

Ensayos de quimiotaxis *in vitro* en *Leishmania sp.* Evaluación de la técnica de los capilares-dos cámaras en promastigotes

Chemotaxis assays *in vitro* in *Leishmania sp.* Evaluation of the capillary-two chambers technique in promastigotes

EMILIA DÍAZ*¹, LÁSZLÓ KÖHIDAI², ARTURO RÍOS¹, ORIANA VANEGAS¹, ALICIA PONTE-SUCRE¹

Resumen

La respuesta quimiotáctica es un fenómeno que ocurre a lo largo de todo el ciclo de vida de la *Leishmania braziliensis*, incluyendo la infección activa. El presente trabajo se revisan los métodos utilizados hasta el momento para evaluar quimiotaxis *in vitro* en *Leishmania sp.* Adicionalmente, se describe la adaptación del «ensayo de los capilares-dos cámaras» al estudio de los fenómenos de quimiotaxis en *Leishmania*. Para ello, se estandarizaron parámetros fundamentales como la densidad celular en la cámara externa, el tiempo de incubación, el rango de concentraciones de los agentes quimiotácticos y la osmolalidad de las soluciones empleadas. Para validar la metodología se usaron gradientes químicos de dos monosacáridos, la D-glucosa y la D-fructosa cuyas propiedades quimiotácticas han sido descritas para *Leishmania*. Los resultados sugieren que el «ensayo de los capilares, dos cámaras» constituye un método de detección confiable, cuantitativo, reproducible y sencillo de la quimiotaxis en *Leishmania*. Adicionalmente, confirman que las hexosas ensayadas, inducen una respuesta quimiotáctica positiva sobre los parásitos, proporcional al incremento de concentración de las mismas. Finalmente, demuestran que el tiempo de incubación y la osmolalidad de las soluciones empleadas determinan la capacidad migratoria de los parásitos. Esta optimización garantiza la reproducibilidad y la validez de este método como una técnica útil para la evaluación cuantitativa de la quimiotaxis en *Leishmania*.

Palabras clave: quimiotaxis, *Leishmania*, ensayo de los capilares-dos cámaras.

Abstract

Chemotactic responses play a significant role, both during *Leishmania braziliensis* differentiation through its life cycle and during infection, a process that inoculates parasites into a mammalian host and results in the acquisition of the disease leishmaniasis. This paper reviews the methods described until now to assess chemotaxis *in vitro* in *Leishmania sp.* Further, the present study describes the adaptation of a modified «two-chamber capillary chemotaxis assay» as a technique useful for the quantitative evaluation of chemotaxis in *Leishmania*. In order to ensure reproducibility and validity of this method we standardized key parameters to assess the chemotactic response such as the cell density in the outer chamber, incubation time, the concentration range of chemotactic agents and the osmolality of the solutions. In addition, the effectiveness of this sensible and reproducible method for the evaluation of parasite migration was validated by the use of chemical gradients of the monosaccharide D-glucose and D-fructose, compounds with showed chemotactic properties in *Leishmania*. Results presented herein demonstrate that monosaccharide induce a positive chemotactic effect on parasites, depending on the concentration range. Interestingly, both the time course and the osmolality of the solution influence the migration capacity of the parasites. Our results suggest that this novel and improved methodology quantitatively evaluates the taxis of *Leishmania* towards/against gradients of different substances in a rapid and reliable way.

Key words: Chemotaxis, *Leishmania*, two-chamber capillary chemotaxis assay.

¹ Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

² Department of Genetics, Cell and Immunobiology Semmelweis University, Budapest, Hungary.

* Correspondencia: Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Fax: +58 212 6053415. E-mail: emilid68@gmail.com

Introducción

Existen células que lejos de ser estáticas son móviles. Ellas detectan la presencia de señales extracelulares y orientan sus movimientos en la dirección de gradientes de concentración de las moléculas tóxicas. Este proceso, llamado *quimiotaxis*, es fundamental en diversas funciones celulares tales como, el suministro de nutrientes en los procariotas, la formación de estructuras multicelulares en protozoos, el rastreo de las bacterias por los neutrófilos y la organización de los embriones en los metazoos (Van Haastert y Devreotes, 2004).

En teoría, una célula para orientar sus movimientos podría utilizar el aspecto espacial del gradiente del agente quimiotáctico, o alternativamente las señales temporales generadas cuando la célula se mueve en un gradiente estático. En el caso de los procariotas, debido a su tamaño (1-2 μm) sólo pueden usar el componente temporal de los estímulos. Ellos se mueven de acuerdo a lo que se denomina un «paseo aleatorio» con movimientos en todas las direcciones que son interrumpidos por caídas súbitas («tumbles»). Cuando se encuentran con un cambio en la concentración del agente quimiotáctico la frecuencia de los «tumbles» disminuye y el desplazamiento en una dirección se prolonga en el tiempo (Van Haastert y Devreotes, 2004; Wang, 2010).

