

Curso 2003/04
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/4
I.S.B.N.: 84-7756-590-2

ANA CRISTINA GONZÁLEZ GARCÍA

Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles
para la inmunoprotección frente a leishmaniasis

Director
ENRIQUE MARTÍNEZ CARRETERO
BASILIO VALLADARES HERNÁNDEZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS:

Muchas veces he escrito en mi mente los agradecimientos que debía de plasmar en el papel pero por una cosa u otra no los escribía, hoy creo que es la ocasión ideal para abrir mi mente y en especial mi corazón a todas las personas que de una forma u otra han hecho realidad uno de mis grandes sueños.

A mis directores Basilio Valladares y Enrique Martínez por ayudarme no sólo poniéndome a mi disposición sus conocimientos y los medios necesarios para realizar esta Tesis sino por haber depositado en mi su confianza y cariño para que los empleara de la forma más adecuada para llevar a cabo este largo camino, espero haberlo conseguido. Muchas gracias de todo corazón.

A los profesores del departamento Fernando de Armas, Antonio del Castillo y José Piñero por el cariño diario.

Al profesor Antonio Ortega porque mas que un profesor ha sido mi amigo, espero que no cambies nunca y que ayudes a otras personas como lo has hecho conmigo estando ahí cuando hay que estar sin esperar nada a cambio, muchas gracias.

A Elena Figueruelo, me falta espacio y vocabulario para poder buscar las palabras necesarias para agradecerte todo lo que has hecho por mi. Eres como decía Violeta las velas de esta nave, en ese momento no lo entendía pero ahora si, espero que sigas siendo ese hombre y oídos que todos buscamos. Muchísimas gracias amiga mía.

Ahora les toca a ustedes, a mis niños, a mi segunda familia, la verdad es que no se como escribir todo lo que tengo que agradecerles porque no hay orden ni fecha sino un gran cariño que espero que perdure siempre. A ti Néstor, por tener siempre una sonrisa y un beso de buenos días, sigue luchando vales mucho sobre todo como persona que al final es lo que cuenta. A Pili por esas risas que me sacabas cuando no quería reír. A ti Toña por tus ideas, tu cariño, tu apoyo, tu comprensión, tu genio peruano, por lo verdadera que eres, por todo. A ti Cris, por esa amistad palpable que has depositado en mí. A Jacob por saber como sacarme de mis casillas y después con una simple sonrisa demostrarme que estas ahí. A Ana por esos diálogos en el pasillo de los fumadores. A David ese pequeño chico pero gran persona. A Mariajo la niña de los delfines por ese cariño que nos aportas. A mis niños Paul, Victor y Dani por enseñarme más ellos a mí que yo a ellos. A las que ya no están con nosotros pero que nunca se han ido a Emma, Ada, Silvia y en especial a Violeta porque todo lo que soy te lo debo ti de alguna manera, gracias brujita. Me gustaría agradecerles muchas más cosas porque la lista es interminable pero simplemente darles las gracias por haberme hecho sentir que formo parte de personas auténticas, no me cambien nunca. Muchas, muchas gracias.

A toda la gente del departamento de microbiología a los profesores por permitirme utilizar lo suyo como si fuese mío y mis amigos Mari, Chicho, Juanra, Javi y Fernando por hacerme partícipe de sus vidas. Muchas gracias.

A toda la gente del animalario y en especial a Carmelo por el cariño y paciencia que ha tenido conmigo y con mis ratones. Muchas gracias.

Al Dr. D. José Luis Rodríguez y a Dña. María Ángeles Martínez Carretero del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Cruz de San Paulo por su desinteresada colaboración en la presente Tesis Doctoral.

A todas las personas que forma el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" por haberme acogido con tanto cariño, pero en especial quiero aprovechar el momento para agradecer al laboratorio 301, a Manuel, Mamen, Almu, Cholo, Lourdes, Pilar, Maria, Sarita y Marta todo el conocimiento, apoyo, confianza, paciencia pero principalmente por todo el cariño que me han dado, hasta el punto de saber que en Granada tengo mi segunda familia. Muchísimas gracias a todos por haberme ayudado.

A mis amigas Isabel, Noe, Sandra, Guaci, Elena, Raquel, Alicia, Estrella y Carol por todo el cariño y amistad verdadera que siempre me dan dado, por escucharme y ayudarme en esos momentos cuando lo necesitaba. Muchas gracias Suelen.

A mis dos amigas del alma Pía y Adriana por ser mas que amigas, por su cariño, su comprensión, porque siempre han estado ahí en lo bueno y en lo malo, por quererme tanto y por infinitas cosas que hemos pasado juntas y las hemos sabido superar. No cambien nunca aunque si así lo hicieran las seguiría queriendo. Eternamente gracias.

He dejado en último lugar a las personas mas importantes en mi vida a mi familia, ya que ellos saben que son lo primero y que si existiera una hoja especial en esta Tesis ahí estarían ellos en letras mayúsculas porque son lo más grande y subrayado porque es la única forma que este ordenador me permite poder realzar y recalcar lo importante que son para mi. A ti papá, por enseñarme todos los días, a mis hermanas Clara y Tati, porque si la gente tuviese el cariño que ustedes me dan el mundo sería precioso, a mi sobrino Eduardo por demostrarme la paciencia que todavía me falta tener pero que no te quepa duda que la tendré. A ti Juanjo, por hacer de esta Tesis tu Tesis, por tu amor, por tu cariño, por tu paciencia, por hacerme sentir que formo parte de algo que es y será hermoso. En último lugar a ti MAMÁ porque lo que soy y seré te lo debo a ti, por estar ahí de la manera más altruista que nunca he visto, por enseñarme a ver la vida como es, por todo. Los quiero mucho.

A todas las personas que de una forma u otra han hecho posible el que yo esté hoy aquí escribiendo los agradecimientos de esta Tesis Doctoral. A todos muchas gracias.

