10^4 promastigotes/ml en medio completo. Al representar el número de promastigotes obtenido en los recuentos diarios de los cultivos se distinguen dos fases de crecimiento de la población de leishmanias: logarítmica (■) y estacionaria (■). Los resultados se presentan como la media \pm EE de, al menos, tres ensayos.

III.1.3 Animales

Los ratones utilizados pertenecían a la especie *Mus musculus*, cepas BALB/c, CD1 COB, C3H/He, C57BL/6, C57BL/6 μ .KO y C57BL/6. RAG2 $^{-/-}$. Todos los ratones, excepto los de las cepas C57BL/6 μ .KO y C57BL/6. RAG2 $^{-/-}$, se criaron a partir de animales existentes en el animalario del Centro Nacional de Microbiología (C.N.M.); las cepas C57BL/6 μ .KO (deficiente en anticuerpos) y C57BL/6. RAG2 $^{-/-}$ (deficiente en el gen activador de las recombinasas que impide la maduración de los linfocitos B y T) ¹²² procedían del “Centre de Développement des Techniques Avancées pour l’expérimentation animale” (CDTA) del “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS, Orléans, Francia). En los ratones deficientes en anticuerpos, se comprobó, por citometría de flujo (CF), la ausencia de inmunoglobulinas en la superficie de los linfocitos B de la sangre periférica de cada ratón utilizado en los ensayos.

Ratas de la cepa Sprague-Dawley se utilizaron como fuente de complemento, y en la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) de rata frente a los componentes C1q y C3 del

complemento del ratón.

En los estudios de las cinéticas de lisis de promastigotes mediadas por complemento se utilizaron igualmente sueros de individuos normales de los siguientes órdenes: *Rodentia*: *Cavia porcellus* (cobaya), *Mesocricetus auratus* (hámster o criceto sirio), *Rattus rattus* (rata) y *Meriones spp* (merión); *Carnívora*: *Canis familiaris* (perro), y *Lagomorfa*: *Oryctolagus cuniculus* (conejo). Excepto los perros, que procedían de distintos criaderos del País Vasco, el resto de animales se criaron en el animalario del C.N.M. Los animales se trataron siguiendo las especificaciones del Real Decreto 18/3/1988 y 21/10/2005, sobre “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos”, y por el reglamento interno del Inst^º de Salud Carlos III.

III.1.4 Líneas celulares

En la obtención de AcM se utilizó la línea de mieloma de ratón Sp2/O-Ag-14 (ATCC, CRL-1581) procedente de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las células se cultivaron en medio completo a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%) en aire.

III.2 Reactivos inmunoquímicos

Algunos de los anticuerpos policlonales (AcP) y anticuerpos monoclonales (AcM) utilizados provenían de casas comerciales; otros, fueron cedidos generosamente por colegas, y un tercer grupo, se desarrolló en nuestro laboratorio.

Los AcM empleados fueron: AcM de rata SIM 161 anti-C3 de ratón, y AcM de rata SIM 187 anti-C1q de ratón, obtenidos en nuestro laboratorio durante la investigación; AcM de ratón SIM 225 anti-C5 humano, con reactividad cruzada frente al C5 de ratón, desarrollado en nuestro laboratorio por la Dra. Mercedes Domínguez e Inmaculada Moreno en ratones DBA/2 deficientes en C5; AcM de rata RmC7 H8 anti-C4 de ratón (Connex Lab.); AcM de rata 2B8 anti-MBL-A de ratón, y AcM de rata 16A8 anti-MBL-C de ratón, cedidos generosamente por el Dr. J.C. Jensenius (Universidad de Aarhus, Dinamarca); AcM de rata HB-215 frente al antígeno de superficie SCA-1 (ratón), cedido generosamente por la Dra. María Luisa Gaspar (Unidad de Inmunobiología, C. N. M.); AcM de ratón MAR 18. 5 (ATCC, TIB 126) frente a la cadena κ de las inmunoglobulinas de rata.

Los AcP de cabra anti cadenas pesadas + ligeras (H+L), γ , μ , γ 1, γ 2a, γ 2b y γ 3 de ratón sin

marcar y conjugados con peroxidasa, así como los AcP de cabra anti cadenas γ , μ , γ_1 y γ_2a de rata conjugados a peroxidasa procedían de Southern Biotechnology Associates. También se utilizaron los siguientes anticuerpos: AcP de conejo anti-IgG de ratón desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. Alfredo Toraño; AcP de cabra anticadenas $\mu+\gamma$ de rata marcado con ficoeritrina (PE) de Becton Dickinson; AcP de conejo anticadenas $\mu+\gamma$ de cabra marcado con FITC de Sigma; AcP de cabra anti-C3 del complemento de ratón sin marcar y conjugado a peroxidasa de ICN Labs.

III.2.1 Marcaje radiactivo de los anticuerpos con el isótopo [¹²⁵I]Na

En los radioinmunoensayos celulares (RIA) realizados se utilizaron anticuerpos antiinmunoglobulinas y antiproteínas del complemento de ratón y también conjugados secundarios marcados con [¹²⁵I]Na. Para el marcaje radiactivo se utilizaron anticuerpos purificados por afinidad utilizándose entre 25 y 50 μg en cada experimento. El marcaje se realizó en viales tapizados con iodógeno depositado por evaporación a partir de 100 μl de una solución de iodógeno en cloroformo (1 mg/ml).

Las proteínas diluídas en tampón 0,1 M fosfato sódico pH 7,4, se marcaron con 0,5 mCi de una solución de [¹²⁵I]Na (185 MBq/ml, 17 mCi/ μg) diluída en 0,1 mM NaOH. La mezcla se incubó a temperatura ambiente con agitación intermitente durante cinco minutos. Tras la incubación, el [¹²⁵I]Na que no había reaccionado se eliminó por filtración a través de una pequeña columna de Sephadex G-25 utilizando TL como eluyente. Las fracciones que contenían la proteína marcada se recogieron y se determinó la actividad específica de la preparación.

III.2.2 Marcaje de anticuerpos con fluorocromos

Para el marcaje con Cyanina 5 (Cy 5) se utilizó el kit comercial de Amersham Pharmacia Biotech según las instrucciones del proveedor. El marcaje de anticuerpos con FITC se realizó según el protocolo descrito por Galfre y Milstein ¹²⁷.

III.2.3 Obtención de los sueros normales (no inmunes) utilizados en el estudio

Las muestras de sangre de rata, criceto, merión y cobaya se obtuvieron por punción cardíaca; las de ratón por sangría a través del plexo retroorbital y punción cardíaca; en el resto de

animales y en humanos, la extracción se realizó por venopunción. La sangre se recogió en tubos de vidrio (sin heparina) dejándola reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C), para favorecer la coagulación; una vez coagulada, se centrifugó (1.200 x g, 10 min), y el suero se almacenó a – 80°C hasta su empleo.

III.2.4 Aislamiento de inmunoglobulinas de ratón de las clases G y M

Para obtener la IgM se utilizó un inmunoadsorbente constituido por anticuerpos de cabra monoespecíficos para la IgM de ratón acoplados a agarosa, y para aislar la IgG, un inmunoadsorbente de agarosa-proteína G.

La inmunoadsorción para la IgM se llevó a cabo en tubos de centrifuga incubando en baño de hielo durante 30 minutos, 2 ml de suero normal de ratón (SNR) con 2 ml de esferas de agarosa-anticuerpos de cabra anti-IgM. Tras la centrifugación (300 x g, 2 min), el sobrenadante se sometió a dos adsorciones adicionales en las mismas condiciones. El suero adsorbido se filtró (0,2 µm de poro), y se almacenó en baño de hielo hasta su uso. El inmunoadsorbente se lavó repetidamente por centrifugación (500 x g, 5 min), y la IgM unida se eluyó con 0,1 M glicina-HCl pH 2, 4 (solución de Sørensen); el eluido se neutralizó con una solución 1 M Tris-HCl pH 9,0, y se dializó frente a PBS. La concentración del anticuerpo se determinó por su adsorbancia a 280 nm (A_{280nm}), utilizándose como coeficiente de extinción porcentual de la IgM de ratón 1 D.O. = 1 mg/ml.

Para aislar la IgG, el SNR desprovisto de IgM se incubó con esferas de agarosa-proteína G siguiendo el procedimiento descrito para la IgM. Como coeficiente de extinción porcentual para la IgG de ratón se utilizó 1,4 D.O. = 1 mg/ml medida a A_{280nm} .

La homogeneidad de las preparaciones de IgM e IgG obtenidas se analizó por electroforesis (SDS-PAGE) al 10%, en condiciones reductoras. Los anticuerpos se conservaron a - 80°C hasta su empleo.

III.2.5 Preparación de suero de ratón adsorbido con promastigotes de *L. infantum*

Los promastigotes se incubaron en baño de hielo con SNR sin diluir a razón de 5×10^8 promastigotes/ml, mezclando periódicamente durante 30 minutos. Finalizada la incubación, la muestra adsorbida se centrifugó (11.000 x g, 5 min) y el sobrenadante se sometió a dos nuevas adsorciones en las mismas condiciones.

III.2.6 Obtención de suero de ratón deficiente en C1q y de C1q purificado

El suero de ratón carente de C1q (SNR/AdsC1q), y la proteína C1q purificada se obtuvieron a partir de SNR o de suero de ratones C57BL/6 μ .KO (SR μ .KO) por filtración a través de una columna de Sepharosa CL-4B a la que se habían unido covalentemente inmunocomplejos formados por IgG de ratón (IgGR) y anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón (CAIgGR)¹²³.

El inmuoadsorbente se preparó acoplado IgGR purificada a Sepharosa CL-4B activada con BrCN¹²⁴, utilizándose una relación de 2 mg de IgGR/ml de esferas de Sepharosa CL-4B. Tras el acoplamiento, la Sepharosa-IgGR se incubó a 4°C durante 30 minutos con agitación con el antisuero CAIgGR; a continuación, las esferas se lavaron 3 veces por centrifugación (200 x g, 3 min) en PBS.

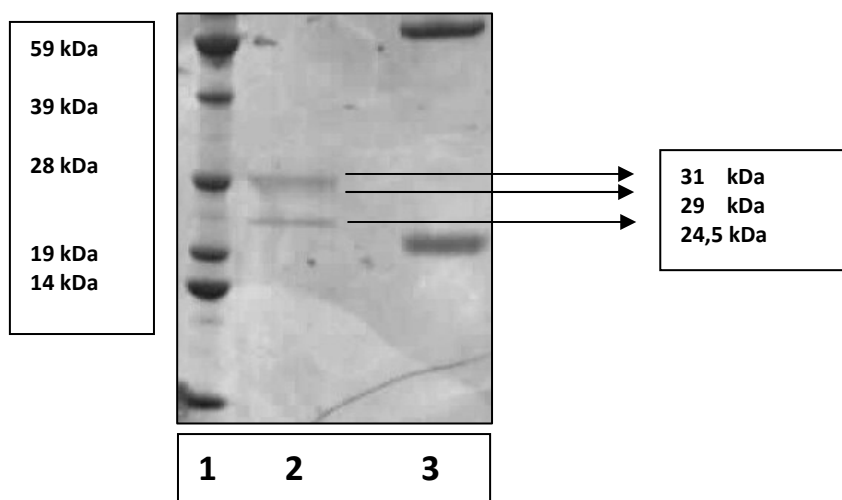


Figura 2. Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína C1q obtenida a partir de SNR. El SNR se sometió a adsorción en columna de Sepharosa CL-4B-IgR-CAIgGR; la proteína unida se eluyó con 1M ClNa. Un estándar de proteínas (calle 1), la preparación de C1q (calle 2) y una preparación de inmunoglobulina de ratón IgG (calle 3), se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE 4-12%, en condiciones reductoras

El SNR diluido al 50% en PBS-10 mM EDTA se mantuvo circulando a 4°C a través de la columna de Sepharosa-IgGR-CAIgGR. Tras dos ciclos de adsorción, el filtrado se dializó (2h, 4°C) frente a PBS y se concentró, ajustándose su volumen al inicial del SNR. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. El C1q adsorbido a la Sepharosa-IgGR-CAIgGR se eluyó de la columna con 1M NaCl.

Las fracciones eluidas se concentraron y dializaron (16 h, 4°C) frente a PBS. La potencial contaminación de la preparación de C1q por IgG, se eliminó adsorbiendo la preparación de C1q con Sepharosa-proteína G durante 30 min a 4 °C. La muestra adsorbida se filtró a través de 0,2 µm, y la concentración del C1q se determinó por espectrofotometría, utilizando como coeficiente de extinción porcentual de la C1q de ratón $1 A_{280 \text{ nm}} = 1,4 \text{ mg/ml de C1q}^{125}$. La preparación de C1q obtenida se analizó mediante electroforesis (SDS-PAGE) al 10% en condiciones reductoras. En la **Figura 2** se observan las subunidades del C1q de ratón de $M_r \approx 31, 29$ y 24 KDa.

III.2.7 Anticuerpos monoclonales de rata anti-C3 de ratón

Para inmunizar las ratas se utilizó como inmunógeno zimosán de *Saccharomyces* osonizado con SNR preparado incubando (37°C, 1 h) 10 mg de zimosán (activado previamente por ebullición en 0,9% NaCl durante 1 hora) con 2 ml de SNR recién extraído; tras la adsorción, las partículas de zimosán se lavaron tres veces por centrifugación (500 x g, 5 min) con PBS, y se resuspendieron a la concentración de 1 mg/ml¹²⁶.

Para la obtención de AcM frente a la proteína C3 de ratón se utilizaron ratas Sprague-Dawley de seis a ocho semanas de edad. Los animales se inmunizaron tres veces por vía intraperitoneal (i.p.); la primera con 100 µg de zimosán osonizado (zimosán-C3) emulsionado en adyuvante completo de Freund, y las dos siguientes con 100 µg de zimosán emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. El periodo entre cada inmunización fué de 15 días. La primera sangría se realizó al quinto día tras la tercera dosis.

El título de anticuerpos anti-C3 de las distintas ratas se determinó por ELISA indirecto. Los pocillos de la placa se tapizaron durante 16 horas a 4°C con 50 µl de una suspensión de mananos (0,25 mg/ml) en tampón 280 mM carbonato/bicarbonato pH 9,5 y, posteriormente, se bloquearon con 75 µl de albúmina bovina (BSA) al 2% en PBS (37°C, 30 min). A continuación, se añadió a los pocillos 50 µl de SNR diluido al 25% en PBS conteniendo 0,9 mM CaCl₂ y 0,5 mM MgCl₂, y se incubó (37°C, 30 min), para permitir la deposición de fragmentos de C3 en los mananos. Finalizada la incubación, la placa se lavó con PBS-Tween-20 al 0,05% (PBS-Tween), añadiéndose a los pocillos los sueros (50 µl) de las ratas inmunizadas en diluciones seriadas (1/10) en PBS; tras incubar 2 horas a 37°C la placa se lavó con PBS-Tween, se añadieron 50 µl de AcP de cabra anti cadena γ de rata conjugado a peroxidasa diluido en PBS, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó exhaustivamente con PBS-Tween,

adicionándose a los pocillos 100 µl de orto-fenil-diamina (OPD), substrato de la peroxidasa, a la concentración de 0,5 mg/ml en tampón 0,1 M citrato-0,2 M fosfato pH 5,6 suplementado con 0,001% H₂O₂; tras una breve incubación, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl de 3N H₂SO₄ a los pocillos. La densidad óptica de la OPD oxidada se midió ($\lambda = 492$ nm) en un espectrofotómetro Multiscan Plus (Flow). Como control negativo del ensayo se utilizó suero normal de rata (SNRa).

Transcurridos 10 días desde la fecha de la sangría, el animal seleccionado como donante de esplenocitos recibió una inyección de 50 µg de zimosán opsonizado con C3 por vía intravenosa; tres días más tarde se le extrajo el bazo, tomándose una muestra de sangre para utilizar el suero como control positivo en los ensayos de selección.

La línea celular de mieloma de ratón elegida para la fusión fue la SP2/O-Ag-14. El proceso de fusión se llevó a cabo según los procedimientos descritos por Galfré y Milstein ¹²⁷. Se empleó una relación mieloma/esplenocitos de 1: 3, y como agente fusionante polietilenglicol (PEG 4000). Tras la fusión, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio completo selectivo HAT (hipoxantina-aminopterin-timidina) a una densidad de $\sim 2 \times 10^5$ células/pocillo. A partir del quinto o sexto día de la fusión se podían observar clones de hibridomas secretores potenciales de anticuerpos anti-C3. Su detección se llevó a cabo mediante el ELISA indirecto anteriormente descrito.

Paralelamente, y como control, se realizó un ELISA utilizando pocillos tapizados con mananos opsonizados con SNR tratado con 10 mM EDTA, lo que impide la activación del complemento y la deposición del C3 en los mananos adsorbidos a la placa. En ausencia de iones Ca²⁺, se fijan a los mananos diversas opsoninas del SNR como inmunoglobulinas o el componente C1q del complemento. De este modo, combinando ambos ELISAs es posible identificar hibridomas secretores de anticuerpos específicos para C3. Las placas tapizadas con mananos incubados bien con SNR o con SNR-10 mM EDTA, se incubaron (2h, 37°C) con los sobrenadantes de los pocillos de la fusión; el ensayo se reveló con el AcM MAR-18.5-biotinilado (ratón anticadena κ de las inmunoglobulinas de rata), y estreptavidina-peroxidasa. Como control positivo se utilizó el suero de la rata donante de los esplenocitos, y como control negativo, SNRa.

La reactividad de los sobrenadantes de los pocillos seleccionados por ELISA frente al C3 se analizó mediante radioinmunoensayo celular (RIA). Para ello se incubaron 50 µl de cada sobrenadante (30 min, 37°C) con promastigotes opsonizados con SNR diluido al 50% en PBS, o con SNR diluido al 50% en PBS-10 mM EDTA. La reacción se detuvo por dilución con 1 ml de PBS suplementado con 10% SBF y 0,01% NaN₃ (tampón de lavado (TL), frío; los sobrenadantes con reactividad frente al factor C3 se detectaron con el AcM MAR-18.5 marcado con ¹²⁵I en un

contador gamma.

Los hibridomas de los pocillos seleccionados se clonaron dos veces por dilución límite para establecer su monoclonalidad, y seleccionar células cromosómicamente estables. A partir de los híbridos obtenidos se eligió el clon SIM 161-19.1.2 (SIM 161). La especificidad del anticuerpo se analizó por inmunoadsorción en placa, seguida de electroforesis (SDS-PAGE) y “western-blot”. Los pocillos de la placa se tapizaron con 50 μ l del AcM SIM 161 (10 μ g/ml) durante 16 horas a 4°C; tras bloquear (30 min, 37°C) la superficie libre con 75 μ l de BSA al 2% en PBS, se añadieron a los pocillos 50 μ l de SNR diluido al 50% en PBS-10mM EDTA, incubándose durante 30 minutos a 37°C. Como anticuerpo de captura del control negativo se utilizó un AcM de rata específico para el antígeno de superficie SCA-1 de célula troncal (stem cell) de ratón, ausente en el SNR.

El material capturado en los pocillos tapizados con los anticuerpos AcM SIM 161 y AcM anti-SCA-1, se solubilizó con una solución 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 y 1% SDS, y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Al término de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa, y tras su bloqueo con 5% leche desnatada en PBS, el C3 de ratón se detectó con un AcP de cabra anti-C3 conjugado con peroxidasa. El resultado de este análisis confirma que el AcM SIM 161 reconoce la cadena β (\approx 70 kDa) en la estructura nativa del componente C3 del SNR (**Figura 3**); por el contrario, no lo hace si la molécula ha experimentado previamente un tratamiento desnaturalizante como es la electroforesis en SDS-PAGE.