Por su parte, las células eucariotas por ser grandes (10-20 μm de diámetro), les permite procesar tanto temporal como espacialmente la información. Ellas detectan el gradiente del agente quimiotáctico y responden a cambios de concentraciones muy pequeñas entre sus polos (2 -10%), desplazándose hacia el mismo (Van Haastert y Devreotes, 2004; Devreotes y Janetopoulos, 2003). Además, expresan una variedad de receptores de membrana y vías de señalización intracelular que les permiten organizar su respuesta fisiológica; es decir, poseen toda la maquinaria celular necesaria para detectar y responder a gradientes químicos, entre otros (Van Haastert y Devreotes, 2004; Wang, 2010). En resumen, la naturaleza de las células móviles varía de acuerdo al tipo celular al que hacemos referencia. Así, los granulocitos, macrófagos y linfocitos *in vitro* tienen la habilidad de migrar hacia gradientes de concentración de varias sustancias. La naturaleza exacta de cómo los leucocitos reciben una señal y la traducen en movimiento direccional involucra varios eventos. La movilidad leucocitaria es de tres tipos: *aleatoria* (activa, esporádica, espontánea y no direccional), *quimioinesis* (aumentada pero no vectorial, inducida por excitantes químicos y requiere receptores celulares) y *quimiotaxis* (aumentada y vectorial a lo largo de

gradientes de concentración de una sustancia química o quimiotaxina), que demanda un sistema de receptores y un mecanismo de orientación acoplado al de movilidad (Rojas-Dotor y col., 2009)

En animales y microorganismos que poseen un cilio o flagelo, la motilidad es proporcionada por este organelo, el cual es fundamental para la alimentación celular, desarrollo y la reproducción. Para algunos protistas, como es el caso de la *Leishmania*, uno de los estadios durante su ciclo de vida es una forma móvil flagelada; y el flagelo acoplado y su motilidad son integrales para la morfogénesis y la división celular. En los tripanosomátidos, se ha sugerido que la inhibición de la motilidad flagelar pudiera ser un nuevo blanco en el diseño de drogas para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos parásitos (Ginger y col., 2008).

Debido a que los fenómenos que caracterizan la motilidad de células humanas como son la formación de pseudópodos, la polarización y el sensor direccional, no han sido descritos para los tripanosomátidos, los estudios recientes en estos protozoos se han enfocado en la estructura y composición del flagelo. El flagelo puede ser comparado con un órgano sensor crítico debido a su posición y orientación en la superficie celular. Posee un alto contenido en moléculas sensoras (receptores o efectores), las cuales son dinámicamente controladas por un proceso llamado transporte intraflagelar: movimiento bidireccional de partículas entre la membrana del flagelo y el axonema (Rotureau y col., 2009).

Los parásitos del género de la *Leishmania* causan una enfermedad con síntomas diversos que van desde las lesiones cutáneas autolimitantes, pasando por las mucocutáneas no cicatrizantes, hasta la leishmaniasis visceral que es letal si no es tratada. Aproximadamente 350 millones de personas de 88 países están en riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que al menos 12 millones de personas están infectadas, y que cerca de 1-2 millones de nuevos casos ocurren cada año (OMS, 2010).

Los parásitos de la *Leishmania* transcurren a lo largo de su ciclo de vida por dos estadios con características morfológicas específicas; así como una morfología flagelar diferente. Los amastigotes que se alojan en el fagolisosoma de las células del sistema reticuloendotelial del hospedero y los promastigotes de vida extracelular. La *Leishmania* se comporta como parásito intracelular en macrófagos de vertebrados mamíferos y como parásito extracelular en el tubo digestivo del insecto vector y es el estadio que puede mantenerse en los cultivos *in vitro*. Cuando el insecto vector ingiere sangre de un mamífero, estos

regurgitan promastigotes en la piel del hospedador los cuales son reconocidos por los receptores de superficie en los macrófagos y células dendríticas para luego ser fagocitados. Durante el ciclo de vida de la *Leishmania*, el flagelo muestra cambios en su longitud, punto de inserción y posición; presumiblemente como una respuesta a señales ambientales (Rotureau y col., 2009). La superficie celular está cubierta de lipofosfoglicanos y receptores de membrana especializados que se distribuyen a lo largo del flagelo, el bolsillo flagelar y en toda la superficie de la célula. Algunos de los receptores están especializados para detectar cambios en los gradientes de moléculas fundamentales para su supervivencia (Handman y col., 2008). Presentan un kinetoplasto cercano al bolsillo flagelar (Molineux y Killick-Kendrick, 1987).

El flagelo, además de su función en la motilidad, juega un papel clave en la división celular y la adhesión del parásito al epitelio del insecto. Además, recientemente se ha demostrado que la motilidad es esencial para la supervivencia de la forma del parásito que se encuentra en el torrente sanguíneo del mamífero (Gadelha y col., 2007). Por lo tanto, la evidencia sugiere que la respuesta migratoria (quimiotáctica) es decisiva en todo el ciclo de vida de la *Leishmania*.

Ahora bien, se ha demostrado en la *Leishmania* que puede moverse hacia un gradiente de concentración en línea recta por pocos segundos (~ 10 seg) sin cambios bruscos de dirección. Generalmente antes de este cambio brusco realizan un movimiento denominado «tumbling» (volteretas), similares a los descritos en bacterias (Barros y col., 2006). El movimiento de estas células flageladas es libre, al azar y tiene dos componentes: el golpeteo del flagelo y el desplazamiento resultante de la traslación (Gadelha y col., 2007).

La comprensión de los fenómenos quimiotácticos es útil para ahondar en el conocimiento de la fisiología y el comportamiento de las células móviles, incluyendo la *Leishmania*. Por otra parte, la quimiotaxis es un requisito fundamental de la interacción exitosa entre la célula hospedera y el parásito (*Leishmania*), ya que numerosas señales químicas determinan el reconocimiento mutuo y las respuestas migratorias involucradas en el establecimiento de la infección (Pozzo y col., 2009).