2.5. Medios de cultivos	50
2.5.1. Medio de cultivo de <i>Leishmania</i>	50
2.5.1.1. Condiciones para el cultivo de <i>Leishmania</i>	51
2.5.2. Medios de cultivo de cepas bacterianas	52
2.5.2.1. Condiciones para el cultivo de <i>Escherichia coli</i>	52
2.5.3. Medio DMEM de proliferación	52
2.6. Aislamiento de ácidos nucleicos	53
2.6.1. Aislamiento de ADN plasmídico	53
2.6.2. Aislamiento de ADN del bacteriófago λ	53
2.7. Cuantificación de ácidos nucleicos	54
2.8. Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas	54
2.8.1. Digestión del ADN con Endonucleasas de Restricción	54
2.8.2. Tratamiento del ADN con fosfatasa alcalina	54
2.8.3. Tratamiento del ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de <i>E. coli</i>	55
2.8.4. Ligación de fragmentos de ADN	55
2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	55
2.10. Secuenciación de ADN	56
2.10.1. Reacción de secuenciación	56
2.10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y urea	56
2.11. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	57
2.12. Elución del ADN desde geles de agarosa	57
2.13. Clonaje del extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25 en el vector de expresión pQE	58
2.14. Clonaje del extremo carboxilo terminal de la proteína ribosomal L25 en el vector de expresión pCRT7/NT-TOPO	58
2.15. Clonaje de la proteína DEVH-box helicasa en el vector de expresión pQE	59
2.16. Transformación de ADN en <i>E. coli</i>	60
2.16.1. Preparación de células <i>E. coli</i> competentes	60
2.16.2. Transformación de células bacterianas competentes	60
2.16.3. Selección de colonias recombinantes de <i>E. coli</i>	61
2.17. Purificación en condiciones nativa de las proteínas ribosomales recombinantes L14 (PRL14r), L25 (PRL25r), de sus extremos	

amino (PRL25a-r) y carboxilo (PRL25c-r) y de la DEVH-box helicasa de <i>L. braziliensis</i>	61
2.17.1. Inducción en <i>E. coli</i> de la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r, PRL25c-r y DEVH-box helicasa y la solubilización de las mismas	61
2.17.2. Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺	62
2.18. Cuantificación de proteínas	63
2.19. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE	63
2.20. Diálisis	63
2.21. Liofilización	64
2.22. Síntesis de péptidos	64
2.23. Sueros	65
2.24. Transferencia de proteínas (<i>Western blot</i>)	66
2.25. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas	66
2.26. Serodiagnóstico	66
2.26.1. Con la PRL25r y PRL25a-r	66
2.26.2. Con los péptidos sintéticos	67
2.27. Inmunización de ratones BALB/c con la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r	67
2.28. Estudio de la respuesta humoral inducida en ratones de la cepa BALB/c por la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r	68
2.28.1. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	68
2.29. Estudio de proliferación de células esplénicas inducida por la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r en ratones BALB/c	69
2.30. Estudio de protección en ratones de la cepa BALB/c	69
2.31. Estudio de los niveles de IgG frente a la PRL25r y a su extremo amino en ratones BALB/c antes y después de la infección con <i>L. amazonensis</i>	70
2.32. Inmunización de ratones BALB/c con la proteína DEVH-box helicasa	70
2.33. Estudio de la respuesta humoral inducida en ratones de la cepa BALB/c por la proteína DEVH-box helicasa	71
2.33.1 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	71
2.34. Inmunolocalización de la proteína DEVH-box helicasa en la forma promastigote de <i>L. braziliensis</i>	71

Resultados y Discusión	72
3.1. Proteína ribosomal L14 recombinante (PRL14r)	72
3.1.1 Expresión y solubilización en condiciones nativas de la PRL14r de <i>L. braziliensis</i>	72
3.1.2 Purificación en condiciones nativas de la PRL14r de <i>L. braziliensis</i>	73
3.1.3. Respuesta humoral inducida por la PRL14r de <i>L. braziliensis</i>	75
3.1.4. Proliferación de células esplénicas inducida por la PRL14r de <i>L. braziliensis</i> en ratones BALB/c	77
3.1.5. Discusión	78
3.2. Proteína ribosomal L25 recombinante (PRL25r)	80
3.2.1. Clonaje del extremo amino de la PRL25r de <i>Leishmania braziliensis</i>	80
3.2.2. Clonaje del extremo carboxilo de la PRL25r de <i>Leishmania braziliensis</i>	82
3.2.3. Expresión y solubilización en condiciones nativas de las PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de <i>L. braziliensis</i>	84
3.2.4. Purificación de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de <i>L. braziliensis</i>	86
3.2.5. Análisis serológicos frente a la PRL25r de <i>L. braziliensis</i>	89
3.2.6. Análisis serológicos frente a la PRL25a-r de <i>L. braziliensis</i>	90
3.2.7. Serodiagnósticos con los péptidos sintéticos del extremo amino de la proteína ribosomal L25 de <i>L. braziliensis</i>	92
3.2.8. Análisis serológicos frente a la PRL25c-r de <i>L. braziliensis</i>	93
3.2.9. Respuesta humoral inducida por la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de <i>L. braziliensis</i> en ratones BALB/c	94
3.2.10. Proliferación de células esplénicas inducida por la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de <i>L. braziliensis</i> en ratones BALB/c	97
3.2.11. Protección generada con la PRL25r y la PRL25a-r en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i>	98
3.2.12. Niveles de IgG frente a la PRL25r y a su extremo amino en ratones BALB/c antes y después de la infección	99