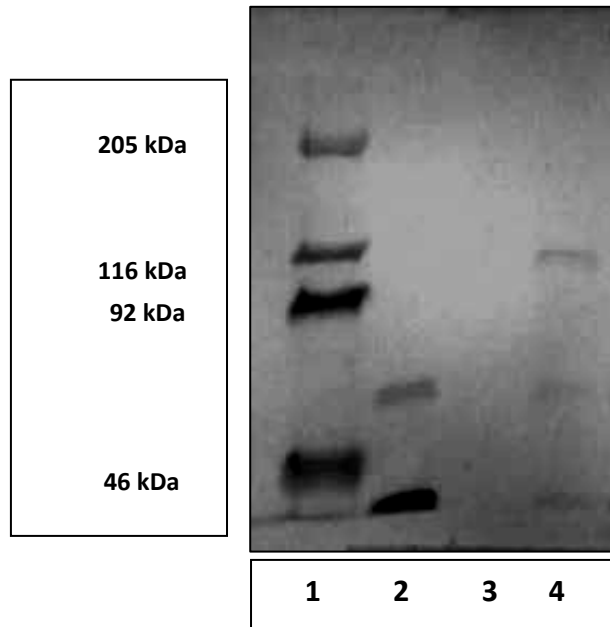


Figura 3. Análisis de la reactividad del AcM SIM 161 frente a la cadena β (≈ 70 kDa) de la proteína C3 del complemento de ratón. La especificidad del anticuerpo se analizó mediante captura del antígeno en placa, seguida de su análisis en SDS-PAGE y “Western-blot”. Para capturar el antígeno los pocillos de la placa se tapizaron con el AcM SIM 161 (calle 2); acto seguido se añadió el SNR diluido al 50% en PBS-10mM EDTA. Como control negativo de anticuerpo de captura se utilizó un AcM de rata específico para el antígeno de superficie SCA-1 de célula troncal (*stem cell*) de ratón (calle 3). El material capturado en los pocillos se solubilizó con 62,5 mM M Tris-HCl pH 6,8 y 1% SDS, y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE (7 %) en condiciones reductoras. Tras la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, el C3 de ratón se detectó con un AcP de cabra anti-C3 conjugado con peroxidasa. En la calle 1 se muestra el estándar de proteínas y en la calle 4 el control positivo de C3 del SNR.

II.2.8 Anticuerpos monoclonales de rata anti-C1q de ratón

Ratas Sprague-Dawley se inmunizaron tres veces por vía intraperitoneal (i.p.); la primera con 30 µg de la proteína C1q purificada según se describe en el *apartado III.2.6* emulsionada en adyuvante completo de Freund, y las dos siguientes con 30 µg de la proteína emulsionada en adyuvante incompleto de Freund. El periodo entre cada inmunización fue de 15 días. La primera sangre se realizó al quinto día tras la tercera dosis y la dosis final en el ratón seleccionado fue de 25 µg de C1q (i.v.).

Las células del bazo de la rata donante se fusionaron con células del mieloma SP2/O-Ag-14 según se ha descrito en la obtención de los AcM anti-C3 de ratón. La selección de los hibridomas productores de anticuerpos anti-C1q de ratón se llevó a cabo por ensayos de ELISA, RIA y CF. En los ensayos de ELISA, los pocillos se tapizaron durante 16 horas (4°C) con 50 µl de C1q purificado (15 µg/ml en PBS), o con 50 µl de una mezcla de anticuerpos purificados de ratón (IgG e IgM, ambos a 10 µg/ml). Tras la adsorción, los pocillos se bloquearon (30 min, 37°C) con PBS-2% BSA, y las placas se lavaron con PBS-Tween; los sobrenadantes de los pocillos de la fusión (50 µl) se transfirieron a las placas, y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Tras cuatro lavados con PBS-Tween, los anticuerpos retenidos en los pocillos se detectaron con el AcM MAR-18.5 biotinilado y el conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Como control positivo del ELISA se utilizó el suero de la rata donante de los esplenocitos, y como negativo, SNRa.

Los híbridos de los pocillos con reactividad positiva frente a la proteína C1q, y negativa frente a las inmunoglobulinas (IgM e IgG), se seleccionaron y se clonaron dos veces por dilución límite. Ensayos posteriores de selección se llevaron a cabo mediante RIA, con promastigotes opsonizados con SRµ.KO diluido al 50% en PBS y suplementado con 10 mM EDTA. El AcM anti-C1q de ratón seleccionado se denominó SIM 187-37.1.4 (SIM 187); su especificidad frente al C1q se confirmó mediante "Western-blot" en un ensayo similar al descrito en el desarrollo de AcMs frente a C3 de ratón.

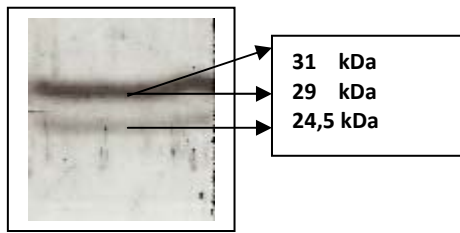


Figura 4. Reactividad del AcM SIM 187 frente a C1q de ratón en ensayo de Western-blot. Para capturar el antígeno los pocillos de la placa se tapizaron con el AcM SIM 187, tras bloquear los pocillos con 2% BSA-PBS se añadió SR μ .KO diluido al 50% en PBS-10mM EDTA. Como control negativo del anticuerpo de captura se utilizó un AcM de rata específico para el antígeno de superficie SCA-1 de célula troncal (*stem cell*) de ratón. El material capturado en los pocillos se solubilizó con 62,5 mM M Tris-HCl pH 6,8 y 1% SDS, y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE (10 %) en condiciones reductoras. Tras la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, el C1q de ratón se detectó con un AcP de cabra anti-C1q de perro conjugado con peroxidasa con reactividad cruzada con la proteína C1q de ratón.

III.2.9 Crecimiento y purificación de los anticuerpos monoclonales

Los hibridomas seleccionados: SIM 161 y SIM 187, se crecieron en un biorreactor Mini-Perm (Heraeus) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como inóculo del cultivo se utilizaron 50 millones de células de cada hibridoma. El cultivo se llevó a cabo en medio completo en el biorreactor bajo lenta rotación (10-15 rpm) en incubador a 37°C y atmósfera de CO₂ (5%) en aire. Al término del cultivo, el AcM presente en el sobrenadante se precipitó con NH₄(SO₄)₂ al 50% de saturación. El precipitado se resuspendió en tampón PBS, y se dializó exhaustivamente frente a dicho tampón. El aislamiento de los AcM se realizó por adsorción en columna de Sepharosa-proteína G siguiendo las especificaciones del proveedor.

III.2.10 Obtención de suero de ratón carente de MBL

Para eliminar la proteína MBL del suero de ratón se utilizó un inmunoabsorbente de Sepharosa-mananos. Antes de proceder al tratamiento del suero, las esferas del inmunoabsorbente se trataron con 0,1 M acetato sódico pH 3,0, y se ajustaron a neutralidad con PBS. El SR μ .KO sin diluir, se incubó, bajo mezcla intermitente, con esferas de Sepharosa-mananos en baño de hielo durante 30 minutos. Finalizada la incubación, la mezcla de reacción se centrifugó (300 x g, 3 min), y el sobrenadante se sometió a una nueva adsorción en idénticas

condiciones. Tras la segunda adsorción y su correspondiente centrifugación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,2 μm de poro, y se conservó en baño de hielo hasta su empleo. Las esferas de Sepharosa-mananos se lavaron exhaustivamente con PBS, y la MBL retenida se eluyó con 0,1 M acetato sódico pH 3,0. El material eluído se neutralizó con 1 M Tris-HCl, pH 9,0, y se dializó frente a PBS.

La presencia de MBL en el SR μ .KO se determinó mediante ELISA indirecto frente a mananos. Los pocillos se tapizaron con 50 μl de una suspensión de mananos (0,25 mg/ml) en tampón 250 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 9,5. A continuación, los pocillos se incubaron (30 min, 37°C) y posteriormente se lavó con PBS-Tween. Seguidamente se añadió a los pocillos 100 μl de SNR, SR μ .KO, o SR μ .KO adsorbido de proteína MBL (SR μ .KO/AdsMBL), diluidos seriadamente en PBS complementado con 5 mM CaCl₂ y 5 mM MgCl₂. Tras una primera incubación (2h, 37°C), la placa se lavó con PBS-Tween, y se añadió a cada pocillo una mezcla de AcM de rata específicos para la MBL-A y MBL-C de ratón. Tras una segunda incubación (1h, 37°C), la placa se lavó con PBS-Tween, se añadieron 100 μl del AcM MAR-18. 5 conjugado a biotina, y se volvió a incubar (1h, 37°C) por tercera vez. Finalizada la incubación, la placa se lavó con PBS-Tween y se reveló con estreptavidina-peroxidasa y OPD.

III.3 Determinación de la fijación de proteínas del complemento en la superficie del promastigote

Para medir la deposición de C3 en la superficie del parásito, se incubaron promastigotes de la fase estacionaria temprana de los cultivos lavados dos veces con PBS por centrifugación (1.500 x g, 15 min), con 100 μl de SNR diluido al 50% en PBS, o en PBS/EGTA-Mg (concentraciones finales, 10 mM EGTA y 7 mM MgCl₂). Las muestras se incubaron a 37°C durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 0-10 minutos. Las reacciones se detuvieron por dilución con 1 ml de TL frío, y los promastigotes se lavaron dos veces por centrifugación (11.000 x g, 1 min). El sedimento celular se resuspendió en 100 μl de TL frío conteniendo bien el AcM SIM 161 anti-C3 de ratón marcado con ²⁵I (RIA), o el AcM SIM 161 conjugado con Cy-5 (CF). Tras una incubación (30 min) en baño de hielo (RIA), o a temperatura ambiente en la oscuridad (CF), las muestras se lavaron dos veces por sedimentación (11.000 x g, 1 min) en PBS, y bien la radiactividad (¹²⁵I) o la fluorescencia asociada a los promastigotes se determinó en un contador gamma o en el citómetro de flujo.

La fijación de C3 a los promastigotes a partir del suero de ratón deficiente en anticuerpos

(SR μ .KO y SR. RAG2^{-/-}), del suero de ratón carente de C1q (SNR/AdsC1q), y del suero de ratón deficiente en anticuerpos y en MBL por inmuoadsorción (SR μ .KO/AdsMBL), se analizó según el protocolo anterior sustituyendo, en cada caso, el SNR por el suero deficiente correspondiente.

Los inmunoensayos celulares destinados a medir la fijación de C1q, C4 y C5 a los promastigotes, se realizaron según un protocolo similar al utilizado para medir la deposición de C3, empleándose como anticuerpos SIM 187 (rata anti-C1q de ratón), RmC7H8 (rata anti-C4 de ratón) y SIM 225 respectivamente, marcados con ¹²⁵I (RIA) o con FITC o Cy-5 (CF).

III.3.1 Análisis cuantitativo del C3 depositado en los promastigotes

III.3.1.a Cálculo de la fracción funcional de la preparación del AcM SIM161

Para determinar la actividad de la preparación del AcM SIM 161 yodado, se utilizaron dos series de tubos en los que se depositó una cantidad fija y limitante del SIM 161-[¹²⁵I]. A los tubos de la serie problema se añadieron promastigotes en concentraciones crecientes opsonizados con SNR diluido al 50% en PBS (3 min, 37°C) en concentraciones crecientes, de modo que la concentración de los epítomos del promastigote reconocidos por el SIM 161 excediera la de los parátomos del anticuerpo; a los tubos de la serie control, se añadieron promastigotes sin opsonizar en las mismas concentraciones que a los de la serie problema. Las muestras se incubaron en baño de hielo durante dos horas para que la reacción alcanzara el equilibrio. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de TL frío, y se centrifugó (11.000 x g, 1 min). Tras un segundo lavado, la radiactividad asociada al sedimento de promastigotes se determinó en un contador gamma.

Para calcular la fracción funcional (**F**) del anticuerpo yodado los datos obtenidos se representaron gráficamente según la transformación lineal directa de Eisenthal y Cornish-Bowden¹²⁸,

$$\frac{V_{\max}}{v} - \frac{K_m}{[S]} = 1$$

que corresponde a una recta que corta en **v** (cpm unidas) al eje de coordenadas (eje V_{\max}), y en **S** (concentración de promastigotes opsonizados) al de abscisas (eje K_m). Cada par de valores de **v_i** y **S_i**, se representan sobre el eje V_{\max} y K_m , respectivamente. La unión de cada par de valores **v_i**, **S_i**

mediante una línea recta, genera una familia de n rectas cuya prolongación da lugar a n ($n-1/2$) puntos de intersección. Los puntos de intersección se ordenan según el valor de sus coordenadas de izquierda a derecha (para obtener los valores de K_m), y según el valor de sus abscisas de abajo a arriba (para obtener los valores de V_{max}). La mediana de esta familia de puntos representa la mejor estimación de V_{max} y K_m .

Las coordenadas de los puntos de intersección se obtuvieron mediante un programa informático diseñado en nuestro laboratorio. A partir de los datos de V_{max} y K_{max} se obtiene el valor de F (mediana de la familia de puntos V_{max}) del anticuerpo, y su constante de disociación K_d (mediana de la familia de puntos de K_m).

III.3.1.b Cálculo del número de moléculas de C3 que se unen por célula de promastigote

Promastigotes de la fase estacionaria temprana de los cultivos lavados dos veces por centrifugación ($1.500 \times g$, 15 min) con PBS, se incubaron a una concentración de 10^7 promastigotes/ml con SNR diluido al 50% en PBS durante 3 minutos a 37°C ; la reacción se detuvo añadiendo 10 volúmenes de TL frío, y, seguidamente, los promastigotes se centrifugaron ($1.500 \times g$, 15 min). El sedimento celular se resuspendió en TL frío a la concentración de saturación calculada previamente en 50×10^3 promastigotes/tubo, completándose con promastigotes no opsonizados por SNR hasta una concentración de 5×10^6 promastigotes/tubo en un volumen final de 0,2 ml.

El procedimiento para cuantificar el número de moléculas de C3 depositadas/promastigote se realizó incubando un número fijo y limitante de promastigotes opsonizados con concentraciones crecientes del AcM SIM 161- ^{125}I , de modo que la concentración de AcM marcado excediera en dos o tres órdenes de magnitud la del C3 depositado en los promastigotes.

El ensayo se realizó en dos series paralelas de tubos. A los tubos de la serie problema se añadió un número fijo de promastigotes opsonizados, y a los tubos de la serie control un número idéntico de promastigotes no opsonizados. Los tubos se centrifugaron ($11.000 \times g$, 1 min); el sedimento se resuspendió en 0,2 ml de TL frío conteniendo dosis crecientes del SIM 161- ^{125}I , y los tubos se incubaron en baño de hielo durante 3 horas. Finalizada la incubación los tubos se lavaron dos veces por centrifugación con 1 ml de TL frío, y las cpm de SIM 161- ^{125}I unidas a los promastigotes se determinaron en un contador gamma.

El cálculo de la constante de equilibrio del AcM SIM 161-[¹²⁵I] y el número de moléculas de C3 unidas por promastigote se llevó a cabo por el método de Scatchard ¹²⁹, representando los valores del cociente entre las cpm unidas a los promastigotes/cpm libres en ordenadas, y las cpm unidas a promastigotes en abscisas a las distintas dosis de SIM 161-[¹²⁵I] añadido. Para los cálculos, las cpm de SIM 161-[¹²⁵I] representan las cpm funcionales que se derivan de multiplicar las cpm totales por la fracción funcional (**F**) del AcM. A partir de estos datos se obtiene la recta de regresión, su pendiente (**m**) y la ordenada en el origen (**b**). El cálculo de la constante de asociación del SIM 161 (**K_a**), y el número de sus moléculas que se unen por promastigote (**n**) se obtuvo a partir de las ecuaciones descritas por Ways y Parham¹³⁰,

$$K_a = \frac{-m.S.V.10^{14}}{4,44.M} \quad (1)$$

$$n = \frac{b.V.10^{21}}{1,66.N.K_a} \quad (2)$$

Siendo:

m = pendiente de la recta de regresión de los puntos experimentales

S = actividad específica de la preparación del SIM 161-[¹²⁵I]

V = volumen de reacción en ml

M = peso molecular del anticuerpo. Para IgG = 150.000

b = valor del punto de corte de la recta de regresión con el eje de ordenadas

N = número de promastigotes utilizados en el ensayo

K_a = constante de asociación del SIM 161

A partir de la ecuación (1) se obtiene el valor de K_a; substituyendo los valores de K_a y de la ordenada en el origen (**b**) en la ecuación (2), se obtiene el número de moléculas (**n**) de AcM SIM 161 que se unen por promastigote. Al inicio de la reacción, en condiciones de saturación, el AcM se fija a través de uno solo de sus parátomos; sin embargo, en el equilibrio, la interacción se convierte, probablemente, en bivalente. Dependiendo de ello, la relación estequiométrica entre ligando y anticuerpo (C3: SIM 161) puede variar entre uno y dos.

III. 4 Interacción de los anticuerpos naturales con los promastigotes de *Leishmania infantum*

III.4.1 Determinación del título e isotipo de los anticuerpos naturales

Se incubaron (5 min, 37°C) alícuotas conteniendo 10^7 promastigotes de *L. infantum*, con 100 µl de SNR diluido seriadamente (\log_2) en PBS. Tras la incubación las células se lavaron tres veces por centrifugación (11.000 x g, 1 min) con 1 ml de TL frío cada vez. El sedimento celular se resuspendió en 100 µl de TL frío conteniendo anticuerpos de cabra anti-cadena μ o anti-cadena γ de ratón marcados con ^{125}I . Las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo, y se lavaron dos veces por centrifugación (11.000 x g, 1 min) con 1 ml de TL frío. Finalmente, la radiactividad asociada a los promastigotes se determinó en un contador de radiactividad gamma.

III.4.2 Análisis de la cinética de fijación de IgM e IgG

El análisis comparado de la cinética de fijación de fijación de IgM o IgG del suero del ratón se llevó a cabo incubando a 37°C alícuotas conteniendo 10^7 promastigotes con SNR diluido al 50% en PBS a distintos tiempos. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de TL y se procesó como se ha señalado en el apartado anterior.

III.5 Ontogenia de los AcN de ratón frente a *Leishmania infantum*

Para investigar la ontogenia de los AcN frente a *L. infantum* de ratón, se seleccionó la cepa CD1 COB por ser una cepa "outbreed" y por la disponibilidad de animales en nuestro animalario. Se obtuvo suero fresco a partir de grupos de animales (al menos 6 individuos) de 1, 7, 14 y 28 días, y 3 meses de edad. En primer lugar se analizó el contenido total de anticuerpos en el suero de cada grupo mediante un ensayo de ELISA de captura. Para ello se tapizó la placa con 50 µl de una preparación de un AcP de cabra frente a cadenas pesadas + ligeras de ratón sin marcar diluido en PBS (3 µg/ml). Tras incubar la placa (16 h, 4°C), se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS-2% BSA y se añadió a los pocillos 50 µl de distintas preparaciones de una mezcla de sueros de cada grupo diluidos al 50% en PBS. Tras incubar la placa (2 h, 37°C) se determinó la presencia en cada

suero de las inmunoglobulinas IgG e IgM de ratón con AcPs específicos para cada subclase (cadena μ o cadena γ) marcados con peroxidasa; finalmente, el ensayo se reveló con OPD.

La presencia de AcN frente a *L. infantum* en el suero de ratones de distintas edades se analizó mediante RIA. Para ello se incubaron (2 min, 37°C) promastigotes (10^7) con 100 μ l de una mezcla de suero de cada grupo de edad diluido al 50 % en PBS. Finalizadas las incubaciones, las reacciones se detuvieron con 1 ml de TL frío y se procesaron como se señaló anteriormente. Los distintos isotipos de inmunoglobulinas de ratón con reactividad frente a *L. infantum* se detectaron con AcP de cabra anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b o anti-IgG3 de ratón marcados con 125 I, finalizándose el experimento como se ha señalado anteriormente.