En tal sentido, la evaluación de la quimiotaxis en la *Leishmania* ha evolucionado desde el primer ensayo descrito en 1983 por Bray (Tabla I), en el cual una suspensión de promastigotes es colocada dentro de una cámara de Wilkinson. Esta consiste de jeringas desechables de tuberculina (1 ml), cuyo fondo es-

tá recortado y cubierto con un filtro Millipore (poros 1.2 μm). Las cámaras se sumergen hasta el nivel de la suspensión de los promastigotes en la solución con el agente quimiotáctico y se incubaban por un período determinado. Posteriormente, los filtros son fijados en alcohol etílico, removidos y teñidos con hematoxilina de Harris. Finalmente, los promastigotes fijados al filtro son contados en un microscopio de luz (Bray, 1983). Debido a que el método de Bray (1983) presenta la desventaja que requiere de altas concentraciones del quimioatrayente, Oliveira y colaboradores (2000) desarrollaron un método en el cual se construye un gradiente discontinuo de la sustancia a analizar, en el que los diferentes tubos capilares contienen concentraciones crecientes del agente quimiotáctico, utilizando agarosa como soporte. Seguidamente los tubos son sumergidos horizontalmente en la suspensión de promastigotes. Después de la incubación, la capacidad de la sustancia para promover la migración es evaluada al contar los parásitos presentes dentro de los tubos capilares (Tabla I). Estos autores demostraron por primera vez en la *Leishmania* la capacidad quimiotáctica *in vitro* de los monosacáridos como glucosa y fructosa.

Posteriormente, Leslie y col. (2002) modificaron el ensayo previamente descrito por Oliveira y col. (2000) (Tabla I). En el mismo se emplean capilares de vidrio llenos con una solución de agarosa preparada con el buffer utilizado para suspender los promastigotes y con tubos adicionales llenos con el soluto quimioatrayente. Seguidamente, todos los capilares son colocados de forma vertical en un tubo de «bijou». El extremo abierto de cada capilar es sumergido en la suspensión de promastigotes. Luego el sistema se incuba a temperatura ambiente y las células que migraban hacia los capilares se determinan usando una cámara de Neubauer (Leslie y col., 2002; Barros y col., 2006). El desarrollo de esta técnica permitió interpretar los resultados de Oliveira y col. (2000) a la luz de una metodología más sofisticada. Así Leslie y col. (2002) concluyeron que el movimiento de los promastigotes hacia la glucosa y la fructosa es una respuesta fundamentalmente quimiotáctica, aunque alguna de las mismas podría incluir osmotaxis.

Barros y col. (2006), introdujeron modificaciones sustanciales que permitieron estudiar más sistemáticamente los mecanismos involucrados en estas respuestas fisiológicas. Su método determina el tiempo promedio en el que el promastigote permanece moviéndose en línea recta, en ausencia o presencia de una concentración homogénea del agente tático en estudio. Con este modelo fue posible distinguir las respuestas quimiotácticas de las osmotácticas en los promastigotes de *Leishmania*.

Tabla I

Estudio comparativo de las técnicas desarrolladas para evaluar quimiotaxis *in vitro* en *Leishmania sp.*

Autores/ Parámetros	Bray y col., 1983	Oliveira y col., 2000	Leslie y col., 2002	Roychoudhury col., 2006	Barros y col., 2006	Pozzo y col., 2009	Ensayo presentado
Orientación del sistema	vertical	horizontal	vertical	vertical	horizontal	horizontal	vertical
Utiliza gradiente de concentración	si	si	si	si	no	si	si
Interfase celula-quimioatrayente	con filtro	sin filtro	sin filtro	con filtro	sin filtro	sin filtro	sin filtro
Tipos de quimioatrayentes	rafinosa manosa sacarosa maltosa metilbiosa	glucosa fructosa sacarosa rafinosa manosa galactosa maltosa melibiosa	glucosa fructosa manosa inositol	Quimiocinas CCL2 CCL3 CCL4 CCL5	sacarosa manitol glicina guanósina	glucosa	glucosa, fructosa
Incubación	30 min	1 hr	1 hr	0-2 horas	15 min	1-10 hr	30 min
Duración ¹	TF	TF	TF	TF	TF	TR	TF
Evaluación ²	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO
Sensibilidad	razonable	Razonable	Razonable	buena	Buena	buena	
Automatización	pobre	pobre	pobre	buena	buena	buena	

1TF= tiempo final; TR tiempo real 2MO= microscopio óptico; CCL2: MCAF, JE; CCL3: MIP-1 α ; CCL4: MIP-1 β ; CCL5: RANTES

Finalmente, los estudios más recientes descritos en la literatura utilizan las denominadas «pinzas ópticas» (optical tweezers) para cuantificar la quimiotaxis en *Leishmania amazonensis* (Pozzo y col., 2009). Para ello, se desarrolló una técnica para medir en tiempo real las fuerzas vectoriales bidimensionales (x, y) y la direccionalidad del movimiento flagelar (Tabla I) de los parásitos en presencia de gradientes de concentraciones de cualquier tipo de sustancia química. La utilidad de este método estriba en su capacidad de cuantificar la taxis de *Leishmania* en gradientes de diversos tipos de estímulos químicos o físicos.

En vista de la evidencia, en el presente estudio se realizó la modificación del ensayo de «los capilares-dos cámaras» inicialmente desarrollado por Kóhidai (1995), a fin de aplicarlo al estudio de la quimiotaxis en promastigotes de *Leishmania* y así lograr la estandarización de parámetros fundamentales y la validación de esta técnica en *Leishmania*, que permita cuantificar sistemáticamente y de forma reproducible las respuestas migratorias de este parásito. Debido a la importancia de la quimiotaxis en el establecimiento exitoso de la infección, este ensayo re-

sultará potencialmente útil para evaluar la interacción parásito-hospedero y por ende nuevos blancos para el desarrollo de fármacos antiinfectivos.

Materiales y métodos

CEPA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para realizar los ensayos se utilizó la cepa de referencia *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/84/LTB300) gentilmente cedida por la Dra. Noris Rodríguez, (Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela). Los promastigotes de *Leishmania* fueron cultivados a 26 °C en una base semisólida de agar sangre suplementado con medio glucosa-NaCl (glucosa 1,5%, NaCl 0,85%, p.v.), hasta el día del experimento.