3.2.13. Discusión	104
3.3. Proteína Helicasa	107
3.3.1. Obtención de las secuencias contiguas al gen que codifica a la proteína ribosomal L14 de <i>Leishmania braziliensis</i>	107
3.3.2. Secuenciación completa de los clones p18Sc1 y p18Sc6	109
3.3.3. Estudio de la secuencia de aminoácidos obtenida del clon pGHLb de <i>L. braziliensis</i>	116
3.3.5. Subclonaje de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína DEVH-box de <i>L. braziliensis</i> en el vector de expresión pQE	119
3.3.6. Expresión y solubilización en condiciones nativas de la proteína recombinante DEVH-box helicasa de <i>L. braziliensis</i>	120
3.3.7. Purificación en condiciones nativas de la proteína recombinante DEVH-box helicasa de <i>L. braziliensis</i>	122
3.3.8. Respuesta humoral inducida por la proteína DEVH-box helicasa de <i>L. braziliensis</i> en ratones BALB/c	123
3.3.8. Localización de la DEVH-box helicasa <i>L. braziliensis</i> mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)	126
Conclusiones	128
Bibliografía	129

INTRODUCCIÓN:

1.1. Leishmaniasis.-

La leishmaniasis es un conjunto de manifestaciones clínicas producidas por diversas especies del género *Leishmania* que afecta, según la Organización Mundial de la Salud a más de 100 países desde la franja subtropical a la tropical excepto el sudeste asiático y Australia (Organización Mundial de la Salud, 2000). Dependiendo de la especie de *Leishmania* y de la respuesta inmune del hospedador, puede afectar la piel, las mucosas o las vísceras (Berman J. D. 1997). Entre ellas, tienen en común el agente causal (alguna especie del género *Leishmania*), el vector (insectos dípteros hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*), el reservorio (vertebrados) y el parasitismo de las células del sistema fagocítico mononuclear (sobre todo macrófagos).

Esta patología constituye un grave problema de salud pública por los altos costes que representa a nivel psicológico, socio-cultural y económico (Desjeux P. 1992). La Organización Mundial de la Salud estima que existe una prevalencia mundial de 12 millones de casos y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5-2 millones de nuevos casos para las leishmaniasis cutáneas y 500.000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral y la población en riesgo se eleva a 350 millones de personas (Organización Mundial de la Salud, 2001). Sin embargo, los datos oficiales que se dispone, no reflejan la realidad de la afección humana debido a varios factores limitantes: 1º) numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, 2º) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, 3º) el número de personas infectadas, pero asintomáticas, es mucho mayor que el número de casos que manifiestan la enfermedad y, por último, la leishmaniasis es de declaración obligatoria en tan sólo 40 de los 88 países endémicos. Estos aspectos hacen que la leishmaniasis conjuntamente con la *malaria*, *esquistosomiasis*, *filariasis*, *trypanosomiasis* y *tuberculosis*, sean consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en términos de investigación para nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento.

1.2. La *Leishmania*.-

La *Leishmania* es el agente etiológico de la leishmaniasis. Es un protozoo dimórfico que pertenece al orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania* (Chang K.P., et. al. 1985).

Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad que producen y distribución geográfica. Existen en todo el mundo cerca de 30 especies que infectan a los animales, de las cuales 21 pueden infectar al hombre (Herwaldt B. 1999). En el nuevo mundo, existen reconocidas un total de 20 especies del género *Leishmania* de las cuales, 14 infectan al hombre. Las dos formas morfológicas principales de *Leishmania* son, la intracelular o amastigota, que se localiza en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado, y la forma extracelular o promastigota localizada en el tracto intestinal del vector invertebrado (Pearson R., *et. al.* 1995; Handman E. 2001).

A parte del hombre, una amplia variedad de mamíferos silvestres y domésticos, tales como el perro, roedores y marsupiales, se han logrado identificar como hospedadores de las especies de *Leishmanias*.

Ciertas especies de vectores son encontradas en la floresta, otras son endémicas de áreas desérticas, y algunas son peridomésticas; su hábitat preferible son los lugares húmedos, oscuros y donde hay abundante vegetación. En el Nuevo Mundo todas ellas pertenecen al género *Lutzomyia* y en el Viejo Mundo al género *Phlebotomus* (Grimaldi G., *et. al.* 1993; Killick-Kendrick R. 1999). De las más de 700 especies descritas de flebótomos, únicamente unas 70 son vectores probados o sospechosos de transmitir leishmaniasis. En el viejo mundo cada vector tiende a transmitir sólo una especie de *Leishmania*, sin embargo, los vectores de la leishmaniasis del nuevo mundo pueden soportar infecciones de varias especies de *Leishmania* (Grimaldi G., *et. al.* 1993). Las mismas especies de flebótomos que atacan al hombre también pueden presentar gran afinidad por el perro, en cambio, otras especies de vectores sólo tienen preferencia por animales silvestres.

1.3. Ciclo biológico.-

El ciclo biológico de leishmania comprende el paso alternativo entre la forma amastigota, que se localiza en las células del sistema fagocítico mononuclear del mamífero hospedador, donde se multiplica intracelularmente, y la forma promastigota, que parasita al vector invertebrado, localizándose en su tubo digestivo, donde el parásito se multiplica extracelularmente.

En el mamífero, la forma de amastigote, tiene una morfología ovalada o redondeada, es inmóvil y mide entre 2 a 3 micras de diámetro. El núcleo es voluminoso, esférico y generalmente excéntrico. Próximo al núcleo se encuentra el kinetoplasto, una estructura mitocondrial especializada que contiene ADN extracelular (kDNA). El kinetoplasto tiene forma bacilar y está asociado a un flagelo rudimentario que no se extiende fuera del parásito, por lo que es poco visible y se le conoce como rizoplasto, (figura 1.a). Los amastigotes están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de los fagolisosomas de los macrófagos donde residen y se multiplican por división simple.