III.6 Análisis cinético en tiempo real de la lisis de promastigotes de *Leishmania infantum* por los sueros de individuos de distintos órdenes de mamíferos

Los cultivos de promastigotes se iniciaron por triplicado a partir de un inóculo de 10^6 células/ml, registrándose el crecimiento diariamente. Los parásitos se obtuvieron a partir de la fase logarítmica (día 4) y de la fase estacionaria temprana de crecimiento (2 días al término de la fase logarítmica ~ día 8).

La lisis de los promastigotes en tiempo real por el suero normal (SN) de los distintos individuos se determinó midiendo la incorporación de yoduro de propidio (YP) al ADN de los promastigotes muertos en un citómetro de flujo FACSCalibur™ (Becton-Dickinson) ⁴⁷. La reacción se inició añadiendo 100 μ l de SN no diluido, previamente filtrado (0,22 μ m), a una mezcla que contenía 10^5 promastigotes, 2 μ l de YP (0,5 mg/ml), y PBS hasta completar un volumen final de 200 μ l; la incubación se realizó en baño de agua a 37 °C a lo largo de toda la adquisición.

Los promastigotes se identificaron en un diagrama de puntos (“dot plot”) por su tamaño (dispersión frontal o FSC: “forward-angle light scatter”) y complejidad (dispersión lateral, o SSC: “side-angle light scatter”). La emisión del YP se recogió en el detector FL2 en la banda 585/542 nm. El detector amplificador de la intensidad de fluorescencia se ajustó entre 10^0 - 10^1 con promastigotes no tratados con suero (control negativo). El curso de la lisis se registró durante un periodo de tiempo de 204,8 s ó 512 s, con un intervalo de adquisición de 200 ms ó 500 ms, respectivamente.

Los datos obtenidos se analizaron con el software CELLQuest™ (Becton-Dickinson). La cinética de incorporación del YP a los promastigotes se obtuvo a partir de un diagrama de puntos

de FL2 frente al tiempo, dividido en 13 regiones de 15,98 s cuando la adquisición era 204,8 s, y de 39,38 s para la de 512 s. El porcentaje de promastigotes que incorporaban YP durante el tiempo de medida se cuantificó en cada región como la razón número de eventos que emitían fluorescencia del YP > 10¹/número total de eventos (promastigotes que emitían fluorescencia del YP > 10¹ + promastigotes que no la emitían). Los controles incluían: (a) máxima lisis celular en promastigotes tratados (30 min) con acetona:metanol (1:1) (control positivo); (b) SN de cada individuo analizado; (c) lisis inespecífica de promastigotes en presencia de SN al 50% tratado con EDTA-Na₂ (concentración final 10mM) (fondo).

Los tiempos en los cuales el 50% de los promastigotes de las fases logarítmica y estacionaria incorporan YP (T₅₀), se obtuvieron representando el porcentaje de promastigotes que incorporan YP en presencia de cada uno de los sueros analizados (ordenadas) frente al tiempo de incubación (abscisas). La incorporación de YP (normalizada respecto al 100 %), se analizó con la ecuación de von Krogh,

$$x = k (1-Y)^{1/n}$$

Siendo x los tiempos en los que se mide la incorporación del YP, k una constante, Y el porcentaje de promastigotes que incorporan YP a los distintos tiempos, y n una constante exponencial dependiente de las condiciones del ensayo. La expresión logarítmica de la ecuación de von Krogh se representó como log Y/1-Y (ordenadas) frente al log x (abscisas). La paralela a la abscisa desde la altura de la ordenada cuyo valor log Y/1-Y = 0, corta a la recta de regresión en un punto; desde éste, la perpendicular a la abscisa (log x) determina el punto T₅₀ que corresponde al tiempo (en minutos) en el cual el 50% de los promastigotes incorpora YP.

IV. Resultados

IV.1 Activación del sistema del complemento de ratón

IV.1.1 Cinética de opsonización de los promastigotes por C3

Al contactar los promastigotes con el suero no inmune del ratón se activan las tres vías de iniciación del sistema del complemento: la vía clásica, la vía alternativa, y la vía de la lectina (MBL), las cuales confluyen en la formación de la enzima C3 convertasa que digiere el componente C3 en C3a y C3b.

No existen en la actualidad datos experimentales que describan el mecanismo de activación del sistema del complemento del suero de ratón por promastigotes del género *Leishmania*. Como primer paso para su caracterización, se analizó la cinética de deposición de C3 en la superficie del parásito a partir del SNR durante los 15 minutos que siguen a la interacción del parásito con el suero. La activación del complemento por las vías clásica y de la lectina se analizó en presencia de SNR diluido al 50%; la activación de la vía alternativa se realizó en SNR diluido al 50% suplementado con 10 mM EGTA- 7 mM $MgCl_2$. El C3 depositado en la superficie del promastigote se detectó con el AcM SIM 161 conjugado a Cy-5 (en ensayos de CF), o marcado con ^{125}I (en ensayos de RIA).

En la **Figura 5** se observa que la deposición de C3 en la superficie del promastigote es muy rápida, y cómo el 80% del C3 se deposita durante los dos primeros minutos de opsonización. A partir de este instante, el porcentaje de C3 unido se mantiene constante hasta el final de la incubación. La fijación de C3 a promastigotes opsonizados con suero suplementado con EGTA-Mg (vía alternativa), retrasa su inicio entre 1 y 2 minutos respecto a la vía clásica, de tal modo que durante el primer minuto de incubación el C3 activado por la vía alternativa apenas alcanza el 10% del depositado por la vía clásica. Los valores del C3 unido se normalizaron y se analizaron con la ecuación de von Krogh para comparar el tiempo que tarda en depositarse el 50% del C3 (T_{50}) por ambas vías. Los resultados obtenidos fueron $T_{50} = 0,63$ minutos para la vía clásica, y $T_{50} = 4,6$ min para la vía alternativa.

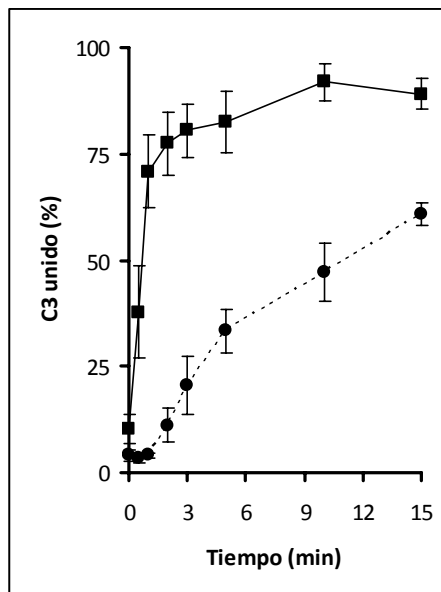


Figura 5. Curso de la deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum*. Los promastigotes (10^7) se incubaron con SNR al 50% ■, o con SNR al 50 % suplementado con 10 mM EGTA-7 mM MgCl₂ ● durante los tiempos: 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 minutos. Tras la incubación, el C3 unido a los promastigotes se determinó con el AcM SIM 161 marcado con Cy-5 (citometría), o conjugado a ¹²⁵I (RIA). Como control negativo se midió la fijación de C3 a los promastigotes durante 15 minutos en presencia de SNR al 50% suplementado con 10 mM EDTA. Los datos corresponden a la media ± E.E. de los valores obtenidos en cuatro experimentos independientes

IV.1.2 Determinación del número de moléculas de C3 depositadas por activación de la vía clásica del complemento

Los datos mostrados en la **Figura 5** indican que el C3 depositado en el promastigote se genera por activación inicial de la vía clásica. Con el fin de cuantificar el número de moléculas de C3 depositadas por célula, los promastigotes se opsonizaron en SNR diluido al 50% durante 3 minutos a 37°C, y el número de moléculas de C3 fijadas al parásito se cuantificó en experimentos de saturación en el equilibrio. El C3 depositado se midió con el AcM [¹²⁵I]-SIM 161. En el equilibrio, la relación estequiométrica de la interacción C3:antiC3 puede variar entre 1:1 y 2:1, dependiendo del número de paratopos del SIM 161 que se unen al C3 depositado en el promastigote. En las condiciones experimentales de éste estudio, se ha supuesto que la estequiometría de la interacción era 1:1.

Tras la yodación del AcM SIM 161, se calculó su fracción funcional ($F = 45\%$) y la actividad específica (a.e. = $1,6 \times 10^7$ cpm/ μg de proteína) según se describe en el apartado III.3.1.a. La cuantificación de C3 se llevó a cabo incubando los promastigotes opsonizados con una serie de concentraciones crecientes del AcM [^{125}I]-SIM 161 hasta alcanzar la saturación. La **Figura 6 (A-B)** muestra la isoterma de saturación de los promastigotes con el AcM [^{125}I]-SIM 161 (**Fig.6-A**), y la representación de dichos datos por el procedimiento de Scatchard (**Fig.6-B**). El número de moléculas de C3 depositadas por promastigote de *L. infantum* en 3 minutos de opsonización con SNR se calculó en 330.000.

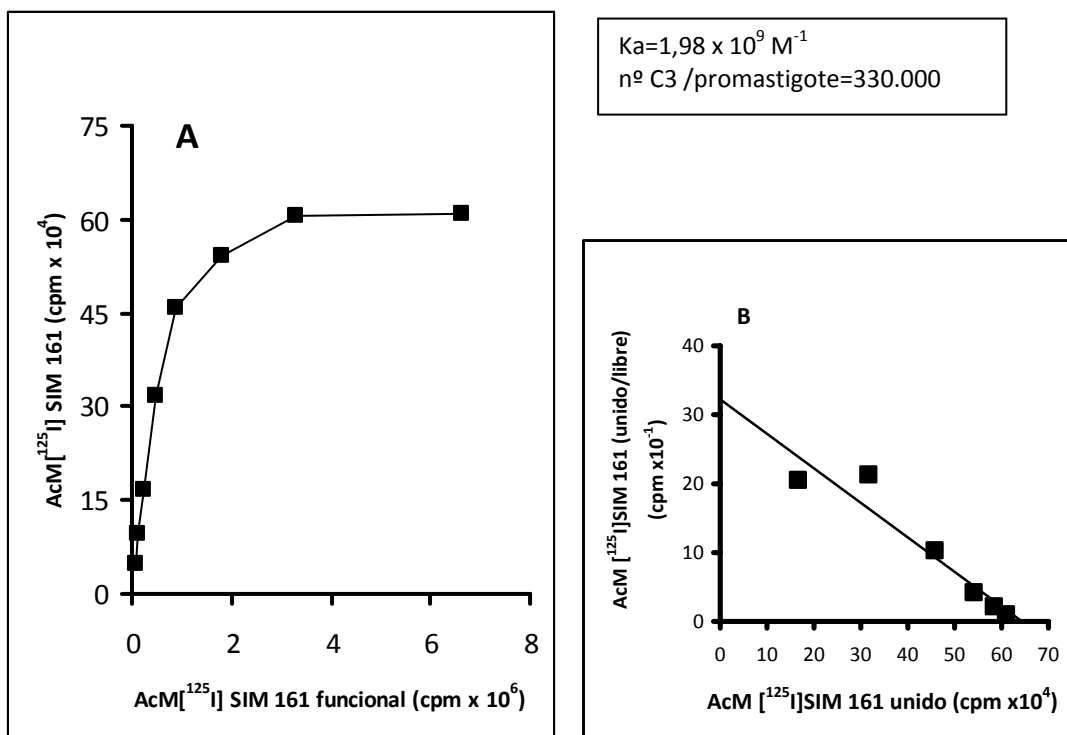


Figura 6 (A-B). Cálculo del número de moléculas de C3 que se unen por promastigote de *L. infantum* tras la opsonización con SNR. 6-A: Isoterma de saturación de los promastigotes opsonizados de *L. infantum* con el AcM [^{125}I]-SIM 161; 6-B: Transformación lineal por el método de Scatchard según Ways-Parham, de los datos mostrados en 4.2-A. K_a = constante de asociación del AcM [^{125}I]-SIM 161. Los datos corresponden a un experimento representativo de los tres que se realizaron.

IV.1.3 Cinética de unión de C1q y C4

El hecho de que entre el 75% y el 80% del C3 unido al promastigote se depositara en los dos primeros minutos de incubación, sugería que la activación del complemento tenía lugar por una de las dos vías rápidas: la vía clásica o la vía de la lectina. La activación de la vía clásica del complemento se examinó analizando la deposición de C1q y C4 en promastigotes incubados a 37°C con SNR diluido al 50% durante 10 minutos. A los tiempos indicados en la **Figura 7**, se midió la unión de los componentes C1q y C4 a la superficie de los parásitos con los AcM [¹²⁵I]-SIM 187 anti-C1q, e [¹²⁵I]-Rm C7H8 anti-C4. Ambas cinéticas de deposición son muy rápidas, alcanzando sus máximos respectivos tras 15 s (C1q) y 40 s (C4) de reacción. A partir de entonces, el porcentaje de C1q unido decrece bruscamente estabilizándose en valores próximos al 25% del unido inicialmente; por su parte, el C4 unido disminuye en un 25-30%. A partir del minuto de incubación, los porcentajes de C1q y de C4 que permanecen unidos se mantienen constantes durante el resto del ensayo.

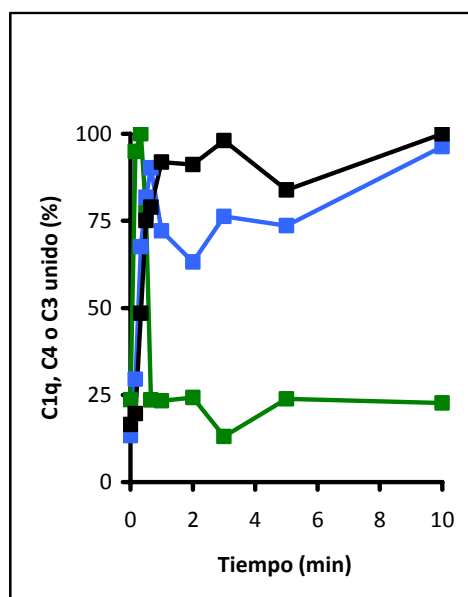


Figura 7. Cinética de fijación de los componentes C1q (■), C4 (■) y C3 (■) del complemento del ratón a promastigotes de *L. infantum*. Los promastigotes (10^7) se opsonizaron con SNR diluido al 50% durante 10 min. a 37°C. A los tiempos indicados, las moléculas de C1q, C4 y C3 depositadas en los promastigotes se detectaron con los AcM [¹²⁵I]-SIM 187, [¹²⁵I]-Rm C7H8 y [¹²⁵I]-SIM 161, respectivamente. Los datos representan la media de los valores obtenidos en dos experimentos realizados por triplicado.

Dada la naturaleza hexamérica del C1q no se podía descartar que su veloz cinética de unión a los promastigotes se debiera a interacciones inespecíficas con la superficie del parásito, y no el resultado de la activación de la vía clásica del complemento. Para descartar esta posibilidad, se realizó un ensayo incubando los promastigotes durante 2 minutos (con objeto de medir la activación de la vía clásica) y 15 minutos (para medir la activación de ambas vías, la clásica y la alternativa) con alícuotas de SNR diluido al 50% suplementado con leupeptina a distintas concentraciones en el rango de 0,5 mM hasta 10 mM. Dado que la leupeptina inhibe la actividad serina proteasa de la subunidad C1s responsable de la proteólisis del C4, este tratamiento bloquea la activación de la vía clásica del complemento y la deposición de C3. Tras la incubación, el C3 depositado se detectó con el AcM [¹²⁵I]-SIM 161.

La **Figura 8** muestra la inhibición de la fijación de C3 a los promastigotes incubados durante 2 minutos con el SNR tratado con leupeptina, y cómo el grado de inhibición es función de la concentración de leupeptina en el ensayo. Por el contrario, el C3 fijado a los parásitos opsonizados durante 15 minutos solo disminuye en un 25% respecto al depositado por el suero no tratado con leupeptina, valor similar al del C3 que se une por activación de la vía alternativa. Este resultado indica que la activación del complemento por promastigotes de *L. infantum* tiene lugar a través de la vía clásica.

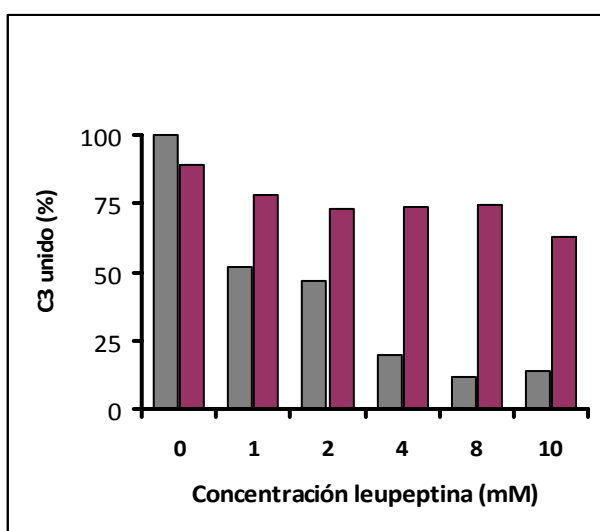


Figura 8. Efecto de la leupeptina sobre la deposición de C3 en los promastigotes de *L. infantum*. Los parásitos (10^7) se incubaron (37°C) durante 2 (■) y 15 min (■) con SNR al 50% tratado con las concentraciones de leupeptina indicadas en la leyenda. El C3 depositado se determinó con el AcM [¹²⁵I]-SIM 161.

El resultado de la **Figura 7** sugería que el C1q, tras su fijación inicial al promastigote, podía liberarse de la superficie del parásito. Hipotetizamos que no era ésta la causa, sino que los epítomos del C1q reconocidos por el AcM SIM 187 eran enmascarados por otros componentes de la vía clásica (C4, C2, C3) que se depositan sobre el C1 unido inicialmente. Por tanto, inhibiendo la activación de las serina proteasas C1r y C1s de la vía clásica con leupeptina se podría detectar el C1q fijado al principio de la incubación. Como se observa en la **Figura 9**, el C1q fijado a los promastigotes opsonizados con SNR al 50% tratado con leupeptina (5 mM) experimenta un descenso de $\leq 25\%$ a los 30 segundos de iniciada la incubación, y se mantiene invariante durante el resto del experimento. Por el contrario, el C1q unido a los promastigotes opsonizados con SNR sin leupeptina disminuye hasta en un 60% del depositado inicialmente, de modo análogo a lo que se observa en la **Figura 7**.

Este resultado sugiere que la deposición secuencial de los componentes de la vía clásica: C4, C2, C3, enmascara los epítomos del C1q reconocidos por el AcM SIM 187, y es causante de la disminución de la señal a partir de los 30 s de activarse la vía clásica.

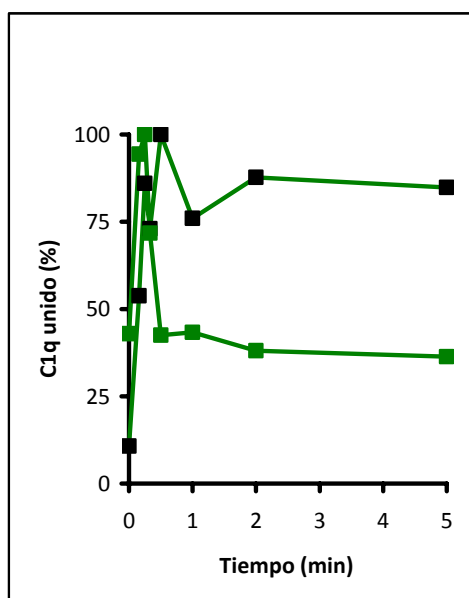


Fig. 9. Efecto del tratamiento del SNR con leupeptina en la cinética de deposición de promastigotes de *L. infantum*. Los promastigotes (10^7) se incubaron con SNR diluido al 50% (■) o bien con SNR diluido al 50% y suplementado con 5 mM leupeptina (■). El C1q unido se midió con el AcM [125 I]-SIM 187. Los datos corresponden a la media de dos experimentos realizados por triplicado.