Partiendo de un cultivo de promastigotes de *L. braziliensis* en fase de crecimiento logarítmica tardía las células fueron centrifugadas a 1500 x g por 10 min a temperatura ambiente (TA). El medio de cultivo fue descartado y las células resuspendidas en buffer A: 10 mM Hepes (pH 7,3); 132 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 1 mM CaCl₂ y 0,5 mM MgCl₂; osmolalidad = 288

mOsm / kg). Nuevamente las células fueron centrifugadas (lavadas) y el buffer descartado. Finalmente, las células fueron resuspendidas en un volumen de buffer A necesario para obtener la densidad celular requerida. El buffer A fue usado en todos los experimentos como solución control para probar la quimiotaxis de los parásitos.

SOLUCIONES DE CARBOHIDRATOS

Las soluciones madres de los carbohidratos D-glucosa (100 mM) y D-fructosa (300 mM) fueron preparadas en buffer A y conservadas a -20 °C hasta el día del experimento. Las diluciones de los carbohidratos fueron preparadas frescas para cada experimento.

ENSAYO DE LOS CAPILARES-DOS CÁMARAS

La respuesta quimiotáctica de los promastigotes de *Leishmania braziliensis* fue medida con el ensayo de los capilares-dos cámaras originalmente desarrollado por Köhldai (1995) y modificado por nosotros.

En nuestro sistema de dos cámaras (figura 1), ocho puntas de una pipeta multicanal fueron usadas como la cámara interna y los pozos de una microplaca de 96 pozos utilizados como la cámara externa. Las puntas fueron llenadas con 100 μ l de la sustancia experimental (control o concentraciones crecientes del carbohidrato). Los pozos de la microplaca fueron llenados con 200 μ l de la suspensión de promastigotes de *L. braziliensis*. Las células fueron incubadas a distintos tiempos, para estandarizar dicho parámetro. Al finalizar el periodo de incubación las células que migraron a la cámara interna fueron fijadas en solución de formaldehído al 2% en PBS (0,05 M buffer fosfato, pH 7,2 y 0,9 M NaCl). El conteo de los parásitos se realizó en cámara de Neubauer.

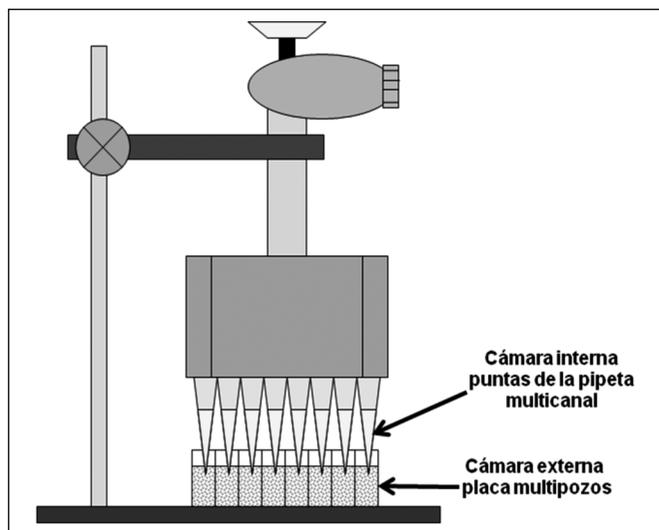


Figura 1. Sistema del ensayo de los capilares-dos cámaras. Las dos cámaras están conectadas a través de los capilares (puntas de la pipeta multicanal) que contienen la sustancia a ensayar.

ESTANDARIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la reproducibilidad y la validez del ensayo como un método confiable para evaluar la respuesta quimiotáctica se estandarizaron parámetros fundamentales como la densidad celular en la cámara externa, el tiempo de incubación del experimento, el rango de concentraciones de los agentes quimiotácticos y la osmolalidad de las soluciones. Así, la densidad celular óptima en la cámara externa fue escogida de acuerdo a ensayos previos descritos en la literatura (4×10^7 células ml^{-1}) (Bray, 1983; Oliveira y col., 2000; Leslie y col., 2002). El tiempo óptimo de incubación se determinó evaluando la respuesta quimiotáctica a los 15, 30, 45 y 60 min. Los gradientes de monosacáridos fueron elegidos de acuerdo a lo descrito por Oliveira y colaboradores (2000), empleando concentraciones de D-glucosa desde 4 hasta 100 mM y de D-fructosa desde 4 hasta 225 mM. La osmolalidad de las soluciones (mOsm/kg) fue medida con un osmómetro (The Advanced™ Osmometer Model 3D3; Advanced Instruments, INC. USA), con una reproducibilidad (0 a 400 mOsm/kg) del 2% (1 D.S.). Todas las soluciones utilizadas en este estudio fueron evaluadas por este método.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.) del número de células que migraron a la cámara interna (N= al menos 5 experimentos). La significancia estadística de las diferencias entre las células expuestas a los carbohidratos y el control fueron determinadas mediante la prueba de la *t de Student*. El análisis y la representación de los datos se realizaron con el software Graph Pad Prism, 5ª versión.

Resultados

DENSIDAD CELULAR

Para validar el ensayo de los capilares-dos cámaras con el fin de cuantificar la quimiotaxis en *L. braziliensis*, se estandarizaron los parámetros más importantes que se requieren para evaluar las respuestas migratorias. Por lo tanto, inicialmente se seleccionaron dos densidades celulares (4×10^7 y 8×10^7 células ml^{-1}) y se ensayaron las propiedades quimiotácticas de una solución de D-glucosa 25 mM, comparándola con el buffer A. Nuestros resultados demostraron que una densidad de 4×10^7 células ml^{-1} fueron suficientes para obtener una respuesta quimiotáctica significativa, aproximadamente 200% ($p=0,004$) con respecto al buffer A (figura 2). Por esta razón, los

experimentos sucesivos se realizaron utilizando esta densidad celular.