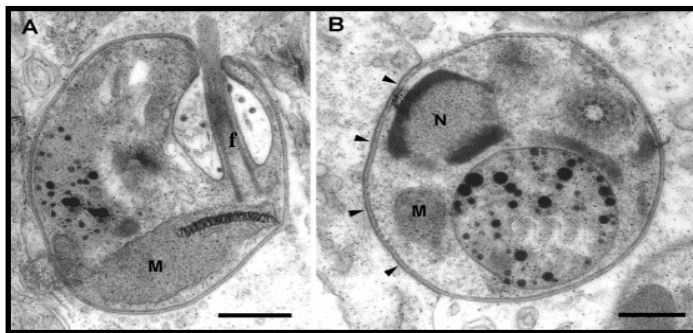


Figura 1.a



Figura 1.b

Figura 1.a: amastigote de *Leishmania*. (N) núcleo, (M) mitocondria, (f) flagelo rudimentario.
Figura 1.b: promastigote de *Leishmania*. (N) núcleo, (K) kinetoplasto, (F) flagelo.

En el flebotomo, la forma promastigote es alargado, móvil y presenta una longitud de aproximadamente 20 micras. Tiene un núcleo central oval, un kinetoplasto terminal o subterminal y en la parte anterior del parásito, se origina un flagelo, casi de igual longitud que el cuerpo (Hommel M. 1999) (figura 1.b). Cuando los estadios intermedios llegan a promastigotes metacíclicos migran hacia la probóscide del vector y son inoculados cuando éstos intentan tomar sus alimentos (Chang K.P., *et. al.* 1985; Killick-Kendrick R. 1990; Ashford R.W., *et. al.* 1998).

El inicio del ciclo, en el hospedador vertebrado, tiene lugar cuando el flebótomo le inocula con su picadura los promastigotes infestantes o metacíclicos, (figura 1.2).

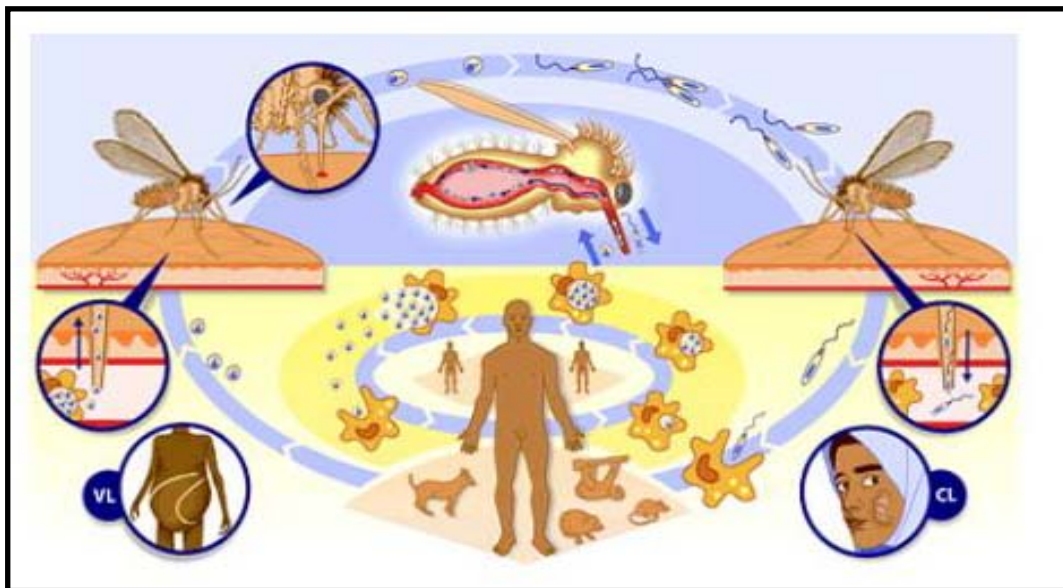


Figura 1.2: Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Una vez en el hospedador vertebrado, los promastigotes son reconocidos por una serie de proteínas séricas, que forman el sistema del complemento, que al ponerse en contacto con el parásito se activan y desencadenan una respuesta inmune innata, que tiene como finalidad la lisis del parásito mediante la formación de poros en su membrana, el CAM (Complejo de Ataque a la Membrana). El C3b y el C4b, son moléculas intermedias del complemento que al depositarse en la superficie del promastigote producen la opsonización del parásito favoreciendo su fagocitosis por parte del macrófago. Al mismo tiempo se produce una respuesta inflamatoria en la zona de la inoculación producida por las proteínas C3a, C4a y C5a. Esta respuesta induce la extravasación de monocitos circulantes y neutrófilos desde el torrente sanguíneo hacia el lugar de la infección aumentando el número de moléculas fagocíticas. Los macrófagos, son capaces también, de reconocer receptores presentes en la superficie del promastigote, tales como el lipofosfoglicano (LPG) o la glucoproteína de superficie gp63, y se unen a ellos a través de sus receptores y los fagocitan, englobándolos en vacuolas parasitóforas. Estos receptores del macrófago, los RC1 y RC3, no sólo reconocen estas proteínas de la superficie del promastigote, también son receptores que se unen a la proteína sérica C3b que previamente se había unido a los LPG por lo que también contribuyen a la fagocitosis del promastigote (Alexander J., *et. al.* 1992; Handman E. 1999), (figura 1.3).

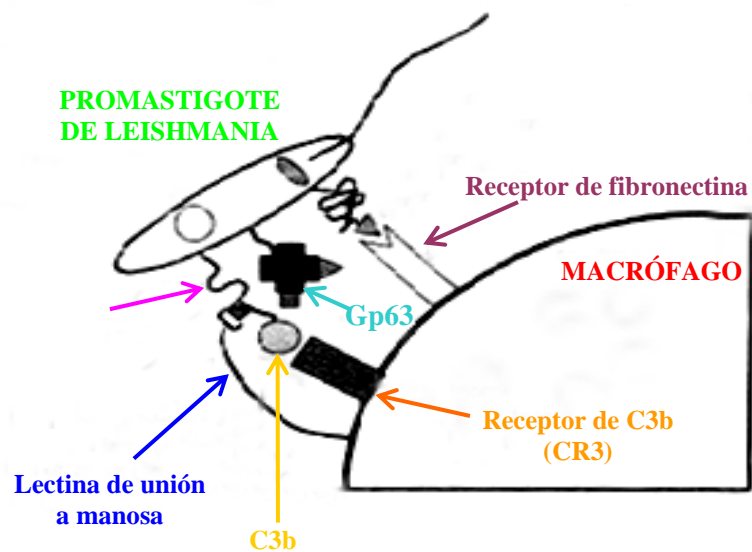


Figura 1.3: Reconocimiento del promastigote por el macrófago.