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que la activación del sistema del complemento del ratón por promastigotes de *L. infantum* se producía a través de un mecanismo que por su rapidez se correspondía bien con la vía clásica, o con la de la lectina. Los activadores

universales de la vía clásica son los anticuerpos, y el de la vía de la lectina la proteína MBL. Por ello, investigamos la interacción de cada una de estas moléculas con el promastigote, y su papel en la activación del complemento.

IV.2 Anticuerpos naturales de ratón frente a *Leishmania infantum*

IV.2.1 Determinación del título e isotipo de los anticuerpos naturales

La presencia de AcN frente a *L. infantum* en el suero normal de ratón se detectó incubando los promastigotes con SNR diluido seriadamente (\log_2). Tras la incubación, los AcN unidos a los promastigotes se detectaron con antiglobulina de cabra específica para los isotipos IgG e IgM del ratón marcada con ^{125}I (RIA) o con FITC (citometría). En la **Figura 10** se muestra el título e isotipo de los AcN IgM e IgG anti-*Leishmania* presentes en el SNR. Se observa una rápida y gradual disminución del título con la dilución del suero; a la dilución 1/64 ($\log_2 = 6$) el título de anticuerpos disminuye un 90% con respecto al original.

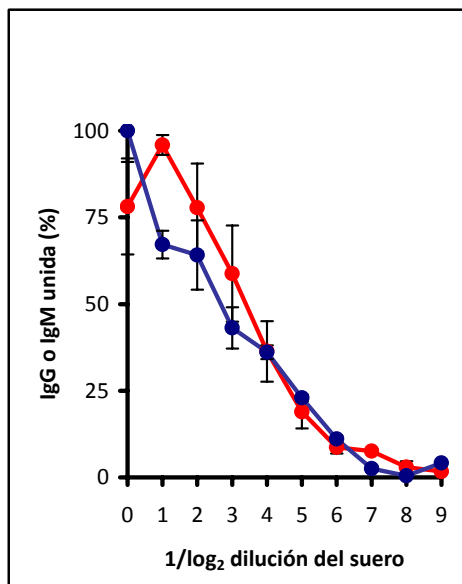


Figura 10. Título de AcN IgG (●) e IgM (●) frente a *L. infantum* en el SNR. Los datos \pm E.E. proceden de tres experimentos independientes realizados con mezclas de sueros de distintos ratones.

IV.2.2 Cinética de fijación de los AcN a promastigotes de *Leishmania infantum*

El curso de la interacción de los AcN con los promastigotes se determinó opsonizando los parásitos con SNR en condiciones próximas a las fisiológicas (37°C, y SNR diluido al 50%) durante

distintos tiempos (0-10 minutos). Finalizadas las incubaciones, los AcN unidos a los promastigotes se detectaron con antiglobulina de cabra según se indica en el apartado III.4. La unión de los AcN a los promastigotes fue muy rápida, y en el momento en que el parásito contactó con el suero (tiempo cero), entre el 25% y el 50% del total de inmunoglobulinas que fijan los promastigotes ya se habían unido a los parásitos. El máximo de unión se alcanzó en el primer minuto de incubación, y durante los dos minutos siguientes el porcentaje de AcN unidos disminuyó entre un 20% y un 30%; posteriormente, el grado de AcN unidos permaneció constante. La unión de los AcN de ambos isotipos siguió un curso paralelo, siendo algo más rápido el de la IgM ($t_{\max} \sim 30$ s) que el de la IgG ($t_{\max} \sim 60$ s). Este resultado confirma que los promastigotes de *L. infantum* tras el contacto con el SNR (o con la sangre) se opsonizan de manera casi inmediata por AcN IgM e IgG anti-*Leishmania*.

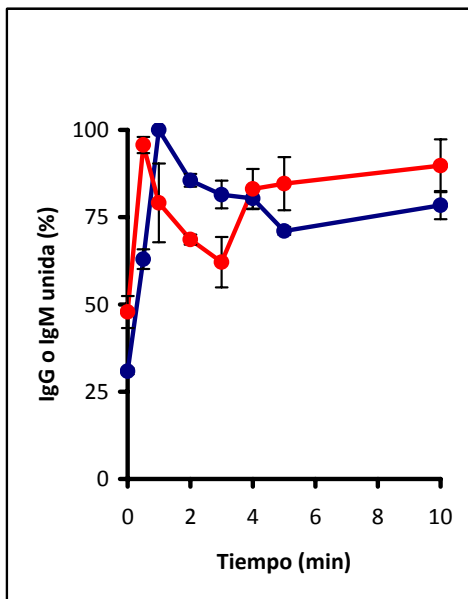


Figura 11. Cinética de unión de AcN IgM (●) e IgG (●) del SNR a promastigotes de *L. infantum*. La figura muestra el porcentaje de IgM e IgG unido a los psrósitos a los distintos tiempos de opsonización, normalizado con respecto al máximo de unión de cada isotipo. Los valores \pm E.E. se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes

IV.3 Ontogenia del mecanismo de opsonización de los promastigotes de *Leishmania infantum* por anticuerpos naturales

La presencia de AcN frente a *Leishmania* en el SNR sugiere que dichos anticuerpos desempeñan un papel en la resistencia natural del ratón frente a una hipotética invasión del parásito. Por ello, se consideró interesante dilucidar en que momento de la ontogenia del ratón dichos AcN eran funcionales. Se investigó la presencia de AcN anti-*Leishmania* en el suero normal

de individuos de 1, 7, 14, 28, 42 y ≥ 90 días de edad de la cepa CD1 COB. Los valores obtenidos en los animales de ≥ 3 meses se tomaron como dato de referencia de individuos jóvenes adultos.

En primer lugar se determinó el contenido total de anticuerpos del SNR (que incluyen todo el repertorio de reactividades) de las clases IgM e IgG por ELISA directo utilizando para la captura AcPs de cabra específicos para IgM e IgG de ratón. Los datos de la **Figura 12**, denotan la ausencia de anticuerpos de isotipo IgM en el suero de ratones neonatales (1 día de edad); por el contrario, los de isotipo IgG alcanzaban una concentración próxima al 25% de la que poseen los individuos jóvenes adultos. La concentración de los anticuerpos IgG aumentó progresivamente con la edad (ratones de 1, 7, y 14 días), aunque entre los 14 y los 42 días se observó una disminución de los mismos como reflejo del “bache fisiológico”. A partir de ese momento, la concentración sérica de IgG aumentó progresivamente alcanzando los niveles adultos alrededor de los tres meses.

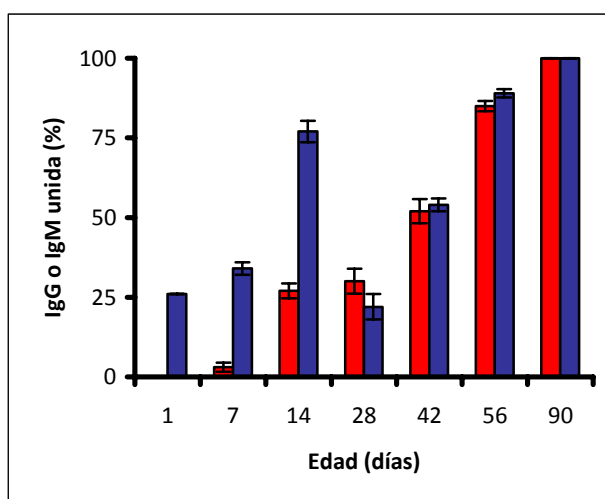


Figura 12. Anticuerpos IgM e IgG en el suero normal de ratones de distintas edades. El contenido de inmunoglobulinas totales de las clases IgM (■) e IgG (■) se determinó mediante ELISA de captura para cada grupo en una mezcla de sueros de al menos seis individuos diluida al 50%. Los valores \pm E.E. proceden de 3 experimentos independientes

La presencia en el SNR de AcN anti-*Leishmania* de clase IgM y de las diferentes subclases de IgG, se determinó incubando (37°C, 2 minutos) los promastigotes con los sueros de grupos de individuos de distintas edades; los AcN unidos se detectaron con AcPs de cabra marcados con ¹²⁵I antiisotipo M, G1, G2a, G2b, y G3. En la **Figura 13**, se puede constatar la práctica ausencia de anticuerpos IgM frente a *L. infantum* en el suero de ratones durante la primera semana de vida. También se observa que entre los días 1 y 28, las subclases de IgG predominantes en la opsonización son IgG1 e IgG3, y están presentes, pero con menor reactividad, los AcN IgG2a e IgG2b. Alrededor de las tres semanas, los AcN IgG1 e IgG3 experimentaron un brusco descenso, observándose un aumento paralelo durante la segunda semana de la reactividad de IgM, IgG2a e IgG2b. En ratones adultos la mayor reactividad la encontramos asociada a IgM e IgG3, y también, aunque en menor medida, a IgG2b.

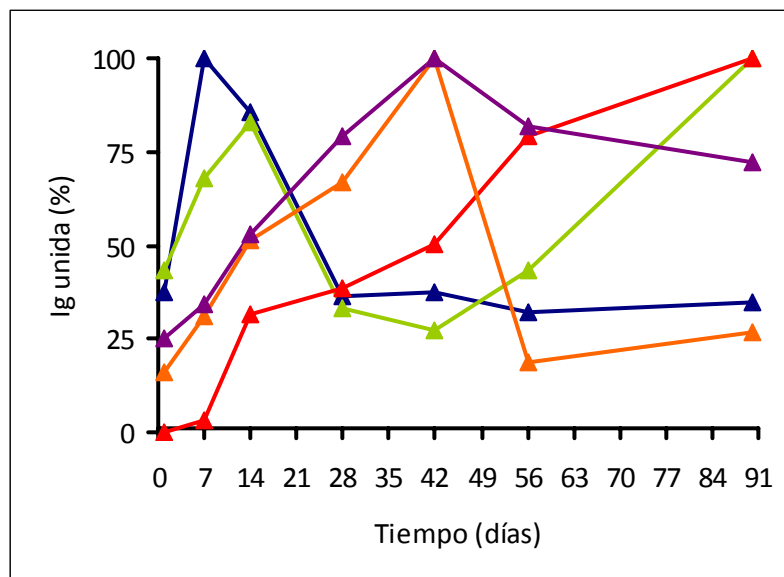


Figura 13. Ontogenia de los AcN frente a *Leishmania* en el ratón. Los parásitos (10^7) se incubaron (2 min, 37°C) con SNR procedente de ratones CD COB de 1, 7, 14, 28, 42, 56 días, o adultos mayores de 3 meses (90 días) diluidos al 50%. La fijación de AcN frente a *L. Infantum* de los distintos isotipos de inmunoglobulinas de ratón se midió en RIA con AcPs de cabra antiisotipos IgM (▲), IgG1 (▲), IgG2a (▲), IgG2b (▲) e IgG3 (▲) marcados con ¹²⁵I.

IV.4 Función de los anticuerpos naturales anti-*Leishmania* en la activación de la vía clásica del complemento

Los resultados mostrados hasta el momento indican que la interacción de los AcN del SNR con los promastigotes es muy rápida. El hecho de que la molécula de anticuerpo sea el principal activador de la vía clásica, indujo a investigar su papel en el desencadenamiento del mecanismo activante.

IV.4.1 Activación de la vía clásica del complemento de ratón en promastigotes opsonizados con suero de ratones neonatos

Para determinar la clase de inmunoglobulina (IgG o IgM) responsable de la activación del complemento por los promastigotes, se utilizó suero de individuos neonatos (un día de edad) que carecen de anticuerpos IgM.

Al incubar promastigotes de *L. infantum* con SNR neonato diluido al 50% en PBS durante 2 minutos, se observó que la fijación del C3 era apenas un 10% menor que la obtenida con SNR, y similar al porcentaje de C3 que se deposita tras 10 min de incubación que mide la deposición conjunta por las vías clásica y alternativa. Este resultado indica que la ausencia de IgM en el suero apenas afecta la activación de la vía clásica del complemento de ratón durante la opsonización del promastigote, y sugiere que pudieran ser las inmunoglobulinas de clase IgG las responsables de la activación.

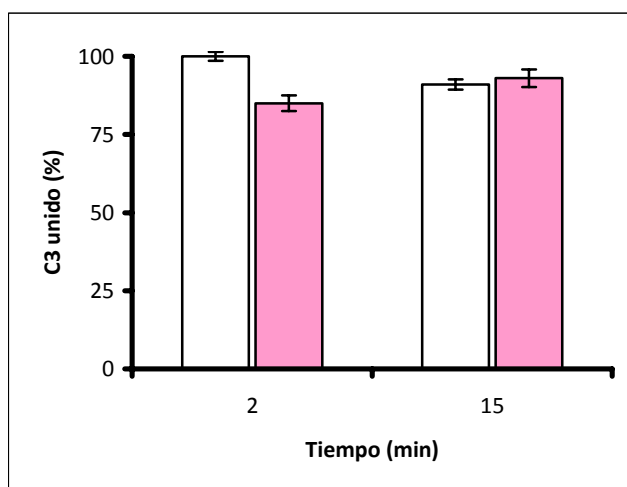


Figura 14. Deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SNR procedente de ratones CD1COB adultos o neonatos. Los promastigotes (10^7) se incubaron con SNR adulto □ o SNR neonato ■ durante 2 y 15 minutos. Tras la incubación, el C3 unido a los promastigotes se determinó con el AcM SIM 161 conjugado a 125 I (RIA). Los datos corresponden a la media \pm EE de tres experimentos realizados.

IV.4.2 Activación de la vía clásica del complemento por promastigotes opsonizados con suero carente de anticuerpos IgM e IgG

Para obtener suero de ratón carente de AcN IgM e IgG frente a *L. infantum* (SRAds), se adsorbió SNR con promastigotes de *L. infantum*. El efecto de la adsorción del suero sobre la deposición de los AcN y del C3 en los promastigotes se muestra en la Figura 15 (A-B). En presencia de SRAds, la fijación de IgM a los promastigotes se redujo al 7%, y la de IgG al 18% del título original (**Figura 15-A**). Para reconstituir el SRAds con AcN, los anticuerpos IgG e IgM se aislaron adsorbiendo el SNR con HiTrap Protein A y HiTrap-IgM, respectivamente.

Los promastigotes se preincubaron con una mezcla de los anticuerpos IgM e IgG así obtenidos, y a continuación se incubaron con el SRAds. La deposición de C3 en los promastigotes se midió tras dos minutos (vía clásica) y 10 minutos (vía alternativa) de incubación. Como se observa en la **Figura 15-B**, la deposición de C3 a los 2 minutos no se recuperaba al añadir al SRAds la mezcla de inmunoglobulinas. Presumiblemente, la adsorción del SNR con los promastigotes produce la pérdida de un componente, distinto de los anticuerpos, que es necesario para que se dispare la vía clásica del complemento.

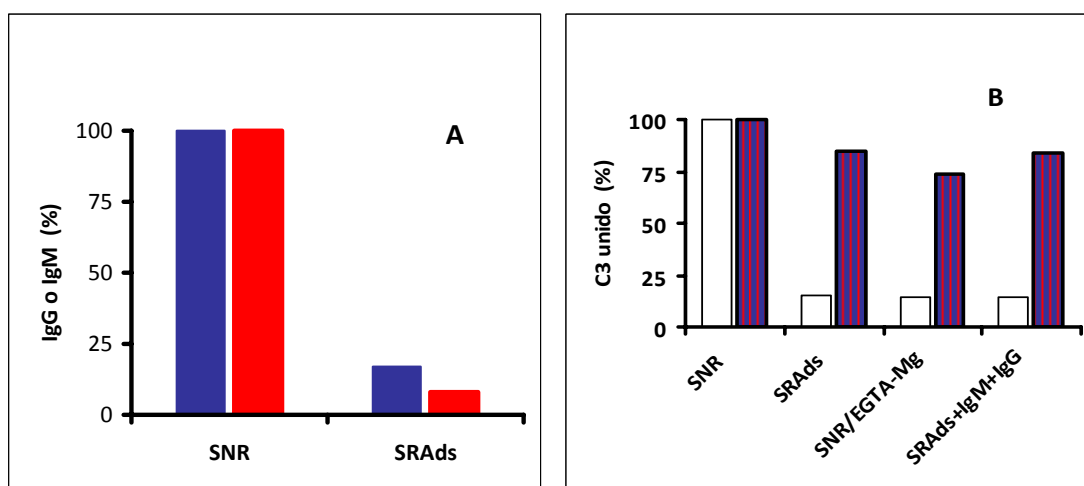


Figura 15 (A-B). Efecto de la adsorción del SNR con promastigotes de *L. infantum* sobre la fijación de AcN IgM e IgG, y la deposición de C3 en los parásitos. Los parásitos (10^7) se incubaron (Fig. 15-A) durante 2 minutos con SNR o con SRAds, y los anticuerpos unidos al parásito se detectaron con AcPs de cabra marcados con 125 I antiisotipo IgG ■ o IgM ■ (RIA), o (Fig. 15-B) con SNR, SRAds, SNR tratado con EGTA-Mg, o SRAds suplementado con una mezcla equimolar (50 μ g/ml) de anticuerpos IgM + IgG, durante 2 □ ó 15 minutos ■. El C3 unido se detectó con el AcM SIM 161 conjugado a 125 I (RIA). Todos los sueros se utilizaron diluidos al 50% en PBS. Los datos corresponden a un experimento representativo de los tres que se realizaron con tres adsorciones diferentes.

Para abordar estos interrogantes se utilizó un modelo murino de animales genéticamente manipulados, C57BL/6. μ KO y C57BL/6. RAG2^{-/-}, los cuales no sintetizan anticuerpos; nos referiremos a sus sueros como SR μ .KO (ratones C57BL/6. μ KO) y SRRAG2^{-/-} (ratones C57BL/6. RAG2^{-/-}).

Tras comprobar que los sueros de estos individuos carecían de inmunoglobulinas, se analizó la fijación de C3 en promastigotes opsonizados por SNR y por suero de ratones sin anticuerpos. El curso de la deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SR μ .KO, SRRAG2^{-/-}, o SNR de la cepa C57BL/6, se muestra en la **Figura 16**, donde se observa que las cinéticas son similares en los parásitos opsonizados con los tres sueros, aunque la fijación de C3 correspondiente al SNR muestra un ligero retraso con respecto a las otras dos. En los tres casos, la velocidad de la vía rápida permaneció inalterada.

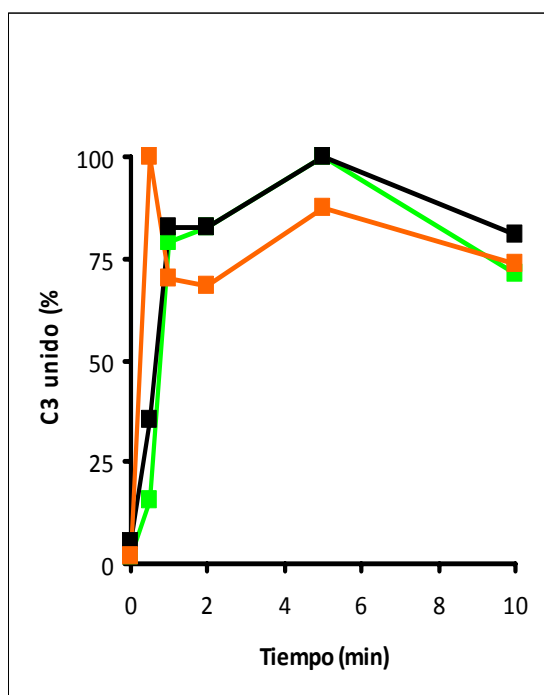


Figura 16. Cinética de fijación de C3 a promastigotes de *L. infantum* opsonizados con suero normal de ratón y con suero de ratones carentes de anticuerpos. Los promastigotes (10^7) se incubaron (37°C) en series paralelas bien con SNR (■), con SR μ .KO (■) o con SRRAG2^{-/-} (■) diluidos al 50% con PBS. La reacción se detuvo por tratamiento con 1% de paraformaldehído en PBS, y el C3 depositado se determinó por citometría de flujo con el AcM SIM 161-Cy-5. El porcentaje de C3 unido a los distintos tiempos está normalizado con respecto al máximo de fijación de C3 obtenido en cada grupo. Los datos corresponden a la media \pm EE de tres experimentos realizados.