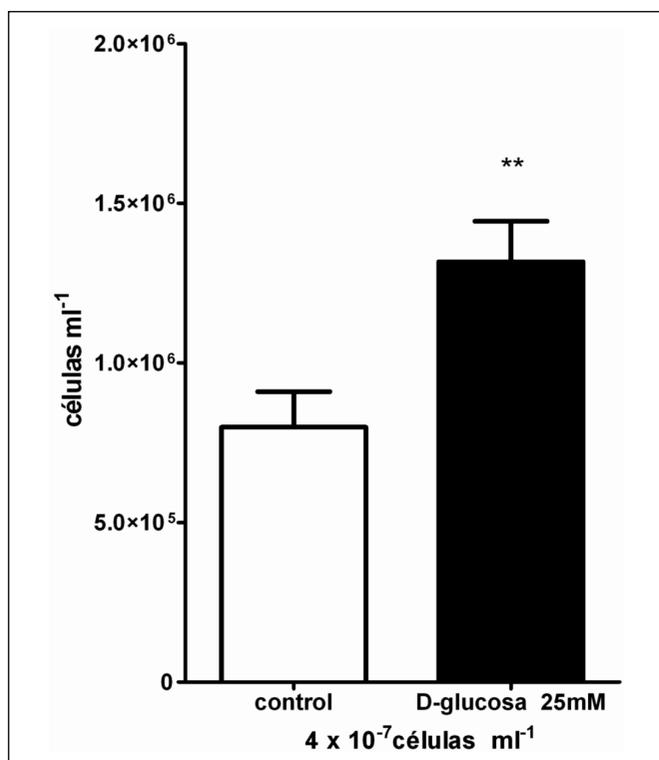


Figura 2. Efecto de la densidad celular sobre la respuesta quimiotáctica producida por la D-glucosa 25 mM en promastigotes de *L. braziliensis*. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de la *t* de Student. Los valores representan la media \pm el E.E.M. (N=5-8); ***p*<0,01 comparado con el control.

TIEMPO DE INCUBACIÓN

Para estandarizar el ensayo de los capilares-dos cámaras se evaluó la respuesta quimiotáctica a varios períodos de incubación. Nuestros resultados sugieren que el tiempo óptimo de incubación es de 30 min (figura 3). Períodos más cortos (15 min) no fueron suficientes para estimular una respuesta migratoria significativa. Períodos más largos de incubación (45 y 60 min) resultaron en un incremento significativo de la migración de células hacia la cámara interna. Sin embargo, debido a que a estos tiempos prolongados los gradientes de concentración de monosacáridos fueron perturbados, la respuesta migratoria podría incluir tanto el componente quimiotáctico como el quimiocinético. Puesto que el objetivo fue medir exclusivamente la respuesta quimiotáctica, se utilizaron 30 minutos como tiempo de incubación.

CONCENTRACIONES DE LOS MONOSACÁRIDOS

Se evaluó la respuesta quimiotáctica de los promastigotes de *L. braziliensis* en presencia de concentraciones crecientes de D-glucosa y D-fructosa. Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5. Los expe-

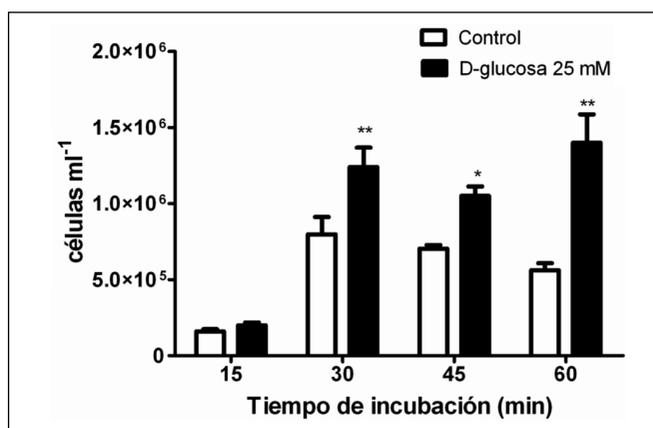


Figura 3. Efecto del tiempo de incubación sobre la respuesta quimiotáctica producida por la D-glucosa 25 mM en promastigotes de *L. braziliensis*. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de la *t* de Student. Los valores representan la media \pm el E.E.M. (N= 5-14); **p*<0,05; ***p*<0,01 comparado con el control.

rimentos realizados con D-glucosa demostraron que esta hexosa promueve significativamente la migración del parásito a las concentraciones de 25, 50 y 100 mM (25 mM = 100 mM >100mM) con respecto al control (figura 4). Las concentraciones menores de 25 mM (0 - 16 mM) no produjeron respuesta quimioatrayente en *L. braziliensis*. Así mismo, la D-fructosa indujo una respuesta quimioatrayente significativa solamente a las concentraciones de 200 y 225 mM (figura 5).

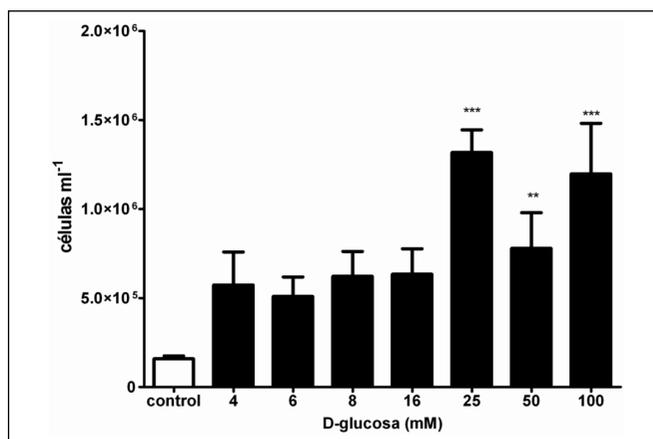


Figura 4. Efecto de las concentraciones crecientes de la D-glucosa sobre la migración *in vitro* de promastigotes de *L. braziliensis*. Los valores representan la media \pm E.E.M. (N= 5-8); ***p*<0,01;****p*<0,001 comparado con el control.