Ya en el interior de las vacuolas, éstas se unen a lisosomas formándose un fagolisosoma que acidifica el medio (pH 4'5) y vierte enzimas proteolíticas que digieren y matan a la *Leishmania*, (figuras 1.4.a, 1.4.b y 1.4.c).

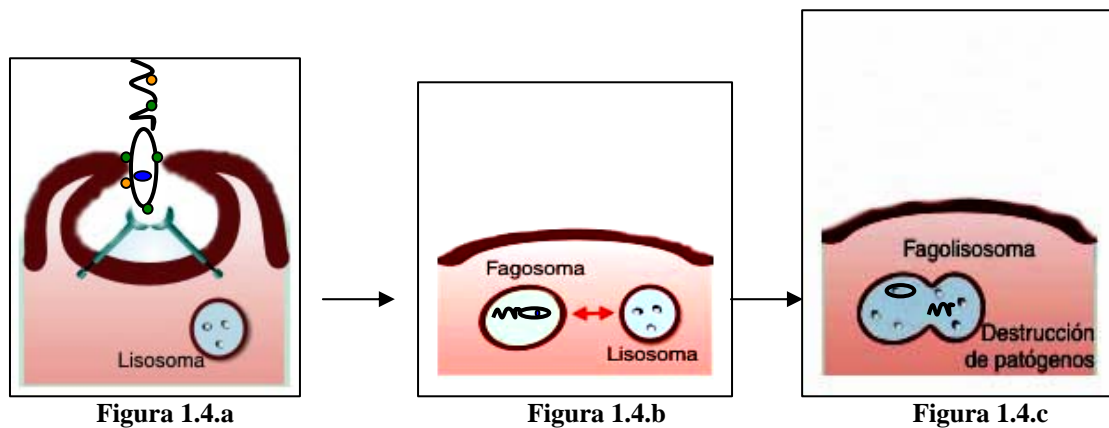


Figura 1.4.a: Fagocitosis del promastigote por el macrófago.
Figura 1.4.b: Formación del fagolisosoma por el macrófago.
Figura 1.4.c: Destrucción del promastigote.

Otro mecanismo que se desencadena durante la activación de los macrófagos es la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot). Finalmente, la producción de óxido nítrico (NO^\cdot) sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es el mecanismo más importante destinado a la destrucción de las leishmanias, (figura 1.5).

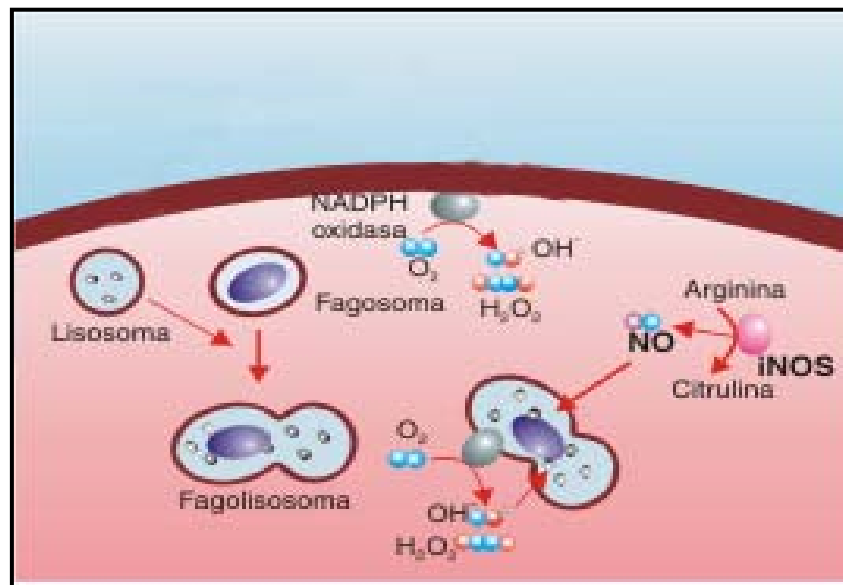


Figura 1.5: Mecanismo de producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH[·]) y de óxido nítrico (NO[·]) sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS)

Las leishmanias que son destruidas por los macrófagos liberan proteínas antigénicas que son procesadas. Los péptidos resultantes, se asocian a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que actúan como transportadores de antígenos a la superficie del macrófago o de células presentadoras de antígenos (CPA), y son presentados a los linfocitos T.

Cuando se asocian a moléculas del CMH de clase I, los antígenos son reconocidos por las células T del tipo CD8⁺ (Tc o citotóxicas) desencadenándose una respuesta citotóxica, (figura 1.6), mientras que cuando se asocian a las moléculas del CMH de clase II son reconocidos por las células T del tipo CD4⁺ (Th o cooperadoras) y se produce una respuesta celular y/o humoral, de esta manera se establece una respuesta inmune adaptativa o específica, (figura 1.7).

Al mismo tiempo, los macrófagos producen citoquinas, tales como el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18, que inducen inflamación y una respuesta de fase aguda, como puede ser la fiebre que se desencadena a las pocas horas de iniciarse la infección. El IFN- α y el IFN- β también son secretados por las células infectadas produciendo un aumento en la expresión de las moléculas del CMH de clase I y la activación de las células NK en la fase temprana de la infección, antes de iniciarse la respuesta adaptativa.