IV.5 Función de la lectina MBL en la activación de la vía rápida del complemento de ratón por promastigotes de *Leishmania infantum*

Para determinar si la lectina que fija manosa (MBL) era responsable de la activación de la vía rápida de deposición de C3, se procedió a eliminar del suero SR μ .KO la MBL por inmunoadsorción en una columna de mananos de *Saccharomyces cerevisiae* conjugados a Sepharosa. Como control del ensayo se incubaron SNR y SR μ .KO con esferas de Sepharosa sin ligando acoplado. El filtrado de la columna de Sepharosa-mananos se concentró hasta su volumen inicial, y el título de MBL en el suero adsorbido se valoró mediante ELISA indirecto frente a mananos. La proteína MBL del suero SR μ .KO y del suero SR μ .KO adsorbido con los mananos (SR μ .KO/AdsMBL), se detectó con una mezcla de AcM de rata anti-MBL-A y anti-MBL-C de ratón. Como control positivo se utilizó el eluido de la columna de Sepharosa-mananos (*apartado III.2.10*). Como se observa en la **Figura 17**, el paso de los sueros SNR y SR μ .KO por la columna de Sepharosa-mananos determina una disminución del 90 % del título de la MBL en relación con los sueros no adsorbidos.

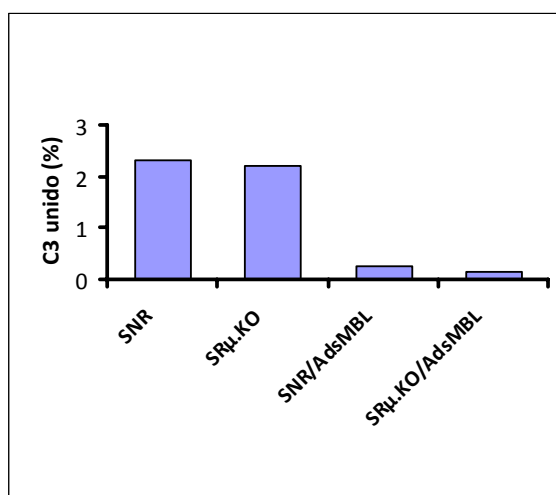


Figura 17. Eliminación de la lectina MBL del SNR y del SR.KO tras la adsorción con Sepharosa-mananos. La actividad MBL ■ de los sueros se analizó por ELISA indirecto en placas tapizadas con mananos. La proteína MBL unida se detectó con una mezcla de AcM de rata frente a MBL-A y MBL-C de ratón, y como anticuerpo secundario se utilizó el AcM MAR 18 biotinilado. Los datos corresponden a un experimento representativo de los dos que se realizaron. La MBL eludía de la columna de Sepharosa-mananos (control positivo) generó una $A_{492nm} > 3,0$.

Una vez comprobado que los sueros adsorbidos con Sepharosa-mananos carecían de MBL, se investigó si los promastigotes incubados con el suero SR μ .KO/AdsMBL activaban el complemento por la vía rápida (clásica). Para ello, se incubaron (37°C) promastigotes de *L. infantum* durante 2 y 15 minutos con SR μ .KO o SR μ .KO/AdsMBL, y se determinó la deposición de C3 en los promastigotes. El resultado (**Figura 18**), muestra que la ausencia de MBL en el SR μ .KO no alteraba apreciablemente la deposición de C3 tras 2 o 15 minutos de incubación. La ligera disminución (~ 15%) del C3 unido se debe, presumiblemente, a la pérdida de actividad del complemento por efecto inespecífico de la adsorción, ya que el SR μ .KO incubado con esferas de Sepharosa no acopladas con mananos produjo un resultado similar.

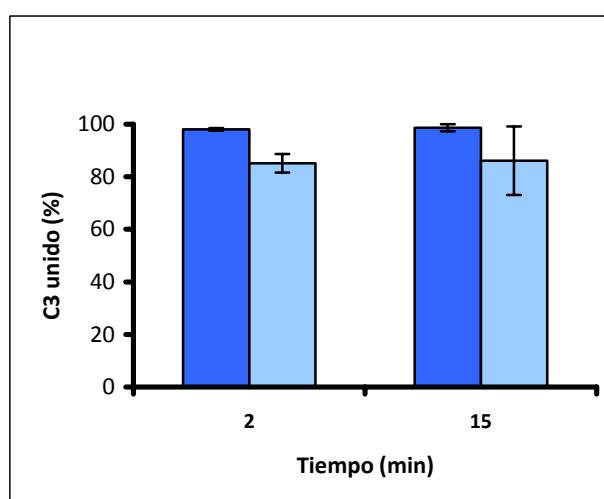


Figura 18. Deposición de C3 en promastigotes opsonizados con SR μ .KO o con SR μ .KO/AdsMBL. Los promastigotes (10^7) se opsonizaron con SR μ .KO (■) o SR μ .KO/AdsMBL (□) durante 2 y 15 minutos a 37°C, y el C3 unido a los promastigotes se detectó con el AcM [125 I]-SIM 161. Se realizaron tres experimentos con sueros procedentes de dos adsorciones distintas.

Los resultados obtenidos indican que la MBL no desempeña una función relevante en la activación rápida de la vía del complemento por los promastigotes. El análisis conjunto de los resultados mostrados en las **Figs. 14, 15-B, 16 y 18**, sugiere que existe una vía de activación de la vía clásica del complemento del ratón independiente de la proteína MBL y de los AcN. El hecho de que la actividad que promueve la deposición rápida de C3 en los promastigotes se pierda tras la adsorción con los parásitos sugiere que dicho factor pudiera ser la subunidad C1q del componente C1 de la vía clásica.

IV.6 Función de la subunidad C1q del componente C1, en la activación de la vía clásica del complemento de ratón por promastigotes de *Leishmania infantum*

En primer lugar, se comprobó que la proteína C1q se fijaba a los promastigotes tras 30 s de incubación con SNR o con SR μ .KO, dato que se muestra en la **Figura 19**.

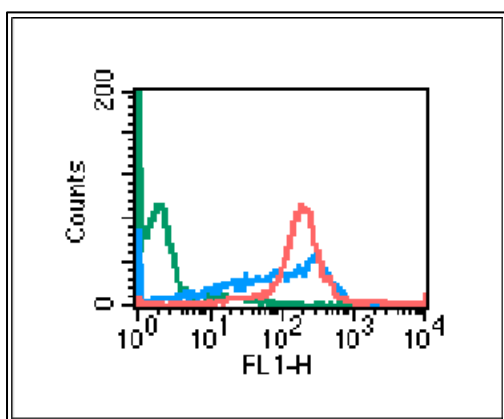


Figura 19. Fijación de C1q a promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SNR o SR μ .KO. Los promastigotes (10^7) se incubaron (30 s, 37°C) con SNR (---), SR μ .KO (---) ambos diluidos al 50% con PBS o con PBS (---). Tras la incubación el C1q unido se detectó con el AcM SIM 187 marcado con FITC.

Tras comprobar que el C1q se unía con gran rapidez a los parásitos, se analizó si la activación de la vía clásica del complemento en los promastigotes opsonizados con suero SR μ .KO era dependiente de la fijación de C1q. Para ello, se procedió a eliminar el C1q del suero SR μ .KO adsorbiéndolo con una columna de Sepharosa-IgGR-CAIgGR. Tras la adsorción, el filtrado, que denominaremos SR μ .KO/AdsC1q, se concentró hasta igualar el volumen de la muestra original, y el C1q retenido en el adsorbente se eluyó con 1M NaCl. Las fracciones conteniendo la proteína eluída se juntaron y se incubaron con esferas de Sepharosa-proteína G para eliminar las inmunoglobulinas contaminantes.

La eficacia de la adsorción y la presencia de C1q funcional en el eluído, se determinó con el AcM [125 I]-SIM 187, midiendo la fijación de C1q a promastigotes opsonizados (37°C, 40 s) con SR μ .KO, con SR μ .KO/AdsC1q, y con el eluído de la columna de Sepharosa-IgGR-CAIgGR (**Figura 20**).

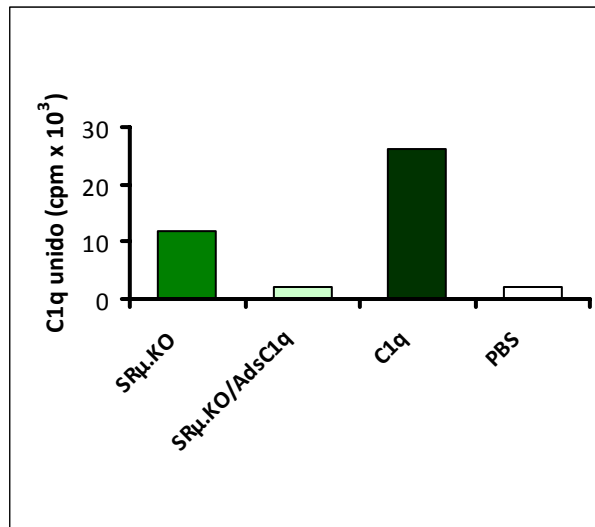


Figura 20. Fijación de C1q a promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SRμ.KO, SRμ.KO/AdsC1q, y C1q aislado. Los promastigotes (10^7) se incubaron (37°C , 40 s) con 100 μl de cada una de las siguientes preparaciones: SRμ.KO ■, SRμ.KO/AdsC1q ■, C1q purificado ($7\mu\text{g}$) ■, o PBS □. Tras la incubación, el C1q unido se determinó con el AcM [^{125}I]-SIM 187. Los datos corresponden a un experimento representativo de cinco realizados con SRμ.KO/AdsC1q, obtenido en tres adsorciones independientes.

Una vez comprobado el correcto funcionamiento de la inmuoadsorción, se investigó si el C1q aislado era capaz de iniciar la deposición de C3 en promastigotes opsonizados (37°C) durante 2 y 15 min con SRμ.KO/AdsC1q, o con SRμ.KO/AdsC1q suplementado con el C1q aislado por la columna de Sepharosa-IgGR-CAIgGR. Como indicador de la activación de la vía alternativa se utilizó SRμ.KO suplementado con EGTA-- MgCl_2 (SRμ.KO/EGTA-Mg). El C3 fijado a los promastigotes se determinó con el AcM [^{125}I]-SIM 161.

La **Figura 21**, muestra que la máxima deposición de C3 tras dos minutos de incubación se obtenía en los promastigotes opsonizados en presencia de SR.μKO, mientras que la unión de C3 a partir del SRμ.KO/AdsC1q y del SRμ.KO/EGTA-Mg era del 10% y del 25% de dicho máximo, respectivamente. Sin embargo, al suplementar el SRμ.KO/AdsC1q con C1q exógeno, se recuperaba la práctica totalidad del C3 depositado en los promastigotes en presencia SR.μKO (control positivo), tanto si la opsonización se realizaba en dos como en quince minutos. Finalmente, la deposición de C3 por la vía alternativa (15 minutos) a partir del SRμ.KO/EGTA-Mg alcanzaba al 70%-75% del unido en presencia de SRμ.KO.

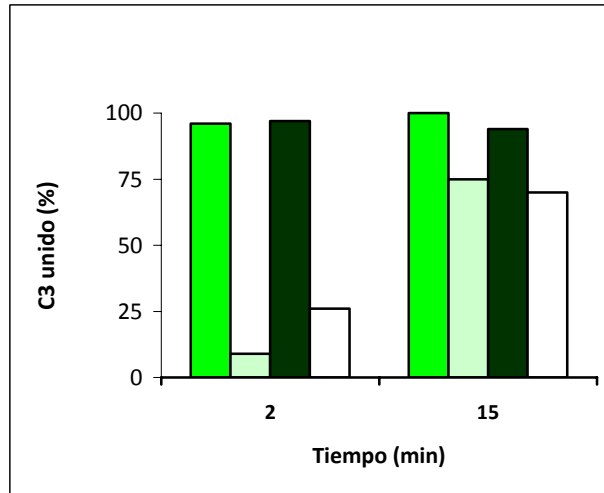


Figura 21. Deposición de C3 en promastigotes de *L. infantum* opsonizados con suero carente de anticuerpos, suero carente de anticuerpos y de C1q y suero carente de anticuerposy C1q, y suplementado con C1q.. Los promastigotes (10^7) se incubaron (37°C) durante 2 y 15 minutos con $100\ \mu\text{l}$ de suero diluido al 50% perteneciente a: SRμ.KO ■, SRμ.KO/AdsC1q ■; SRμ.KO/AdsC1q+C1q ($7\ \mu\text{g}$) ■, y SRμ.KO/EGTA-Mg □. Tras las incubaciones, el C3 depositado se determinó con el AcM [^{125}I]-SIM 161. Los datos corresponden a un experimento representativo de los tres que se realizaron.

Como se demostró anteriormente, en el SNR existen AcN anti-*Leishmania*, por lo que consideramos de interés determinar si la presencia de los AcN afectaba a la cantidad de C1q que se deposita en la superficie de los promastigotes. Para ello, se opsonizaron los promastigotes durante 1 min con C1q en presencia o en ausencia de una mezcla equimolecular de IgM e IgG aisladas. Como se observa en la **Figura 22**, la deposición de C1q en presencia de las inmunoglobulinas aumenta sinérgicamente la cantidad de C1q depositada en los promastigotes.

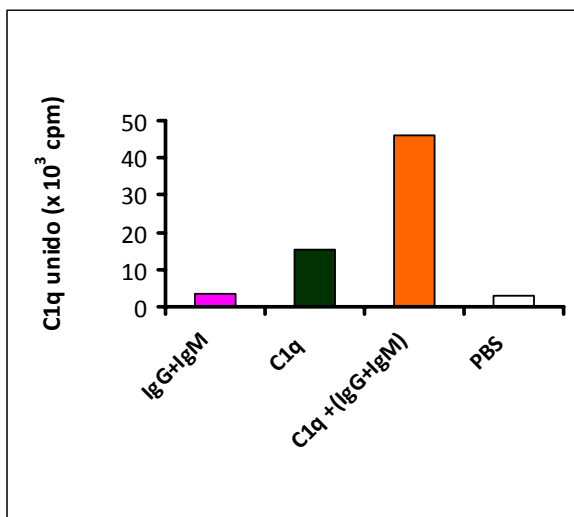


Figura 22. Aumento de la deposición de C1q en la superficie de los promastigotes en presencia de AcN anti-*Leishmania*. Los promastigotes (10^7) se incubaron a 37°C durante 1 min con: a) $20\ \mu\text{g}$ de una mezcla equimolar de IgG e IgM purificadas ■; b) $7\ \mu\text{g}$ de C1q purificado ■; c) a+b) ■; y d) PBS □. El C1q unido se determinó con el AcM [^{125}I]-SIM 187. El gráfico corresponde a la media $\pm\text{EE}$ de tres experimentos realizados.

IV.7 Análisis de la actividad lítica del suero normal de ratón en los promastigotes de *Leishmania infantum*

IV.7.1 Cinética de incorporación de yoduro de propidio en tiempo real a promastigotes opsonizados por suero normal de ratón y suero normal humano

El C3b depositado en el promastigote a través de las vías de activación del complemento desempeña funciones opsonizantes y de inmunoadherencia en el parásito, y forma parte del enzima C3/C5 convertasa que activa la cascada citolítica (C5b-C9) del complemento. El alto número de moléculas de C3 que se deposita en la superficie de *L. infantum*, sugiere que se produce una notable activación de la cascada citolítica del complemento del ratón. Para contrastar la existencia de dicha activación, se comparó la actividad lítica del suero del ratón y del suero humano frente al parásito, midiendo la incorporación de YP en los promastigotes.

El estudio se llevó a cabo analizando el efecto del SNR diluido al 50% sobre promastigotes de la fase estacionaria (día 8) de un cultivo axénico de *L. infantum*. La muerte de los parásitos se determinó en tiempo real midiendo la incorporación de YP al ADN de los promastigotes en un citómetro de flujo. En los diagramas de puntos de la **Figura 23**, se observa que los promastigotes opsonizados con SNR no incorporan YP durante los 204 s (3,4 min) de incubación, en contraste con la notable incorporación de YP que experimentan los promastigotes opsonizados con suero normal humano (SNH). Este resultado sugiere que el SNR no muestra actividad lítica frente a promastigotes de *L. infantum*. En ensayos posteriores, el tiempo de medida se amplió a 512 s (8,5 min) obteniéndose el mismo resultado. Tras la incubación, la viabilidad de los parásitos se confirmó constatando su movilidad en el microscopio. En presencia de SNH-10 mM EDTA los promastigotes no incorporaban YP, lo que confirma que la lisis por SNH es dependiente de la activación del sistema del complemento.

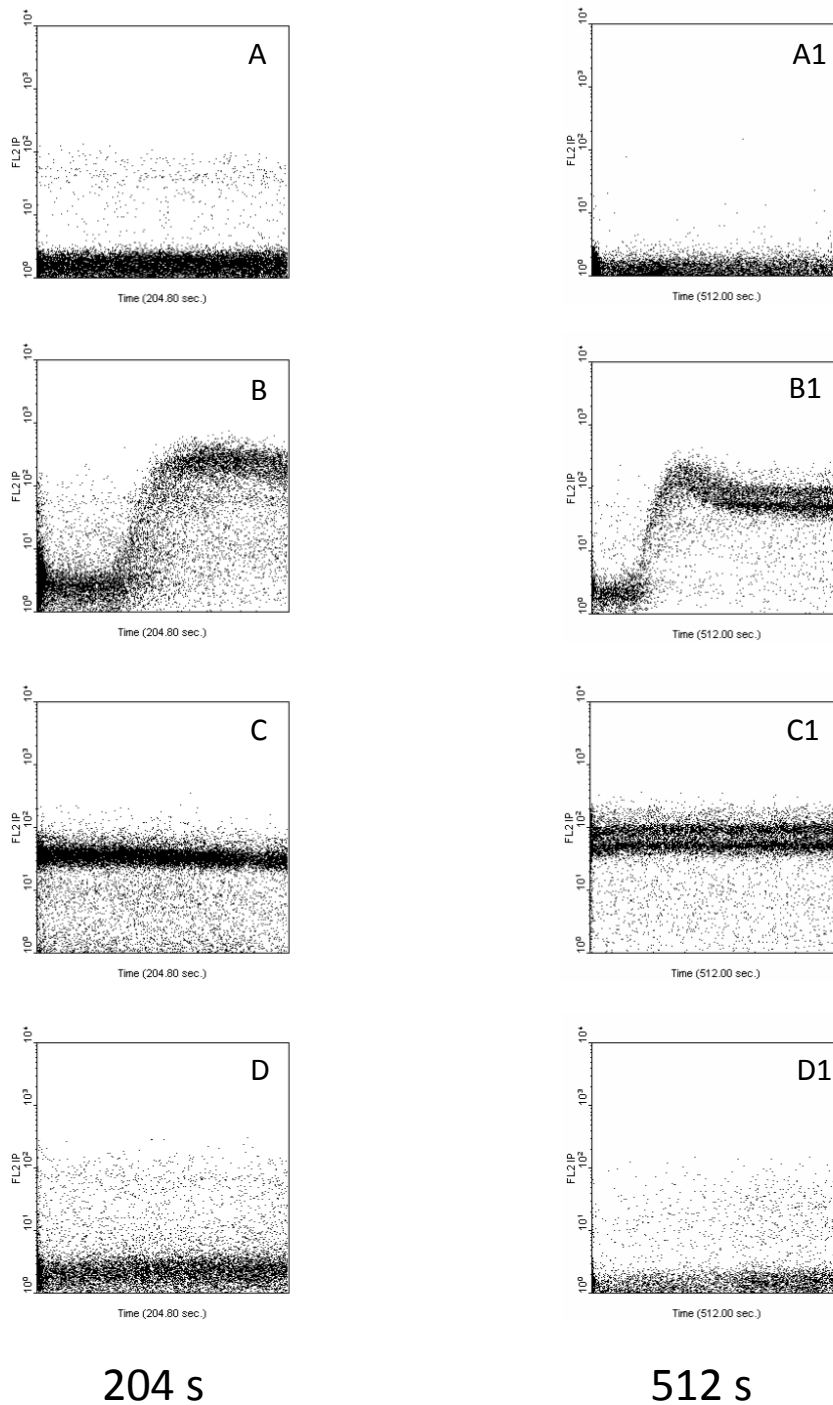


Figura 23. Estudio de la actividad citolítica del SNR y del SNH sobre promastigotes de *L. infantum*. Los diagramas de puntos muestran la incorporación de YP (FL2) al ADN de los promastigotes muertos durante periodos de incubación de 204 s (3,4 min) y 512 s (8,5 min); A y A1) SNR; B y B1) SNH; C y C1) control positivo (acetona: metanol); D y D1) control negativo: SNH-10 mM EDTA. Los promastigotes se obtuvieron de la fase estacionaria (día 8) de un cultivo axénico de *L. infantum*. Los sueros se utilizaron diluidos al 50% en PBS.