EFFECTO DE LA OSMOLALIDAD EXTERNA SOBRE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS

Para descartar que la osmolalidad de las soluciones constituya una variable que afecta la respuesta migratoria de los promastigotes, se determinó este parámetro en todas las soluciones a las concentraciones utilizadas. Posteriormente, se comparó la actividad quimiotáctica a cada concentración (mM) con los

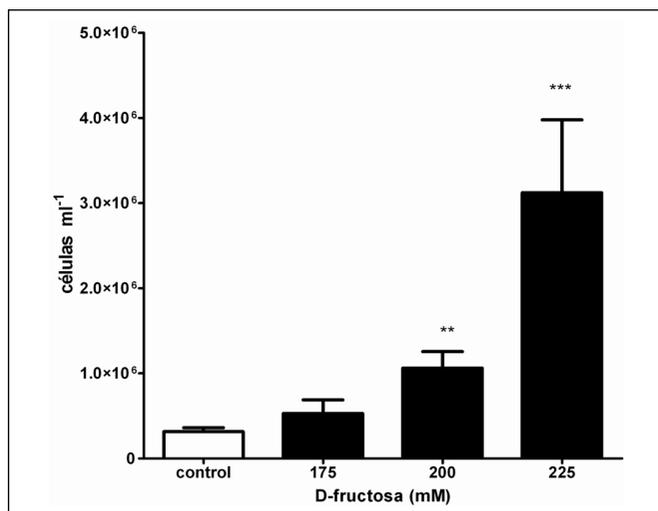


Figura 5. Efecto de las concentraciones crecientes de D-fructosa sobre la respuesta quimiotáctica *in vitro* producida en promastigotes de *L. braziliensis*. Los valores representan la media \pm EEM (N= 5-8); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado con el control.

valores de osmolalidad de las soluciones de los carbohidratos (Tabla II y III).

Nuestros resultados muestran que la osmolalidad de las soluciones de los carbohidratos fue proporcional a su concentración (Tablas II y III). La respuesta de los promastigotes de *L. braziliensis* a los gradientes osmóticos fue diferente para cada carbohidrato ensayado. En la presencia de D-glucosa un incremento en la osmolalidad de 22 mOsm/kg fue suficiente para detectar una migración significativa con respecto al control (Tabla II). Por otra parte, la migración de parásitos incubados con D-fructosa ocurre cuando el incremento en la osmolalidad es de, al menos, 212 mOsm/Kg comparado con el control (Tabla III).

Tabla II

Efecto de la concentración y la osmolalidad de la D-glucosa sobre la migración *in vitro* de los promastigotes de *L. braziliensis*

D-Glucosa (mM)	Actividad quimiotáctica ^a % número de células que migraron (control=100%)	Gradiente osmótico ^b mOsm/kg
4	122,00 \pm 20.28	3,00 \pm 0.47
6	124,24 \pm 15.43	5,67 \pm 0.82
8	151,14 \pm 19.17	7,67 \pm 1.41
16	158,07 \pm 25.93	16,34 \pm 1.25
25	269,00 \pm 62.62*	22,00 \pm 0.47
50	183,22 \pm 21.62*	48,00 \pm 1.25
100	293.57 \pm 45.47*	89,00 \pm 0.47

Los valores representan el promedio \pm E.E.M. a Porcentaje de células que migraron con respecto al control. (n=5-8). b Incremento en la osmolalidad (mOsm/kg) con respecto al control (n=3).

* $p < 0,05$, fue considerado estadísticamente significativo.

Tabla III

Efecto de la concentración y la osmolalidad de la D-fructosa sobre la migración *in vitro* de los promastigotes de *L. braziliensis*

D-Fructosa (mM)	Actividad quimiotáctica ^a % número de células que migraron (control=100%)	Gradiente osmótico ^b mOsm/kg
175	178,7 \pm 34.5	184 \pm 0.47
200	231,57 \pm 81.85*	212.66 \pm 2.05
225	448,31 \pm 97.29**	242 \pm 1.7

Los valores representan el promedio \pm E.E.M. ^aPorcentaje de células que migraron con respecto al control (n=5-8). ^bIncremento en la osmolalidad (mOsm/kg) con respecto al control (n= 3). * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$, fueron considerados estadísticamente significativos

Discusión

El estudio de los fenómenos involucrados en la quimiotaxis es esencial para entender las interacciones hospedero-parásito. La comprensión de esta respuesta celular podría ser útil para identificar los pasos fundamentales que intervienen durante la interacción exitosa, el reconocimiento mutuo y las respuestas migratorias que determinan la infección. Ese es el caso en la *Leishmania* cuando interactúa con sus hospedadores, el invertebrado (insecto) y el macrofago como célula hospedera en el mamífero (seres humanos).

La descripción de los fenómenos de migración celular data desde la época del desarrollo del microscopio. Sin embargo, fue a partir de finales del siglo XIX cuando investigadores como Pfeffer (1888) desarrollaron ensayos de quimiotaxis empleando capilares. Este ensayo, posteriormente mejorado por Adler (1973), es el más utilizado actualmente para cuantificar la quimiotaxis. La optimización continua de este método ha permitido estudiar y comprender los fenómenos de quimiotaxis y otros tipos de taxis como la osmotaxis, en diversos microorganismos y tipos celulares (Barros y col., 2006; Rao y col., 2008; Miller y col., 2009).