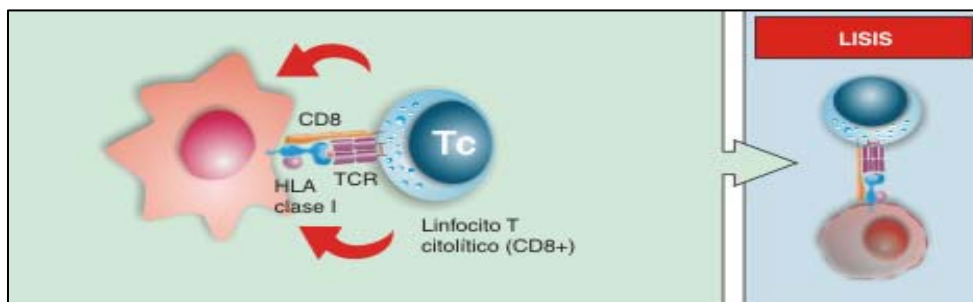


Figura 1.6: Unión del antígeno a moléculas del CMH de clase I y reconocimiento por las células T del tipo CD8+ (Tc o citotóxicas). Lisis de las células presentadoras infectadas.

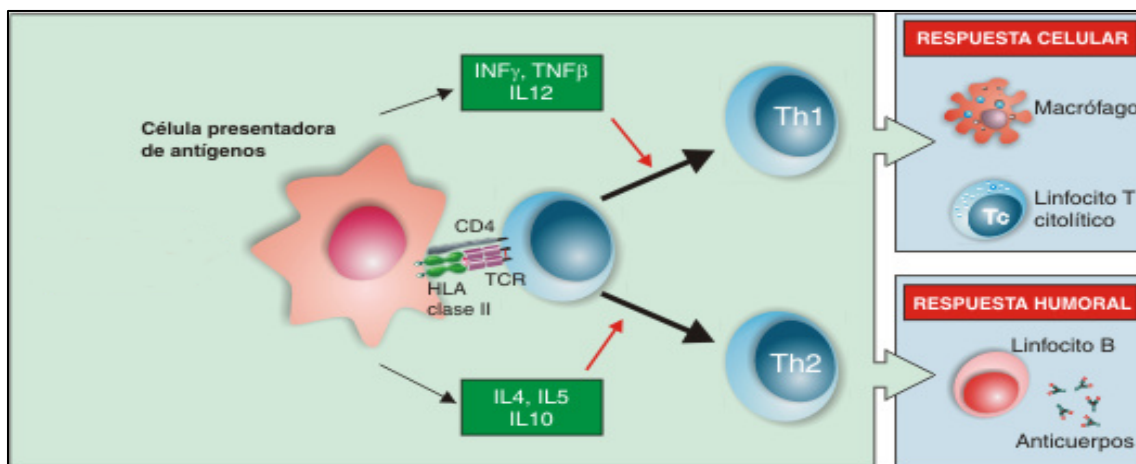


Figura 1.7: Unión del antígeno a moléculas del CMH de clase II y reconocimiento por las células T del tipo CD4+. Diferenciación a células Th1 o Th2 y su consiguiente respuesta.

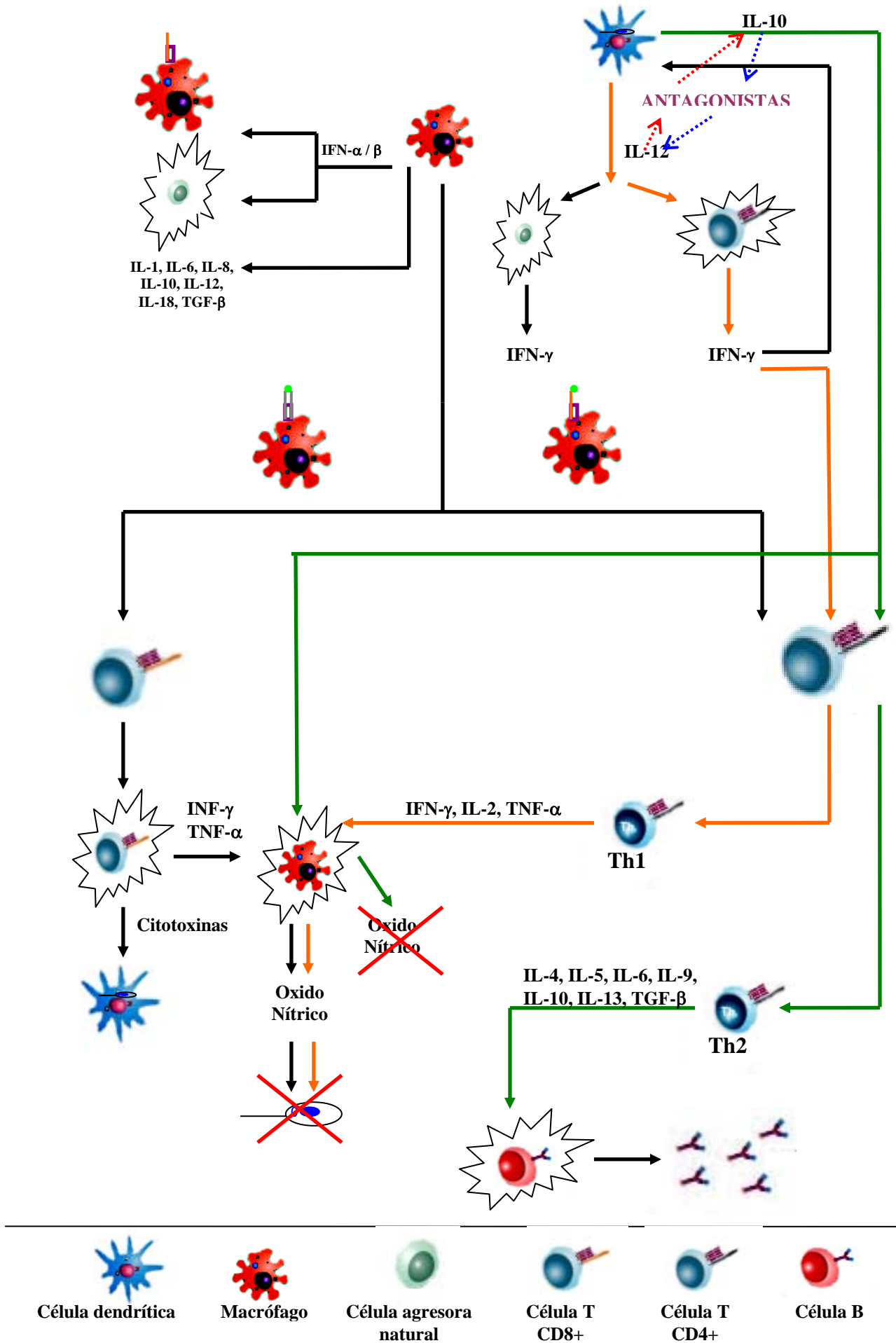
La activación de las células Tc conduce a la producción de citotoxinas que provocan la lisis o apoptosis de las células CPA. También, como consecuencia de su activación, secretan citoquinas, tales como el IFN- γ y el TNF- α , que activan a los macrófagos favoreciendo, por tanto, la muerte del parásito en el interior de la célula.