Para descartar que este resultado no estaba circunscrito a promastigotes de *L.infantum*, se investigó la actividad citolítica del SNR frente a promastigotes de otras especies de *Leishmania*, como *L. amazonensis* y *L. donovani*, así como frente a un aislado primario de *L. infantum* denominado 10445, obtenido de un perro infectado naturalmente. Como se observa (**Figura 24**), tampoco los promastigotes de *L. amazonensis*, de *L. donovani*, y del aislado 10445 incorporan YP tras la opsonización con SNR, confirmando que el suero de *Mus musculus* carece de actividad lítica frente a los promastigotes de *Leishmania*.

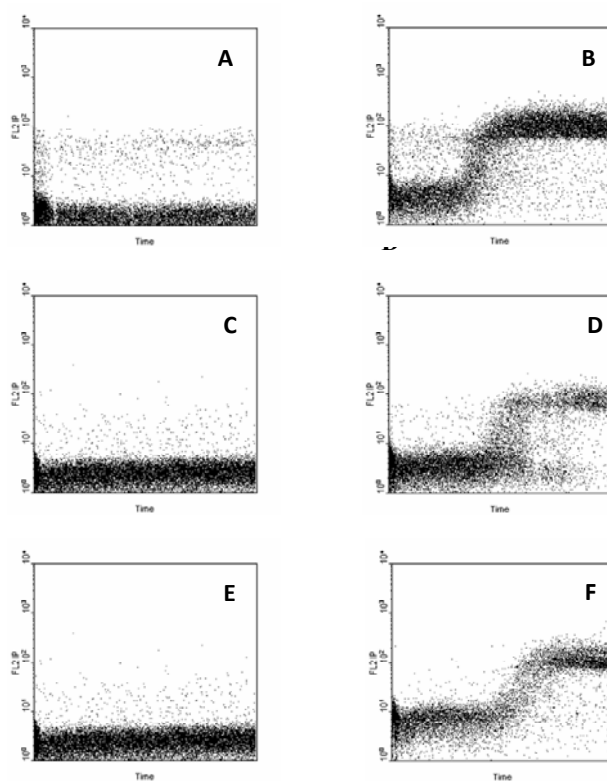


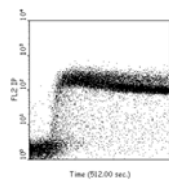
Figura 24. Análisis de la actividad lítica del SNR y del SNH frente a promastigotes de distintas especies de *Leishmania*. Los diagramas de puntos indican la incorporación de YP en los promastigotes de *L. amazonensis* incubados con SNR (A), y SNH (B); *L. donovani* incubados con SNR (C), y SNH (D); *L. infantum* 10445 incubados con SNR (E), y SNH (F), durante 3,4 min. Los sueros se utilizaron diluidos al 50% en PBS.

IV.7.2 Estudio comparado de la capacidad lítica de sueros de distintos taxones de mamíferos frente a promastigotes de *Leishmania infantum*

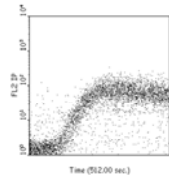
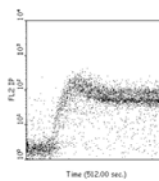
Para profundizar el análisis de la capacidad citotóxica del suero normal de diversos géneros de vertebrados con promastigotes de *Leishmania*, se realizó un estudio en paralelo de la potencia citolítica de sueros pertenecientes a ocho géneros de mamíferos: cuatro roedores (ratón, rata, criceto (hámster), cobaya y merión), y tres no roedores (humano, perro, y conejo), frente a promastigotes de *L. infantum* tomados de las fases logarítmica (logarítmicos) (día 4) y estacionaria (metaciclícos) (día 8) de crecimiento. Este análisis presupone, que los promastigotes de la fase logarítmica son más susceptibles al complemento que los de la fase estacionaria. El estudio se realizó midiendo la cinética de incorporación de YP en los promastigotes opsonizados con los distintos sueros durante 8,5 minutos, empleando intervalos de adquisición de 500 ms, y utilizando controles idénticos a los de los experimentos anteriormente citados. La **Figura 25** muestra los diagramas de puntos de las cinéticas de incorporación de YP en promastigotes de las fases logarítmica (**Fig. 25, 1A-8A**) y estacionaria (**Fig. 25, 1B-8B**) opsonizados con suero normal humano (SNH), de conejo (SNC), de perro (SNP), de cobaya (SNCb), de rata (SNRa), de criceto (SNHm), de ratón (SNR), y de merión (SNMe).

Logarítmicos

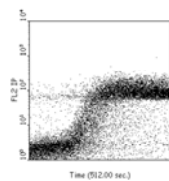
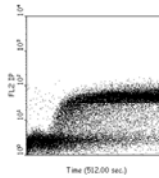
Metaciclícos



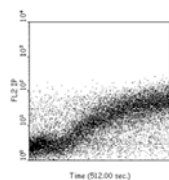
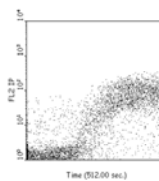
Humano



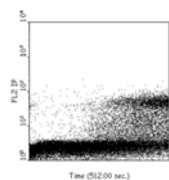
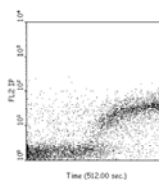
Conejo



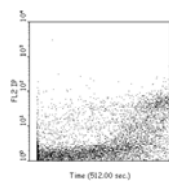
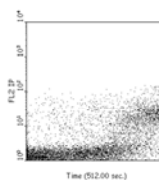
Perro



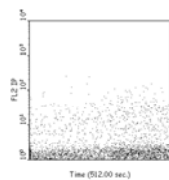
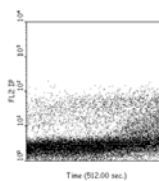
Cobaya



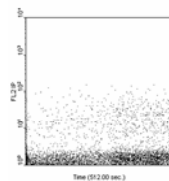
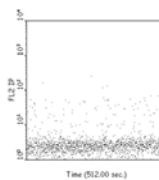
Rata



Hámster



Ratón



Merión

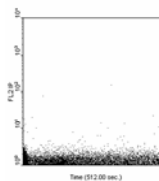
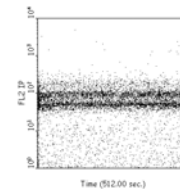
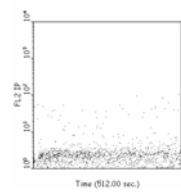


Figura 25. Cinética de incorporación de YP en promastigotes de las fases logarítmica y estacionaria incubados con SNH, SNC, SNP, SNCb, SNRa, SNHm, SNR, y SNMe; Control positivo (A), control negativo (B)



A



B

A partir de los datos obtenidos en los diagramas de puntos, en la Figura 26 (A-B) se reconstruyen las cinéticas de incorporación de YP en promastigotes de *L. infantum* procedentes de las fases logarítmica (Fig. 26-A) y estacionaria (Fig. 26-B) de crecimiento, durante la opsonización con sueros pertenecientes a ocho taxones de mamíferos. Las cinéticas de incorporación de YP en promastigotes opsonizados por sueros de mamíferos no primates, son más lentas que las obtenidas con SHN. Los promastigotes incubados con suero de ratón (SNR) y suero de merión (SNMe), no incorporan YP. La práctica totalidad de los promastigotes opsonizados con SNR y SNMe se mostraban vivos al microscopio.

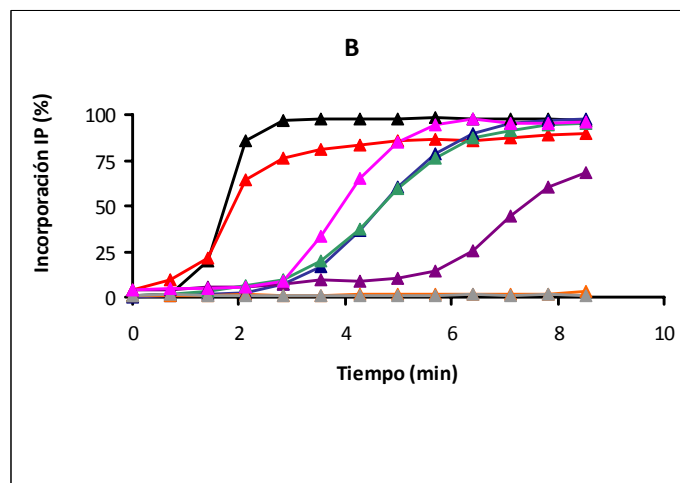
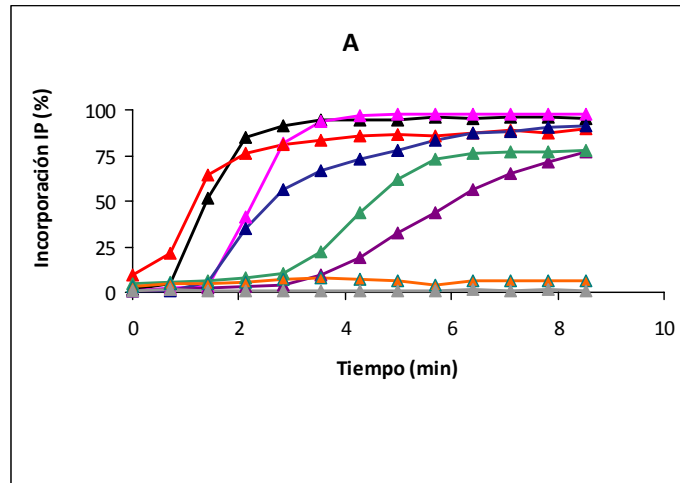


Fig. 26 (A-B). Cinéticas de incorporación de YP en promastigotes de *L. infantum* procedentes de un cultivo axénico en fase logarítmica (A) y fase estacionaria (B), incubados con el suero normal de distintas especies de mamíferos: Humano ▲, Conejo ▲, Perro ▲, Cobaya ▲, Rata ▲, Criceto (hámster) ▲, Ratón ▲ y Merión ▲. Datos obtenidos a partir del análisis de los diagramas de puntos de la Fig. 25, mediante el software CELLQuest™. La cinética de incorporación del YP a los promastigotes se obtuvo a partir de un diagrama de puntos de FL2 frente al tiempo, dividido en 13 regiones de 39,38 s para la incubación de 512 s (8,5 min). El porcentaje de promastigotes que incorporan YP durante el tiempo de medida se cuantificó en cada región como el cociente entre el número de eventos que emitían fluorescencia del YP > 10¹/número total de eventos (promastigotes que emitían fluorescencia del YP > 10¹ + promastigotes que no la emitían).

La **Tabla 1**, muestra los valores que indican el tiempo en minutos (L_{50}) que tarda el 50% de los promastigotes de la fase logarítmica y/o estacionaria en incorporar YP al enfrentarse a cada uno de los sueros investigados. Los promastigotes logarítmicos muestran valores L_{50} inferiores a los de los promastigotes estacionarios frente al suero humano, de conejo, de perro y de cobaya. No se observan diferencias significativas con los sueros de rata y criceto. Con el valor L_{50} se pueden ordenar los sueros según su potencia citolítica frente a promastigotes de *L. infantum*: humano > conejo > perro > cobaya > rata > criceto > ratón > merión.

	Logarítmicos	Estacionarios
SNH	1,6	1,9
SNC	1,6	2
SNP	2,3	3,7
SNCb	2,7	4,4
SNRa	4,4	4,6
SNHm	6,4	7,3

Tabla 1. Valores L_{50} (minutos) de incorporación de YP en promastigotes de *L. infantum* de las fases logarítmica y estacionaria, opsonizados con sueros de individuos de distintos órdenes de mamíferos. Los datos que se muestran proceden de un experimento representativo de entre 5 experimentos similares realizados. Los valores L_{50} para los sueros de ratón y merión no se incluyen en la tabla.

IV.7.3 Análisis de la deposición del componente C5b en promastigotes opsonizados con suero no inmune de ratón

La obtención en nuestro laboratorio de un AcM anti-C5 de ratón que reconoce al fragmento C5b, permitió determinar si durante la opsonización de los promastigotes con el SNR el C5b se deposita en la superficie del parásito. La ausencia de deposición de C5b sugeriría la ocurrencia de un bloqueo en el ensamblaje de la cascada citolítica, lo que explicaría la resistencia del parásito frente al complemento del ratón. Se opsonizaron promastigotes durante distintos tiempos con SRRAG2^{-/-} diluido al 50% en PBS; finalizada la opsonización, los promastigotes se incubaron con los AcM SIM 161 (rata anti-C3 de ratón) y SIM 225 (ratón anti-C5 de ratón), que, a su vez, se detectaron, respectivamente, con los anticuerpos fluoresceinados MAR 18.5, y un AcP de cabra anti-IgG de ratón. La señal fluorescente se midió en el citómetro de flujo.

La Figura 27, muestra el curso de la fijación de C3b en los promastigotes, que es seguida, tras un corto intervalo de tiempo, por la deposición de C5b en la superficie del parásito. Por tanto, durante la opsonización de los promastigotes con SNR y, presumiblemente, con el suero de otros géneros de roedores (merión, cricétidos), la cascada citolítica inicia el ensamblaje, como demuestra la deposición de C5b en la membrana del parásito.

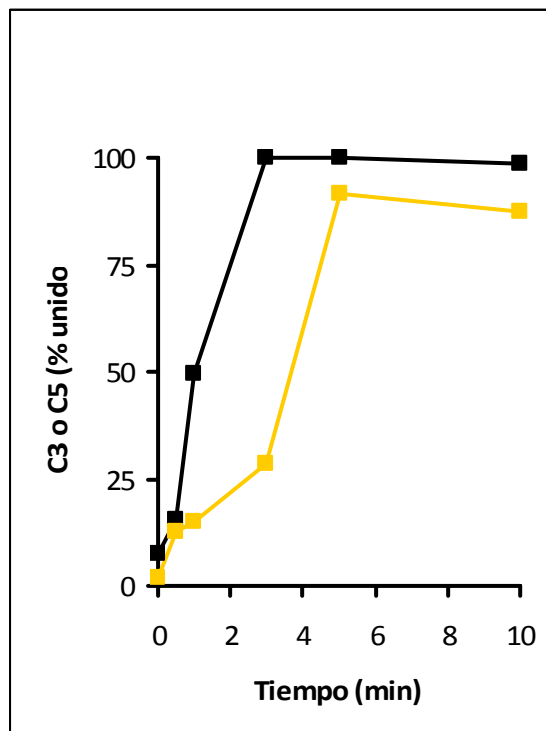


Figura 27. Cinética de deposición de C3 y C5 en la superficie de promastigotes de *L. infantum* opsonizados con SNR. Los promastigotes se opsonizaron (37°C) con SRRAG2 ^{-/-} diluido al 50% en PBS durante los tiempos indicados en la gráfica. Tras la opsonización, los promastigotes se incubaron con los AcM anti-C3b (SIM 161) (■) y anti-C5b (SIM 225) (■) y, posteriormente, con los anticuerpos fluoresceinados MAR18.5 (anti-IgG de rata) y un AcP de cabra anti-IgG de ratón, respectivamente. La señal fluorescente se cuantificó en FL1 en el citómetro de flujo. Los puntos mostrados en las cinéticas corresponden a la media ± EE de tres experimentos.

V. Discusión

Este estudio describe la interacción de los promastigotes de *L. infantum* con el suero no inmune del ratón, que tiene lugar en las etapas iniciales de la infección de *Mus musculus* por tripanosomátidos del género *Leishmania*. Para obtener una visión del proceso lo más cercana a la natural, se utilizaron condiciones experimentales de tiempo, temperatura y concentración de suero próximas a las fisiológicas. El abordaje experimental que incluye análisis cinéticos y cuantitativos del mecanismo opsonizante, ha permitido identificar las principales reacciones que participan en la activación del complemento del ratón por *L. infantum*.

Tras contactar con el SNR los promastigotes de *L. infantum* activan el sistema del complemento por las vías clásica y alternativa, desencadenando la rápida deposición de un número considerable de fragmentos de C3b ($3,3 \times 10^5$ moléculas de C3b/célula) en la superficie del promastigote, un número similar al depositado por el suero de perro ($\sim 3,5 \times 10^5$) (datos no publicados), e incluso superior al depositado por el suero humano ($\sim 1,2-1,8 \times 10^5$)⁴⁷ (Fig. 6).

La velocidad de la deposición del componente C3 es muy alta, y la reacción alcanza \sim el 80% de su máximo dentro de los tres primeros minutos de opsonización. La activación del complemento por la vía alternativa (en presencia de suero tratado con EGTA-Mg) muestra un retraso en su inicio de aproximadamente 4 minutos con respecto a la vía clásica. Según estos datos, la vía clásica sería la responsable de activar el 90% del C3b que se une al promastigote al iniciarse la opsonización, mientras que la vía alternativa contribuiría entre el 12% y el 15% del C3b total depositado. En condiciones experimentales cercanas a las fisiológicas, el mecanismo de activación del complemento del ratón por promastigotes de *Leishmania* es similar al del suero humano⁴⁷.

El análisis del mecanismo de activación del complemento humano por los promastigotes de *Leishmania* ha sido un tema controvertido. La visión del proceso más extendida en la literatura mantiene que la activación del complemento se inicia a través de la vía alternativa^{37, 89, 90, 102, 103, 105, 131, 132}, o con participación de lectinas plasmáticas como la MBL¹⁰², o pentraxinas como la CRP^{37, 89, 90, 102, 103, 105, 131, 132}. La mayoría de los datos que fundamentan estas interpretaciones proceden de experimentos realizados con incubaciones prolongadas que permitían la participación de las tres vías (clásica, alternativa y de la lectina) en el mecanismo activante. Por el contrario, cuando se analiza el proceso a partir de sus etapas se constata que el mecanismo de opsonización es muy rápido, y se activa por la vía clásica⁴⁷. Los datos mostrados en la Figura 5, ponen de manifiesto la rapidez con que se activa el complemento del ratón por los promastigotes, lo que concuerda con estudios previos que señalaban la rapidez de activación del complemento de esta especie¹³³. Desafortunadamente, no existen a nuestro saber, trabajos

precedentes sobre la activación del complemento del ratón por promastigotes de *Leishmania* con los que se puedan contrastar los resultados obtenidos en esta Tesis.