El presente trabajo constituye una propuesta en la que se combinan dos técnicas, el ensayo de las dos cámaras y la técnica de los capilares, para estudiar quimiotaxis en *Leishmania*. Debido a la importancia de mantener la reproducibilidad de los datos y el control de calidad de los resultados a obtener, el estudio que aquí se presenta describe la estandarización y la validación de este método. Los resultados obtenidos demuestran que los parámetros óptimos para medir quimiotaxis en *Leishmania braziliensis* son una densidad celular de 4×10^7 promastigotes ml⁻¹ en la cámara externa y 30 min de incubación a temperatura ambiente.

Para validar el método, se ensayaron dos carbohidratos cuyas propiedades como agentes atrayentes habían sido descritas (Oliveira y col., 2000). Los resultados confirman que la D-glucosa es quimioatrayente para los promastigotes a una concentración de 25 mM (Δ 22mOsm/Kg). La concentración más elevada utilizada de este carbohidrato (100 mM, Δ 89 mOsm/Kg), también aumentó significativamente la respuesta migratoria. Para parásitos expuestos a D-fructosa, fue necesario incrementar diez veces la concentración del carbohidrato para detectar migración de los parásitos (200 y 225 mM, Δ 212 y 242 mOsm/Kg, respectivamente). Estos datos sugieren que los promastigotes de *L. braziliensis* detectan y responden con respuestas migratorias a incrementos menores de concentración y osmolalidad de D-glucosa que de D-fructosa (figuras 4 y 5; Tablas II y III).

Se ha propuesto que la migración de los promastigotes de *Leishmania* en presencia de una concentración de D-glucosa de 100mM se debe a una respuesta osmotáctica (Leslie y col., 2002). Al analizar nuestros resultados se evidencia que la osmolalidad de las soluciones de D-glucosa 100 mM (Δ 89 mOsm/kg) y de D-fructosa 100 mM (Δ 105 mOsm/kg) son similares; sin embargo, a diferencia de la D-glucosa, la D-fructosa no produjo una respuesta migratoria significativa a esta concentración. Si la respuesta a la D-glucosa fuese exclusivamente osmotáctica, un efecto similar (es decir, una respuesta migratoria) debería haber ocurrido con la D-fructosa 100 mM (datos no mostrados). Por ello, se sugieren que la respuesta migratoria a la D-glucosa 100 mM se debe a una combinación de eventos quimiotácticos y osmotácticos. Barros y col. (2006) llegaron a una conclusión similar al demostrar que soluciones de NaCl, Hepes y guanosina que aportan más osmolitos a concentraciones similares a las utilizadas para glicina, lactosa, manitol y sacarosa, por ende aumentan más la presión osmótica que estos; sin embargo, no produjeron una mayor respuesta migratoria.

Se sabe que cambios en la osmolalidad del medio modifican la fisiología celular de la *Leishmania*. Así, un aumento en la osmolalidad de 308-625 mOsm/kg disminuye levemente la tasa de crecimiento de los parásitos (Darling y Blum, 1990; Burrows y Blum, 1991, Viera y col., 1996) y alteran la morfología celular (Darling y Blum, 1990); mientras que una reducción (aguda) de la osmolalidad promueve la liberación de aminoácidos, especialmente de alanina, cambia la morfología y el volumen celular (Darling y Blum, 1990) y disminuye la viabilidad celular (LeFurgey y col., 2001). Aún más, el estrés agudo producido por aumentos de 310 mOsm/kg (de 305 a 615 mOsm/kg) durante 10 min se traduce en cambios menores en el contenido citoplasmático de iones y elementos (LeFurgey y col., 2001), mas no en modificaciones importantes de la

fisiología celular. Por ello, y para garantizar la integridad celular, en los experimentos aquí descritos se utilizaron soluciones con osmolalidades ligeramente superiores a las del control ($<$ Δ 89 mOsm/kg para D-glucosa; $<$ Δ 242mOsm/kg para D-fructosa) y tiempos de incubación cortos, de 30 min, que no alteran las actividades metabólicas del parásito, garantizan su movilidad y minimizan la posibilidad de mezclar respuestas quimiotácticas con respuestas osmotácticas.

Nuestros resultados indican que la D-glucosa (25 mM) fue el estímulo quimiotáctico más potente observado. La expresión de receptores con amplia gama de afinidades podría explicar la susceptibilidad de los parásitos a cambios menores de concentración y osmolalidad de D-glucosa con respecto a D-fructosa (Oliveira y col., 2000, Leslie y col., 2002, Barros y col., 2006).

En conclusión, en el presente trabajo se adaptó el método de los capilares-dos cámaras para medir la actividad migratoria de *L. braziliensis* en presencia de gradientes de sustancias simples (hexosas). Esta metodología constituye una técnica simple, eficaz y reproducible de detección confiable, rápida y sencilla que permite evaluar cuantitativamente *in vitro* la quimiotaxis de promastigotes de *L. braziliensis*, hacia/ contra un gradiente de cualquier tipo de molécula. La confiabilidad del método estriba en que la migración se determina en condiciones en las cuales el parásito debe movilizarse en contra de la gravedad, con osmolalidad controlada de las soluciones y durante un tiempo de incubación que garantice la cuantificación de la quimiotaxis y en el cual no deben estar ocurriendo procesos de osmotaxis.

El método constituye una herramienta fiable y útil en el diagnóstico clínico de la leishmaniasis, así como en el desarrollo de nuevos fármacos anti-infectivos. Sus aportes resultan fundamentales para comprender el comportamiento quimiotáctico y migratorio de una población de parásitos, tal y como ocurre durante la interacción parásito-hospedero en una infección natural, por lo que la metodología aquí descrita y validada resulta de gran fortaleza ya que la migración poblacional es un fenómeno complejo que requiere de eventos múltiples, incluso de interacción parásito-parásito que se suceden cuando se produce una infección exitosa.