La activación de las células Th desempeña un papel importantísimo en el ciclo de vida del parásito permitiendo o no su continuidad, tal y como se ha observado en el modelo murino de infección con *Leishmania major*, estableciéndose dos tipos de respuesta según se expresen las subpoblaciones Th1 o Th2 (Romagnani S. 1997). Entre los factores asociados para que se desencadene una respuesta Th1 o Th2 están la secreción de IL-12 e IL-10 por las APC, en respuesta a la infección con patógenos intracelulares. La IL-12 secretada por las células dendríticas tiene efecto estimulador en la citotoxicidad de las células agresoras naturales (NK) e induce la producción de IFN- γ por parte de estas células y de los linfocitos T CD4⁺ de una manera temprana. Esto

favorece la producción de IL-12 por las células dendríticas y estimula la expresión del receptor de IL-12 en las células T activadas, desencadenándose una respuesta de tipo Th1 y una inhibición de la proliferación de las células Th2, lo que conduciría a la muerte del parásito y consecuentemente la interrupción de su ciclo de vida (Scharton-Kersten T., *et. al.* 1995; Solbach W., *et. al.* 2000). La IL-12 parece conferir protección contra *Leishmania* suprimiendo la producción de IL-4 e induciendo la diferenciación hacia una respuesta celular de tipo Th1. Sin embargo, la IL-10 al tener un efecto antagónico sobre el IFN- γ lleva a una respuesta de tipo Th2. Además, se ha demostrado que la IL-10 inhibe la producción de óxido nítrico en el macrófago (Cunha *et. al.* 1992). Por lo tanto, la supervivencia inicial de la *Leishmania* dentro del macrófago, puede depender críticamente de cual de estas citoquinas antagónicas predominan en el microambiente de la infección. El IFN- γ también estimula la síntesis del TNF- α . La acción conjunta de estas dos citoquinas sobre los macrófagos infectados, conlleva a la activación de los macrófagos a sintetizar L-arginina que es el sustrato de la óxido nítrico sintasa, generándose óxido nítrico, que es el principal responsable de la destrucción intracelular del parásito.

Por otro lado, se ha observado que cuando existe una gran cantidad de antígeno, cuando éste es soluble, o cuando el linfocito B se comporta como célula presentadora de antígeno, la respuesta es de tipo Th2. Por el contrario, la respuesta es de tipo Th1 cuando hay presencia de poco antígeno o cuando la célula presentadora de antígeno son los macrófagos o las células dendríticas.

Cuando se estimula la respuesta celular de tipo Th1 se induce la producción de citoquinas de tipo Th1, sobre todo interferón-gamma (IFN- γ) e interleuquina-2 (IL-2), así como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), que activan los macrófagos parasitados y, como consecuencia de ello, se activa la producción de oxígeno tóxico y radicales de nitrógeno, mecanismos que conducen a la destrucción de las leishmanias y a la curación de la lesión. Por el contrario, cuando se estimula la respuesta celular de tipo Th2 se producen citoquinas que inhiben la respuesta de tipo celular (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y TGF- β), favoreciendo la producción de anticuerpos por los linfocitos B y el desarrollo de la respuesta humoral, a la vez que falla la celular, con la consiguiente diseminación de los parásitos hacia otras zonas (Romagnani S. 1997; Sjölander A., *et. al.* 1998). En la figura de la página siguiente se esquematiza este proceso.



Todos estos mecanismos de destrucción y de eliminación de la *Leishmania* pueden resultar ineficaces ya que este parásito ha desarrollado diferentes estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedador y así poder asentarse y continuar su ciclo de vida. Anteriormente se comentó que el LPS y la gp63 son proteínas de la superficie del parásito. Cuando los promastigotes metacíclicos se encuentran en la piel del huésped, la composición del LPS de su membrana es más densa, de esta forma evita que se desarrolle el CAM y lo lise (Puentes S. M., *et. al.* 1990). Por otro lado, la gp63 es reconocida por el C3b, sin embargo, esta proteína de superficie es capaz de activar y evadir la acción de lisis por el complemento por su capacidad de unir y fijar el C3b que es rápidamente convertido a iC3b (la forma inactivada) mediante la actividad proteolítica de estas proteínas (Brittingham A., *et. al.* 1995). En la proteólisis o fosforilación de algunos componentes del complemento, C3, C5 y C9, también intervienen proteínas quinasas (LPKs) que se localizan en la superficie del parásito (Hermoso T., *et. al.* 1991). El iC3b interrumpe la cascada del complemento evitando por lo tanto la formación del CAM, pero sigue manteniendo su capacidad de opsonizar, de tal manera que los parásitos recubiertos por estas proteínas son más fácilmente fagocitados por los macrófagos ya que poseen receptores para esta proteína, el RC3 (Brittingham A., *et. al.* 1995).