La confirmación de que la vía clásica era la vía “rápida” que dispara la opsonización del promastigote, se obtuvo determinando el curso de la fijación de las proteínas C1q y C4b a la superficie del parásito. Ambos componentes se depositan simultánea y casi inmediatamente al comienzo de la opsonización. El C1q con un máximo de unión a los aproximadamente 20 segundos y el C4 a los 40 segundos, ambos seguidos por el máximo del C3b entre los 2 y 3 minutos (**Fig. 7**). Concomitante con la fijación de C3b, se observa un descenso en la cantidad del C1q y C4b unido inicialmente, que alcanza el 75% en el caso del C1q, y el 25% en el de C4.

Para identificar la causa de este fenómeno, los promastigotes se opsonizaron con suero tratado con leupeptina, agente que inhibe la actividad serina proteasa de la subunidad C1s del C1 y bloquea la activación de la vía clásica. La inhibición de la vía clásica por leupeptina se constata por la caída dosis-dependiente que causa en la deposición de C3b, mientras se mantiene inalterado el grado y velocidad de fijación del C1q (**Figs. 8 y 9**). En estas condiciones, no se observa un descenso en el porcentaje de C1q fijado al parásito, lo que sugiere que dicha pérdida está relacionada con la unión al promastigote de algún otro componente del complemento (**Fig. 9**). La desaparición del C1q unido inicialmente, pudiera deberse bien a que se une al mismo epítipo del promastigote al que lo hacen otros componentes de la vía clásica, o a que la interacción del anticuerpo sonda (anti-C1q [¹²⁵I]-SIM 187) con el C1q se encuentra enmascarada por la fijación de dichos componentes. Han sido descritos efectos similares de enmascaramiento de IgG y C1q tras la deposición de C3b/iC3b¹³⁴⁻¹³⁶, siendo interpretados como un mecanismo de bloqueo de la unión de la IgG y/o del C1q del inmunocomplejo a los receptores FcRII y/o FcRIII de neutrófilos; dicho proceso limitaría la activación intravascular de los leucocitos y atenuaría la respuesta inflamatoria¹³⁷⁻¹³⁹. El hecho de que la leupeptina inhiba la activación de la vía clásica en una etapa posterior a la unión del C1q, confirma que la activación del complemento del ratón por promastigotes de *Leishmania* se inicia a través de dicha vía.

La presencia de AcN anti-*Leishmania* en el suero de individuos de la práctica totalidad de taxones de vertebrados estudiados es un hecho bien contrastado¹⁴⁰⁻¹⁴⁵. En el suero humano no inmune, los AcN antitripanosomátido son los principales candidatos a iniciar la activación de la vía clásica del complemento^{39, 146, 147}. El presente estudio confirma la existencia de AcN anti-*L. infantum* de clase IgM e IgG en el SNR (**Fig. 10**). Al igual que en el suero humano, la interacción de los AcN IgM e IgG del ratón con los promastigotes de *L. infantum* es muy rápida, algo más veloz

en el caso de los anticuerpos IgM debido probablemente a su carácter pentamérico, y a que su concentración en el suero supera ligeramente a la de la IgG (**Fig. 11**).

Dado el temprano papel que juegan los AcN anti-*Leishmania* en la opsonización del parásito, investigamos la aparición de los anticuerpos IgM e IgG durante el desarrollo post-natal del ratón. Para ello, analizamos la actividad anti-*Leishmania* del suero de ratones de 1, 7, 14, 28, 42, 56 y 90 días de edad. Los anticuerpos IgG están presentes en los ratones de todas las edades indicadas; en contraste, la IgM no se detecta en el suero de ratones neonatos (1 día), y muy débilmente en los de una semana de edad. La actividad IgM anti-*Leishmania* está presente a partir de las dos semanas de vida y llega a alcanzar valores de adulto a los 3 meses de edad.

La reactividad de los anticuerpos IgM e IgG del suero en función de la edad tiene carácter bimodal, cuyo valle coincide con el bache fisiológico que se da en la expresión de las inmunoglobulinas durante la ontogenia del mamífero (**Fig. 12**). Al analizar la actividad de la IgM y de las subclases de la IgG frente a los promastigotes, se observa que las subclases IgG1 e IgG3 son las más reactivas en las dos primeras semanas de vida, y que la disminución de su actividad coincide con el bache fisiológico. En contraste, la reactividad anti-*Leishmania* de IgG2a e IgG2b inicialmente muy débil, aumenta paulatinamente hasta alcanzar su máximo a las seis semanas, al igual que ocurre con la IgM. Este perfil de reactividad sugiere, que a partir del bache fisiológico los isotipos IgG2a, IgG2b e IgM del huésped substituyen funcionalmente a las inmunoglobulinas de origen materno (**Fig. 13**). Recapitulando, durante las dos primeras semanas de vida del ratón, la mayoría de los AcN IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania* son de origen materno, proceden del calostro o penetran en el sistema circulatorio del neonato a través de la placenta; los anticuerpos IgM son autóctonos, y se generan durante el desarrollo post-natal del individuo.

El patrón de deposición de C3b en el parásito por las vías clásica y alternativa que se obtiene con el suero de ratones neonatos de 1 día, es similar al generado por el suero adulto (**Fig. 14**), lo que sugiere que la IgG de origen materno desempeña un papel en la activación de la vía clásica por los promastigotes, mientras que los anticuerpos de clase IgM son, durante ese periodo, prescindibles. Este hecho, indujo a reconsiderar el papel de los AcN en la activación del complemento por *Leishmania*.

La eliminación de los AcN del SNR por adsorción exhaustiva con promastigotes, redujo en un 80% la fijación de C3b por la vía clásica; no obstante, la deposición de C3b obtenida con el SNR por dicha vía no se recuperaba al suplementar el suero adsorbido con IgM e IgG (**Fig. 15, A-B**).

Suponiendo que los AcN anti-*Leishmania* juegan un papel relevante en la activación de la vía clásica del complemento, sería de esperar que la opsonización de los parásitos con suero de

ratones que carecen de anticuerpos (cepas C57BL/6 μ .KO y C57BL/6.RAG2^{-/-}) no activara la deposición de C3b. Sin embargo (**Fig. 16**), la cinética de fijación de C3b obtenido con el suero de estos ratones es idéntico al que se observa con el suero de ratones de la cepa silvestre C57BL/6. Este resultado sugiere, que durante la adsorción del SNR con los promastigotes se pierde algún componente, distinto de los AcN, que es necesario para activar la vía clásica.

Un primer candidato, cuya pérdida pudiera afectar la activación del complemento era la lectina MBL¹⁰². La adsorción del suero de ratones C57BL/6 y de C57BL/6 μ .KO con mananos, determinó que el título de la MBL en el suero adsorbido (SR μ .KO/AdsMBL) disminuyera un 90% respecto al de la muestra original (**Fig. 17**). Sin embargo, a pesar de la ausencia de MBL, el suero SR μ .KO/AdsMBL mantenía prácticamente inalterada la capacidad de activar el complemento tras 2 minutos de incubación (vía rápida) y depositar C3b en los promastigotes (**Fig. 18**). Estos resultados sugerían que la MBL no desempeña un papel relevante en la activación de la vía clásica del complemento por los promastigotes. No obstante, dado el carácter de proteína de fase aguda de la MBL no se puede descartar que desempeñe un papel activador durante la fase crónica de la enfermedad. El plasma no inmune del ratón posee dos formas de MBL, A y C, con concentraciones medias de 7 μ g/ml ($8,2 \times 10^{-9}$ M) y 45 μ g/ml ($4,7 \times 10^{-8}$ M), respectivamente⁸³. En el suero humano, la concentración de AcN anti-*Leishmania* es $\sim 1,6 \times 10^{-7}$ M³⁹, aproximadamente 1000 veces mayor que la de MBL⁷⁶. Suponiendo que la concentración de AcN en el suero de ratón es semejante a la humana, la relación AcN anti-*Leishmania*/MBL-A sería de ~ 500 y la de AcN anti-*Leishmania*/MBL-B de ~ 30 . Por ello, parece improbable que la proteína MBL tenga un papel predominante sobre los AcN en la opsonización del promastigote.

La opsonización de los promastigotes con sueros de ratones deficientes en anticuerpos (C57BL/6 μ .KO) dispara la rápida unión del C1q a la superficie de los parásitos, generando un perfil de intensidad de fluorescencia superior al obtenido cuando se opsonizan los promastigotes con SNR (**Fig. 19**). Este hecho, pudiera deberse a que la unión del AcN interfiere con la fijación del C1q al promastigote, o a que bloquean parcialmente la interacción entre el C1q y el SIM 187 anti-C1q (AcM empleado en su detección). Por otra parte, si se utiliza el C1q aislado en concentración similar a la del plasma del ratón (70 μ g/ml)¹²⁵ y se mide su unión al promastigote, se observa que la fijación es incluso superior a la obtenida con el C1q endógeno del SNR, sugiriendo que la interacción directa del C1q con el promastigote es una reacción de carácter fisiológico (**Fig. 20**).

La constatación adicional de que el componente C1q del ratón dispara la vía clásica en ausencia de anticuerpos, se obtuvo tras eliminar el C1q del suero de ratones carentes de anticuerpos (C57BL/6 μ .KO). La profunda caída en el grado de activación del complemento tras

opsonizar dos minutos los promastigotes con suero deficitario en anticuerpos y C1q (éste último eliminado por adsorción), y la posterior recuperación de la actividad al suplementar el suero adsorbido con C1q purificado (**Fig. 21**), confirma el papel primordial del C1q en la activación de la vía clásica del complemento del ratón por los promastigotes de *Leishmania*. Ejemplos similares de activación de la vía clásica del complemento por C1q sin participación de anticuerpos se han descritos, entre otros, con *Legionella pneumophila*¹⁰⁹, *Klebsiella pneumoniae*^{108, 148}, *Escherichia spp*^{111, 149}, *Salmonella minnesota*¹⁵⁰, y *Cryptosporidium parvum*¹⁵¹.

Concluimos, por tanto, que en sueros de ratón carentes de anticuerpos, la unión del C1q a los promastigotes es suficiente para activar la vía clásica del complemento (**Fig. 16**). No obstante, el hecho de que el SNR contenga AcN que se unen al promastigote con gran rapidez (**Fig. 11**), abre un interrogante sobre cuál es el mecanismo natural que dispara la vía clásica del complemento en el suero de ratones silvestres. Posibles mecanismos son: a) unión directa del C1q al promastigote, b) fijación del C1q a los AcN que se unen al parásito, y c) una combinación de ambos procesos. La opción c) viene apoyada por el hecho de que en los promastigotes opsonizados con AcN la unión del C1q aumenta sinérgicamente respecto a la obtenida en su ausencia (**Fig. 22**).

Los resultados obtenidos con el suero de los ratones inmunodeficientes y con las preparaciones de C1q aislado, indican que el componente C1 es necesario y suficiente para disparar la vía clásica del complemento del ratón durante la opsonización de las leishmanias. No obstante, en el caso de los ratones “knock-out”, hay que tener en cuenta que estas mutaciones reproducen más un efecto funcional que una condición natural del animal, por lo que la interpretación de los datos obtenidos en animales mutantes con pérdida de función requieren cautela, ya que pudieran estar afectados por mecanismos compensatorios que modulan el fenotipo de la mutación.

En los estudios cinéticos en tiempo real de opsonización de promastigotes de *L. infantum* por suero humano, aproximadamente el 90% de los promastigotes incorpora YP en su ADN tras ~ 2,5 minutos de incubación⁴⁷. Como muestra este estudio, la cinética de activación del complemento por los promastigotes es extremadamente rápida y se acompaña de abundante deposición de C3b en la superficie del parásito. Semejante activación hace suponer el desencadenamiento de la cascada citolítica del complemento que mata al parásito; sin embargo, la actividad citolítica del complemento del ratón frente a promastigotes de distintas especies de *Leishmania* es muy débil o inexistente (**Fig. 24**). La ausencia de actividad citotóxica del suero del ratón no es debida a un fallo en la iniciación de la cadena lítica, ya que los promastigotes incorporan con rapidez abundante C5b en la superficie (**Fig. 27**). Fenómenos similares se han descrito en la opsonización de *Pseudomonas*

*aeruginosa*¹⁵² y *Francisella tularensis*¹⁵³ por suero de ratón. Por tanto, es probable que el bloqueo de la reacción citolítica este causado por algún factor sérico que impide o modifica la inserción del complejo de ataque a la membrana (MAC) en la superficie del promastigote. En las células opsonizadas por complemento coexisten formas líticas y no-líticas del MAC, y solo una pequeña proporción del C3b depositado contribuye a la formación del MAC^{132 154, 155}.

La distribución topográfica del C3b pudiera ser una de las claves que determinan el carácter lítico de la respuesta efectora del complemento. En la activación del SNR por *Cryptococcus neoformans*, las moléculas de C3b de ratón se depositan en la superficie del hongo en distinto lugar al que se une el C3b generado durante la activación del suero humano¹⁵⁶, un hecho que pudiera explicar las diferencias en actividad citolítica de ambos sueros. Desafortunadamente, dada la falta de reactivos apropiados para profundizar el estudio no ha sido posible progresar en el esclarecimiento del mecanismo inhibitorio.

Las cinéticas de incorporación de YP en el ADN del parásito, indican un cierto grado de resistencia mayor a la lisis en los promastigotes aislados de la fase estacionaria que los de la fase logarítmica (**Fig.25, A-B**), lo que confirma que la resistencia o susceptibilidad del promastigote a la lisis por complemento está condicionada, al menos en parte, por su estado de diferenciación. Durante la transmisión de la leishmaniosis en el hombre, la actividad citolítica del complemento reduce considerablemente la viabilidad de la dosis infectante, confiriendo al hospedador una substancial ventaja adaptativa. Por ello, resulta coherente preguntarse por las causas que determinan que individuos de una especie potencialmente hospedadora, al menos accidental, de *Leishmania* como el ratón, carezcan de la función efectora lítica del complemento frente al parásito.

Para obtener una visión más completa de la actividad del complemento de los miembros de diversos taxones de mamíferos susceptibles y resistentes a *Leishmania*, se determinaron las cinéticas de lisis en tiempo real de promastigotes de *L. infantum* opsonizados con el suero de individuos de ocho géneros de mamíferos. *A priori* sería de esperar, que los individuos de taxones cuyos sueros presentan mayor capacidad citolítica frente al parásito fueran más resistentes a la infección. Sin embargo, no existe correlación entre la potencia citolítica del suero frente al parásito y el carácter resistente o susceptible del hospedador. Un ejemplo de ello lo tenemos en los individuos de los géneros *Homo* y *Canis*, ambos susceptibles a la infección por *Leishmania*, y cuyos sueros son fuertemente citolíticos para los promastigotes, (**Fig. 26, A-B**).

Los miembros de diversos géneros del orden Rodentia actúan como reservorios animales de *Leishmania*. Entre ellos se encuentran el Gran jerbo (*Rhombomys opimus*) reservorio de

L. major en Asia Central ¹⁵⁷, el merión (*Meriones libycus*) reservorio de *L. major* en Irán, Israel, Arabia Saudita, Libia ^{158, 159}, el hyrax (*Procavia capensis*) reservorio de *L. trópica* en la región de Galilea (Israel) ¹⁶⁰, y, probablemente, de *L. aethiopica* en Etiopía y Kenia ¹⁶¹. Dentro de la familia Muridae, el suero de individuos de los géneros *Mesocricetus* (cricetos), *Mus* (ratón) y *Meriones* (merión) muestran actividad citolítica muy débil o inexistente frente a *Leishmania infantum*. Dado el carácter protector de dicha reacción, se podría especular que en su ausencia la estrategia defensiva de estos roedores este basada en la posesión de un mecanismo opsonizante eficaz, y de una potente respuesta microbicida por parte de sus fagocitos profesionales. Los miembros del género *Mus*, y probablemente de otros géneros de roedores, poseen un complemento fuertemente opsonizante, como muestra este estudio, y una notable población de células reticuloendoteliales libres activamente fagocíticas ¹⁶². No obstante, en el caso de agentes adaptados a la vida intracelular como *Leishmania* que son capaces de neutralizar la actividad citocida de los macrófagos, una defensa basada en la opsonización y posterior fagocitosis del promastigote representa un arma de doble filo para el hospedador, ya que dota al parásito de una vía de penetración en el macrófago. En este contexto, hay que señalar como vía de penetración altamente eficaz, la reacción de inmunoadherencia del promastigote con las plaquetas, la cual no ha sido abordada en este estudio ⁴⁰. Recapitulando lo anterior, se podría especular que un mecanismo basado por una parte en la débil actividad citolítica del complemento, y por otra, en la potente capacidad opsonizante del suero en sinergia con la reacción de inmunoadherencia, ha posibilitado que miembros de diversos géneros de roedores que comparten su hábitat con especies del vector de la leishmaniosis, hayan devenido en principales reservorios del ciclo enzoótico natural de *Leishmania*.

VI. Conclusiones

1. En el suero normal del ratón existen AcN que opsonizan con gran rapidez a los promastigotes de *L. infantum*. Durante el periodo neonatal, el suero del ratón carece de AcN frente a *L. infantum* de isotipo IgM, y los de isotipo IgG1 e IgG3 son de origen materno. Por el contrario, los AcN IgM que aparecen durante el desarrollo ontogénico tienen origen endógeno.
2. La vía clásica del complemento de ratón dispara la opsonización de los promastigotes de *L. infantum* y es la responsable de la deposición inicial de la proteína C3b en los promastigotes. Este mecanismo está presente en el ratón desde el periodo neonatal.
3. El componente C1 del complemento del ratón es el factor necesario y suficiente para iniciar la activación de la vía clásica. Ni los AcN anti-*Leishmania* ni la lectina MBL, son necesarios para el desencadenamiento del proceso.
4. Durante la opsonización de los promastigotes por el complemento del ratón se produce abundante deposición de moléculas de C3b sobre el parásito, y se fija C5b, primer componente de la vía citolítica del complemento. A pesar de ello, el complemento del ratón carece de actividad lítica frente a los promastigotes de *Leishmania*.
5. El estudio comparado en tiempo real de la lisis de promastigotes de *L. infantum* por el suero de ocho taxones de mamíferos, muestra que la potencia citolítica del suero frente a *Leishmania* no se correlaciona con la resistencia del hospedador a la leishmaniosis. Así, los sueros con menor o nula potencia citolítica pertenecen a mamíferos del orden Rodentia, algunos de cuyos géneros son reservorios contrastados de *Leishmania* en la naturaleza. Este hecho, sugiere la hipótesis de que la débil actividad del complemento frente al parásito, habría permitido que los individuos de estos géneros de roedores hayan devenido en reservorio natural de *Leishmania*.

VII. Bibliografía

1. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 305-318 (2004).
2. Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* **22**, 552-557 (2006).
3. Hotez, P.J. *et al.* Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1018-1027 (2007).
4. Peacock, C.S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* **39**, 839-847 (2007).
5. Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes. Infect.* **1**, 465-472 (1999).
6. De Souza, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol. Res.* **88**, 1013-1025 (2002).
7. Sacks, D.L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol.* **3**, 189-196 (2001).
8. Turco, S.J. The lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Subcell. Biochem.* **18**, 73-97 (1992).
9. Kamhawi, S. *et al.* A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119**, 329-341 (2004).
10. Rogers, M.E., Chance, M.L., & Bates, P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* **124**, 495-507 (2002).
11. Lovelace, J.K. & Gottlieb, M. Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 1121-1128 (1986).
12. Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., & McMaster, W.R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**, 33-40 (2002).
13. Beetham, J.K., Donelson, J.E., & Dahlin, R.R. Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **131**, 109-117 (2003).
14. Zheng, Z., Butler, K.D., Tweten, R.K., & Mensa-Wilmot K. Endosomes, glycosomes and glycosylphosphatidylinositol catabolism in *Leishmania major*. *Journ. Biolog. Chem.* **279**, 42106-42113. (2004).
15. Shaw, J.J. The pitfalls of assigning disease syndromes to pathogens and vice versa. *Trends Parasitol.* **22**, 56-58 (2006).