Desde que esta tecnología constituye una primera aproximación en la detección de moléculas o drogas que afectan la migración del parásito, nos permitimos proponer su uso como el paso inicial en la discriminación de nuevas drogas contra la *Leishmania*, ya que permite evaluar un tipo de taxis (quimioatrayente o quimiorepelente) en forma rápida para discriminar si existe o no una respuesta.

Finalmente, desde que la inhibición de la motilidad flagelar ha sido propuesta como blanco para el estudio de nuevas drogas contra tripanosomas africanos (Ginger y col., 2008), el estudio de la quimiotaxis en diferentes cepas de *Leishmania* sería de mucha utilidad en los diversos fenotipos los cuales deberían expresar diferencias en las respuestas migratorias. Por ello, mediante el empleo de este método se podría obtener una aproximación a la respuesta fisiológica primaria. Con ello se daría paso al enfoque bioquímico, celular, proteómico y genético, lo que debería conducir a un punto de vista integrado de la implicación de la motilidad del parásito en su ciclo de vida, virulencia o infectividad.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los proyectos del CDCH-UCV: PI-09-00-7084-2008; PG-09-00-7378-2008; así como por el Fondo de la Coordinación de investigación de la Facultad de Medicina de la UCV CI 3/2008. Los autores agradecen a la Dra. Maritza Padrón-Nieves por su apoyo académico y a la Sra. Pilar Rodríguez por su asistencia técnica.

Referencias bibliográficas

- Barros V, Oliveira J, Melo M, Gontijo N. 2006. *Leishmania amazonensis*: chemotactic and osmotactic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Exp Parasitol* 112(3): 152-157.
- Bray RS. 1983. *Leishmania*: chemotactic responses of promastigotes and macrophages in vitro. *J. Protozool* 30(2): 322-329.
- Burrows C, Blum JJ. 1991. Effect of Hyper-osmotic stress on alanine content of *Leishmania major* promastigotes. *J Protozool* 38(1): 47-52.
- Darling TN, Blum JJ. 1990. Changes in the shape of *Leishmania major* promastigotes in response to hexoses, proline, and hypoosmotic Stress. *J Protozool* 37(4): 267-272.
- Devreotes P, Janetopoulos C. 2003. Eukaryotic Chemotaxis: distinction between directional sensing and polarization. *J Biol Chem* 278(23): 20445-20448.
- Gadelha C, Wickstead B, Gull K. 2007. Flagellar and ciliary beating in trypanosome motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 629-643.
- Ginger L, Portman N, McKean P. 2008. Swimming with protons: perception, motility and flagellum assembly. *Nat Rev Microbiol* 8(11): 838-850.
- Handman E, Papenfuss A, Speed T, Goding J. *Leishmania* Surface Proteins. En: *Leishmania after de Genome*. Eds: Myler P, Fasel, N. Caister Academic Press, 2008, pp. 177-204.
- Köhidaí L, Lemberkovics E, Csaba G. 1995. Molecule dependent chemotactic responses of *Tetrahymena pyriformis* elicited by volatile oils. *Acta Protozool* 34: 181-185.
- LeFurgey A, Ingram P, Blum JJ. 2001. Compartmental responses to acute osmotic stress in *Leishmania major* result in rapid loss of Na⁺ and Cl⁻. *Comp Biochem Physiol. Part A: Mol Integ Physiol* 128: 385-394.
- Leslie G, Barrett M, Burchmore R. 2002. *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. *Exp Parasitol* 102(2): 117-120.
- Miller LD, Russel MH, Alexandre G. 2009. Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. *Adv APPL Microbiol* 66:53-76.
- Molineux W, Killick-Kendrick R. *Leishmaniasis in Biology and Medicine*. En: *Leishmaniasis: Biology and Medicine*. W Peters y R Killick-Kendrick. Eds. New York. Academic Press. 1987, pp. 794-845.
- Oliveira J, Melo M, Gontijo N. 2000. A Sensitive method for assaying chemotactic responses of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 96:187-189.
- Pfeffer W. 1888. Ueber chemotaktische bewegungen von bakterien flagellaten und volvocineen. *Unter Botany Institute Tubingen* 2: 582-661.
- Pozzo LY, Fontes A, de Thomaz AA, Santos BB, Farias P, Ayres DC, Giorgio S, Cesar CL. 2009. Studying taxis in real time using optical tweezers: applications for *Leishmania amazonensis* parasites. *Micron* 40: 617-620.
- Rao CV, Glekas GD, Ordal GW. 2008. The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis. *Trends Microbiology* 16: 480-487.
- Roychoudhury K, Dasgupta B, Sena P, Laskayb T, Solbachb W, Dea T, Roya S. 2006. Evidence of direct interactions between the CC-chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 150:374-377.
- Rojas-Dotor S, Pérez-Ramos J, Rico-Rosillo MG. 2009. Quimiotaxis y enfermedad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 47 (1): 51-56.
- Rotureau B, Morales MA, Bastin P, Spath G. 2009. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? *Cell Microbiol* 11(5):710-718.
- Van Haastert P, Devreotes P. 2004. Chemotaxis: Signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 626-63.
- Vieira LL, Lafuente E, Gamarro F, Cabantchik Z. 1996. An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem J* 319: 691-697.
- Wang F. 2010. The Signaling Mechanisms Underlying Cell Polarity and Chemotaxis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 14: 1-16.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Technical Report Series 2010. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Disponible en http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf

Recibido: 24 de agosto de 2011
Aceptado: 07 de octubre de 2011