16. Convit, J. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 13-17 (2005).
17. Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., el Hassan, I.M., & El Hassan, A.M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 87-98 (2003).
18. Alvar, J.P. Las leishmaniasis: de la biología al control 2ª edición. 2001.
19. Alvar, J.P. Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitol. Today* **10**, 160-163 (1994).
20. Walters, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 196-206 (1993).
21. Tremblay, M., Olivier, M., & Bernier, R. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol. Today* **12**, 257-261 (1996).
22. Alvar, J.P. & Jimenez, M. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS* **8**, 854 (1994).
23. Pineda, J.A.. Evidence of increased risk for *Leishmania infantum* infection among HIV-seronegative intravenous drug users from southern Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 354-357 (2001).
24. Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* **24**, 324-330 (2008).
25. Miro, G.. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol. Res.* **101**, 253-257 (2007).
26. Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* **4**, 1-24 (1990).
27. Volf, P., Kiewegova, A., & Svobodova, M. Sandfly midgut lectin: effect of galactosamine on *Leishmania major* infections. *Med. Vet. Entomol.* **12**, 151-154 (1998).
28. Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., & Atzeni, M.C. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 458-459 (1986).
29. Morillas, F. *et al.* Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol. Res* **82**, 569-57(1996).
30. Kamhawi, S. *et al.* A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119**, 329-341 (2004).

31. Walters, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 196-206 (1993).
32. Bates, P.A. & Rogers, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* **4**, 601-609 (2004).
33. Rogers, M.E. & Bates, P.A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS. Pathog.* **3**, e91 (2007).
34. Schlein, Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today* **9**, 255-258 (1993).
35. Butcher, B.A. *Leishmania donovani*: cell-surface heparin receptors of promastigotes are recruited from an internal pool after trypsinization. *Exp. Parasitol.* **71**, 49-59 (1990).
36. Moreno, I. *et al.* Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of *Leishmania infantum* promastigotes derived from axenic culture or from *Phlebotomus perniciosus*. *Microbes. Infect.* **9**, 1574-1580 (2007).
37. Mosser, D.M., Burke, S.K., Coutavas, E.E., Wedgwood, J.F., & Edelson, P.J. *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **62**, 394-404 (1986).
38. Puentes, S.M., Sacks, D.L., Da Silva, R.P., & Joiner, K.A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **167**, 887-902 (1988).
39. Dominguez, M. & Torano, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J. Exp. Med.* **189**, 25-35 (1999).
40. Dominguez, M. & Torano, A. *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. *Parasite Immunol.* **23**, 259-265 (2001).
41. Rosenthal, L.A., Sutterwala, F.S., Kehrl, M.E., & Mosser, D.M. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect. Immun.* **64**, 2206-2215 (1996).
42. Sutterwala, F.S. & Mosser, D.M. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 543-551 (1999).
43. Olivier, M., Gregory, D.J., & Forget, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 293-305 (2005).
44. Hill, J.O. Pathophysiology of experimental leishmaniasis: pattern of development of metastatic disease in the susceptible host. *Infect. Immun.* **52**, 364-369 (1986).
45. Pearson, R.D. & Steigbigel, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **127**,

1438-1443 (1981).

46. Russell, D.G. & Talamas-Rohana, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today* **10**, 328-333 (1989).
47. Dominguez, M., Moreno I., Lopez-Trascasa, M., & Torano, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J. Exp. Med.* **195**, 451-459 (2002).
48. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., & Saravia, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561-1577 (2005).
49. Abbas, A.K., Murphy, K.M., & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793 (1996).
50. Wei, J. *et al.* Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 18169-18174 (2007).
51. Farrar, J.D., Asnagli, H., & Murphy, K.M. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J. Clin. Invest* **109**, 431-435 (2002).
52. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* **13**, 139-145 (2007).
53. Locksley, R.M., Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., & Gardner, K.D., Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* **138**, 744-749 (1987).
54. Beebe, A.M., Mauze, S., Schork, N.J., & Coffman, R.L. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity.* **6**, 551-557 (1997).
55. Sacks, D. & Anderson, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol. Rev.* **201**, 225-238 (2004).
56. Mehra, V., Mason, L.H., Fields, J.P., & Bloom, B.R. Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy. *J. Immunol.* **123**, 1813-1817 (1979).
57. Belkaid, Y., Blank, R.B., & Suffia, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* **212**, 287-300 (2006).
58. Peters, N. & Sacks, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **213**, 159-179 (2006).
59. Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**, 338-344 (2000).
60. Parish, C.R. & O'Neill, E.R. Dependence of the adaptive immune response on innate immunity: some questions answered but new paradoxes emerge. *Immunol.*

Cell Biol. **75**, 523-527 (1997).

61. Kufer, T.A., Fritz, J.H., & Philpott, D.J. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* **13**, 381-388 (2005).
62. Beutler, B., Hoebe, K., Georgel, P., Tabeta, K., & Du, X. Genetic analysis of innate immunity: TIR adapter proteins in innate and adaptive immune responses. *Microbes. Infect.* **6**, 1374-1381 (2004).
63. Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., & Tsokos, G.C. Complement 3d: from molecular adjuvant to target of immune escape mechanisms. *Clin. Immunol.* **121**, 177-185 (2006).
64. Avrameas, S. & Ternynck, T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Res. Immunol.* **146**, 235-248 (1995).
65. Kasalian, M.T. & Casali, P. Autoimmunity-prone B-1 (CD5 B) cells, natural antibodies and self recognition. *Autoimmunity* **15**, 315-329 (1993).
66. Ochsenbein, A.F. *et al.* Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-2159 (1999).
67. Ogden, C.A. & Elkon, K.B. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Curr. Dir. Autoimmun.* **9**, 120-142 (2006).
68. Kantor, A.B. & Herzenberg, L.A. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 501-538 (1993).
69. Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., & Tedder, T.F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity.* **23**, 7-18 (2005).
70. Rezai, H.R., Ardehali, S., & Gettner, S. Anti-leishmania activity of normal animal sera. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **69**, 29-33 (1975).
71. Schmunis, G.A. & Herman, R. Characteristics of so-called natural antibodies in various normal sera against culture forms of *Leishmania*. *J. Parasitol.* **56**, 889-896 (1970).
72. Ulrich, M., Ortiz, D.T., & Convit, J. The effect of fresh serum on the leptomonads of *Leishmania*. I. Preliminary report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **62**, 825-830 (1968).
73. Galili, U., Mandrell, R.E., Hamadeh, R.M., Shohet, S.B., & Griffiss, J.M. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect. Immun.* **56**, 1730-1737 (1988).
74. Avila, J.L., Rojas, M., & Galili, U. Immunogenic Gal alpha 1----3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Immunol.* **142**, 2828-2834 (1989).

75. Bandyopadhyay, S. *et al.* Antibodies directed against O-acetylated sialoglycoconjugates accelerate complement activation in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Infect. Dis.* **190**, 2010-2019 (2004).
76. Lu, J., Teh,C., Kishore,U., & Reid,K.B. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 387-400 (2002).
77. Selander, B. *et al.* Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J. Clin. Invest* **116**, 1425-1434 (2006).
78. Moller-Kristensen, M., Thiel,S., Sjöholm,A., Matsushita,M., & Jensenius,J.C. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int. Immunol.* **19**, 141-149 (2007).
79. Takahashi, M. *et al.* Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J. Immunol.* **180**, 6132-6138 (2008).
80. Wallis, R. Interactions between mannan-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology* **212**, 289-299 (2007).
81. Saevarsdottir, S., Vikingsdottir,T., & Valdimarsson,H. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand. J. Immunol.* **60**, 23-29 (2004).
82. Uemura, K. *et al.* L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J. Immunol.* **169**, 6945-6950 (2002).
83. Liu, H. *et al.* Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses. *Scand. J. Immunol.* **53**, 489-497 (2001).
84. Ezekowitz, R.A. Role of the mannan-binding lectin in innate immunity. *J. Infect. Dis.* **187 Suppl 2**, S335-S339 (2003).
85. Shi, L. *et al.* Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* **199**, 1379-1390 (2004).
86. Takahashi, K. & Ezekowitz,R.A. The role of the mannan-binding lectin in innate immunity. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 7**, S440-S444 (2005).
87. Ambrosio, A.R. & Messias-Reason,I.J. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: interaction of mannan-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. *Parasite Immunol.* **27**, 333-340 (2005).
88. Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., & Mantovani, A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 337-366 (2005).

89. Culley, F.J., Harris, R.A., Kaye, P.M., McAdam, K.P., & Raynes, J.G. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J. Immunol.* **156**, 4691-4696 (1996).
90. Bee, A. *et al.* Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein. *Parasitology* **122**, 521-529 (2001).
91. Mbuchi, M., Bates, P.A., Ilg, T., Coe, J.E., & Raynes, J.G. C-reactive protein initiates transformation of *Leishmania donovani* and *L. mexicana* through binding to lipophosphoglycan. *Mol. Biochem. Parasitol.* **146**, 259-264 (2006).
92. Endo, Y., Takahashi, M., & Fujita, T. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* **211**, 283-293 (2006).
93. Morgan, B.P., Marchbank, K.J., Longhi, M.P., Harris, C.L., & Gallimore, A.M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol. Lett.* **97**, 171-179 (2005).
94. Turnberg, D. & Botto, M. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol. Immunol.* **40**, 145-153 (2003).
95. Nielsen, C.H. & Leslie, R.G. Complement's participation in acquired immunity. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 249-261 (2002).
96. Kemper, C. & Hourcade, D.E. Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. *Mol. Immunol.* **45**, 4048-4056 (2008).
97. Ey, P.L., Russell-Jones, G.J., & Jenkin, C.R. Isotypes of mouse IgG--I. Evidence for 'non-complement-fixing' IgG1 antibodies and characterization of their capacity to interfere with IgG2 sensitization of target red blood cells for lysis by complement. *Mol. Immunol.* **17**, 699-710 (1980).
98. Klaus, G.G., Pepys, M.B., Kitajima, K., & Askonas, B.A. Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *Immunology* **38**, 687-695 (1979).
99. Neuberger, M.S. & Rajewsky, K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur. J. Immunol.* **11**, 1012-1016 (1981).
100. Gaboriaud, C. *et al.* Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* **25**, 368-373 (2004).
101. Navin, T.R., Krug, E.C., & Pearson, R.D. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect. Immun.* **57**, 1343-1346 (1989).
102. Green, P.J. *et al.* Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 319-328 (1994).

103. Mosser, D.M. & Edelson, P.J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.* **132**, 1501-1505 (1984).
104. Noronha, F.S., Nunes, A.C., Souza, K.T., Melo, M.N., & Ramalho-Pinto, F.J. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Trop.* **69**, 17-29 (1998).
105. Nunes, A.C. & Ramalho-Pinto, F.J. Complement resistance of *Leishmania amazonensis* promastigotes is independent of parasite proteases and lysis of sensitive forms is not due to natural antibodies in normal human serum. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 1633-1640 (1996).
106. Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A., & Joiner, K.A. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* **143**, 3743-3749 (1989).
107. Clas, F., Golecki, J.R., & Loos, M. Electron microscopic study showing antibody-independent binding of C1q, a subcomponent of the first component of complement, to serum-sensitive salmonellae. *Infect. Immun.* **45**, 795-797 (1984).
108. Alberti, S. *et al.* Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect. Immun.* **64**, 4719-4725 (1996).
109. Mintz, C.S., Arnold, P.I., Johnson, W., & Schultz, D.R. Antibody-independent binding of complement component C1q by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **63**, 4939-4943 (1995).
110. Bredt, W., Wellek, B., Brunner, H., & Loos, M. Interactions between *Mycoplasma pneumoniae* and the first components of complement. *Infect. Immun.* **15**, 7-12 (1977).
111. Aubert, B., Chesne, S., Arlaud, G.J., & Colomb, M.G. Antibody-independent interaction between the first component of human complement, C1, and the outer membrane of *Escherichia coli* D31 m4. *Biochem. J.* **232**, 513-519 (1985).
112. Brown, J.S. *et al.* The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16969-16974 (2002).
113. McCool, T.L. & Weiser, J.N. Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infect. Immun.* **72**, 5807-5813 (2004).
114. Mold, C., Rodic-Polic, B., & Du Clos, T.W. Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J. Immunol.* **168**, 6375-6381 (2002).
115. Cooper, N.R. Immune adherence by the fourth component of complement. *Science* **165**, 396-398 (1969).
116. Arnaout, M.A., Melamed, J., Tack, B.F., & Colten, H.R. Characterization of the

- human complement (C3b) receptor with a fluid phase C3b dimer. *J. Immunol.* **127**, 1348-1354 (1981).
117. Lambris, J.D. & Muller-Eberhard, H.J. The multifunctional role of C3: structural analysis of its interactions with physiological ligands. *Mol. Immunol.* **23**, 1237-1242 (1986).
 118. Sahu, A. & Lambris, J.D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **180**, 35-48 (2001).
 119. Matsushita, M. & Fujita, T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiology* **194**, 443-448 (1995).
 120. Selander, B. *et al.* Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J. Clin. Invest* **116**, 1425-1434 (2006).
 121. Harris, C.L., Kan, K. S., Stevenson, G.T., & Morgan, B.P. Tumour cell killing using chemically engineered antibody constructs specific for tumour cells and the complement inhibitor CD59. *Clin. Exp. Immunol.* **107**, 364-371 (1997).
 122. Shinkai, Y. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867 (1992).
 123. Wing, M.G., Seilly, D.J., Bridgman, D.J., & Harrison, R.A. Rapid isolation and biochemical characterization of rat C1 and C1q. *Mol. Immunol.* **30**, 433-440 (1993).
 124. March, S.C., Parikh, I., & Cuatrecasas, P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **60**, 149-152 (1974).
 125. Yonemasu, K. & Sasaki, T. Purification and characterization of subcomponent C1q of the first component of mouse complement. *Biochem. J.* **193**, 621-629 (1981).
 126. Mardiney, M.R., Jr. & Mueller-Eberhard, H.J. Mouse-BETA-1C-Globulin: Production of antiserum and characterization in the complement reaction. *J. Immunol.* **94**, 877-882 (1965).
 127. Galfre, G. & Milstein, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* **73**, 3-46 (1981).
 128. Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.* **139**, 715-720 (1974).
 129. Scatchard, G. & Black, E.S. The effect of salts on the isoionic and isoelectric points of proteins. *J. Phys. Colloid Chem.* **53**, 88-99 (1949).
 130. Ways, J.P. & Parham, P. The binding of monoclonal antibodies to cell-surface

- molecules. A quantitative analysis with immunoglobulin G against two alloantigenic determinants of the human transplantation antigen HLA-A2. *Biochem. J.* **216**, 423-432 (1983).
131. Noronha, F.S., Nunes, A.C., Souza, K.T., Melo, M.N., & Ramalho-Pinto, F.J. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Trop.* **69**, 17-29 (1998).
 132. Nunes, A.C., Almeida-Campos, F.R., Horta, M.F., & Ramalho-Pinto, F.J. *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology* **115 (Pt 6)**, 601-609 (1997).
 133. Goldman, M.B., Bangalore, S., & Goldman, J.N. Functional and biochemical properties of the early classical complement system of mice. *J. Immunol.* **120**, 216-224 (1978).
 134. Levine, R.P., Finn, R., & Gross, R. Interactions between C3b and cell-surface macromolecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **421**, 235-245 (1983).
 135. Nilsson, U.R. Deposition of C3b/iC3b leads to the concealment of antigens, immunoglobulins and bound C1q in complement-activating immune complexes. *Mol. Immunol.* **38**, 151-160 (2001).
 136. Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., & Muller-Eberhard, H.J. C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *J. Immunol.* **131**, 1930-1935 (1983).
 137. Malasit, P., Bartolotti, S.R., & Humphrey, J.H. Molecular composition of complement-solubilized complexes and their fate in vivo. *Immunology* **48**, 779-789 (1983).
 138. Sambandam, T. & Chatham, W.W. Ligation of CR1 attenuates Fc receptor-mediated myeloperoxidase release and HOCl production by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 477-485 (1998).
 139. Tengvall, P., Askendal, A., & Lundstrom, I. Complement activation by IgG immobilized on methylated silicon. *J. Biomed. Mater. Res.* **31**, 305-312 (1996).
 140. Bandyopadhyay, S. Antibodies directed against O-acetylated sialoglycoconjugates accelerate complement activation in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Infect. Dis.* **190**, 2010-2019 (2004).
 141. Ben Ismail, R., Khaled, S., Makni, S., & Ben Rachid, M.S. Anti-leishmanial antibodies during natural infection of *Psammomys obesus* and *Meriones shawi* (Rodentia, Gerbillinae) by *Leishmania major*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **69**, 35-40 (1989).
 142. Rezai, H., Gettner, S., & Behforouz, N. Anti-leishmanial activity of immune guinea-pig serum. *J. Med. Microbiol.* **5**, 371-375 (1972).

143. Rezai, H.R., Ardehali, S., & Gettner, S. Anti-leishmania activity of normal animal sera. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **69**, 29-33 (1975).
144. Rezai, H.R., Ardehali, S.M., Amirhakimi, G., & Kharazmi, A. Immunological features of kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 1079-1083 (1978).
145. Schmunis, G.A. & Herman, R. Characteristics of so-called natural antibodies in various normal sera against culture forms of *Leishmania*. *J. Parasitol.* **56**, 889-896 (1970).
146. Navin, T.R., Krug, E.C., & Pearson, R.D. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect. Immun.* **57**, 1343-1346 (1989).
147. Pearson, R.D. & Steigbigel, R.T. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* **125**, 2195-2201 (1980).
148. Alberti, S. *et al.* C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* **61**, 852-860 (1993).
149. Tenner, A.J., Ziccardi, R.J., & Cooper, N.R. Antibody-independent C1 activation by *E. coli*. *J. Immunol.* **133**, 886-891 (1984).
150. Stemmer, F. & Loos, M. Evidence for direct binding of the first component of complement, C1, to outer membrane proteins from *Salmonella minnesota*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **121**, 73-84 (1985).
151. Petry, F. *et al.* Binding and activation of human and mouse complement by *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and susceptibility of C1q- and MBL-deficient mice to infection. *Mol. Immunol.* **45**, 3392-3400 (2008).
152. Kharazmi, A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol. Lett.* **30**, 201-205 (1991).
153. Ben, N.A. & Klimpel, G.R. Subversion of complement activation at the bacterial surface promotes serum resistance and opsonophagocytosis of *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 77-85 (2008).
154. Drogari-Apiranthitou, M., Kuijper, E.J., Dekker, N., & Dankert, J. Complement activation and formation of the membrane attack complex on serogroup B *Neisseria meningitidis* in the presence or absence of serum bactericidal activity. *Infect. Immun.* **70**, 3752-3758 (2002).
155. Harriman, G.R. *et al.* Activation of complement by serum-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Assembly of the membrane attack complex without subsequent cell death. *J. Exp. Med.* **156**, 1235-1249 (1982).
156. Gates, M.A. & Kozel, T.R. Differential localization of complement component 3

- within the capsular matrix of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **74**, 3096-3106 (2006).
157. Nadim, A.J.E.N.MK.N.A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Afghanistan. Part 1: Zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* **72**, 31-35 (1979).
 158. Moemenbellah-Fard, M.D., Kalantari, M., Rassi, Y., & Javadian, E. The PCR-based detection of *Leishmania major* infections in *Meriones libycus* (Rodentia: *Muridae*) from southern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**, 811-816 (2003).
 159. Pourmohammadi, B., Motazedian, M.H., & Kalantari, M. Rodent infection with *Leishmania* in a new focus of human cutaneous leishmaniasis, in northern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **102**, 127-133 (2008).
 160. Svobodova, M. *et al.* Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1860-1868 (2006).
 161. Molyneux D.H., and Ashford, R.W. *The Biology of the Trypanosoma and Leishmania*(Academic Press, New York,1983).
 162. Mims, C.A. The peritoneal macrophages of mice. *Br. J. Exp. Pathol.* **45**, 37-43 (1964).