La vía de destrucción dentro del fagolisosoma resulta ineficaz ya que los promastigotes poseen en su superficie diversas proteasas, que con su actividad proteolítica, degradan las enzimas lisosomales destinadas a destruir a los promastigotes. El proceso de formación de radicales de oxígeno también fracasa por la acción de enzimas parasitarias que actúan sobre el complejo NADPH oxidasa (Sacks D., *et. al.* 2002a) y la oxido nítrico sintasa (Bogdan C., *et. al.* 1999). Además, la acción del LPG al formar una barrera alrededor del parásito es capaz de captar radicales libres de oxígeno (Zambrano-Villa S., *et. al.* 2002).

Una vez los promastigotes se encuentran en el interior de los macrófagos, se diferencian y se transforman en amastigotes como respuesta al cambio de temperatura y pH. Los amastigotes resisten el bajo pH y el ataque de las enzimas hidrolíticas, posiblemente por el aumento de las moléculas de superficie, concretamente la gp63 que es capaz de proteolizar enzimas lisosomales (Cunningham A.C., 2002). Por otro lado, los amastigotes también pueden ser destruidos por los metabolitos intermediarios del oxígeno, el H₂O₂ y el O⁻, pero resisten esta agresión por la acción de la catalasa y de la superóxido dismutasa que hidrolizan estos reactivos (Descoteaux A., *et. al.* 1999). A

nivel de la respuesta adaptativa, las leishmanias pueden reducir la expresión de las moléculas del CMH de clase II del macrófago, por lo que dificultan su función como células presentadoras de antígenos, inhiben el procesamiento y presentación de los péptidos y se ha demostrado que la gp63 es capaz de proteolizar el receptor CD4 presente en la superficie de los linfocitos T, interfiriendo en la interacción APC-linfocito T (Zambrano-Villa S., *et. al.* 2002). Todas estas estrategias permiten que los amastigotes se multipliquen dentro de las vacuolas parasitóforas hasta que los macrófagos infectados ya no pueden contener más *Leishmanias* y la célula muere, liberando los amastigotes que van a infectar otras células. Los parásitos libres invaden otros macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso multiplicativo, o bien se diseminan directamente a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas, como ocurre con *L. braziliensis*, o son arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en órganos ricos en células macrofágicas (médula ósea, hígado y bazo principalmente) como ocurre en el caso de *L. infantum*.

El paso del parásito al vector tiene lugar cuando las hembras de los flebótomos se dirigen al hospedador vertebrado con objeto de ingerir sangre para alimentarse. Dentro de las primeras 24 horas después de la ingestión, los amastigotes se multiplican en el tubo digestivo del vector para pasar rápidamente a la forma promastigota que se multiplica activamente en su intestino. Finalmente, el ciclo de vida se completa aproximadamente una semana después de la infección cuando, después de pasar por estadios intermedios, los promastigotes metacíclicos se sitúan en la región bucal o trompa del vector, desde donde pasarán al hospedador vertebrado (Chang K.P., *et. al.* 1985; Handman E. 1999).

1.4. Manifestaciones clínicas.-

Se considera que al menos 20 especies de *Leishmania*, son responsables de las cuatro formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: Leishmaniasis cutánea (localizada o difusa), Leishmaniasis mucocutánea y Leishmaniasis visceral. Cada una de ellas con sus peculiaridades (OMS, 2000).

Leishmaniasis cutánea (LC)

En el Viejo Mundo se conoce como *Botón de Oriente* y es causada por *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, aunque se han encontrado casos de LC producida por *L. infantum*.

En el Nuevo Mundo los agentes causales son las especies del complejo *L. mexicana*; *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis* y las especies del subgénero *Viannia*, también denominado complejo *L. braziliensis* que engloba a *L.[V] braziliensis*, *L.[V] panamensis*, *L.[V] guyanensis* y *L.[V] peruviana*.

La enfermedad se presenta cuando la invasión de las leishmanias queda limitada a los macrófagos de la zona de la picadura, como consecuencia de la respuesta celular.

Las células infectadas permanecen en la piel y quedan aisladas por un cúmulo de linfocitos, células plasmáticas y células gigantes que originan un granuloma ulceroso.

La forma cutánea de la leishmaniasis se caracteriza por presentar lesiones de diferentes tipos, siendo la más frecuente las lesiones de tipo ulcerosas. Las primeras manifestaciones son pequeñas lesiones caracterizadas por máculas rosadas o rojas, pruriginosas, del tamaño de la cabeza de un alfiler o de una lenteja, que tiene semejanza a las picaduras de los insectos. A los pocos días éstas se elevan y adquieren un carácter papuloso, presentando una base firme, indurada e hiperémica. Con estas características de la lesión primaria, es difícil detectar esta patología en su fase inicial, pasando a veces desapercibida incluso por el propio enfermo. Después de varios días, esta lesión inicial se ulcera espontáneamente y se recubre de un líquido amarillento y adherente, que posteriormente da lugar a la costra. Debajo de esta costra, la lesión se extiende en superficie y profundidad y además pueden aparecer lesiones satélites que pueden unirse a la inicial, y dan lugar a una gran ulceración, (figura 1.8).



Figura 1.8: Leishmaniasis cutánea producida por la infección con *L. mexicana*.

La úlcera característica es generalmente redondeada, indolora, con bordes bien definidos, levantados e indurados y cortados en forma de sacabocado, lo que hace que se asemeje a la imagen de un cráter. Cuando se desprende la costra se observa un fondo granuloso de color rojizo, limpio y exudando líquido no purulento. Sin embargo, cuando se presentan infecciones bacterianas oportunistas, esta úlcera puede volverse dolorosa, exudativa y purulenta.

En los primeros meses de evolución de la enfermedad, cuando la relación parásito-huésped muestra un desequilibrio a favor del primero, la úlcera tiende a crecer hasta un tamaño máximo que varía en función de la respuesta inmune del hospedador y de la especie de *Leishmania*. Después de algunos meses la lesión llega a medir varios centímetros, y con frecuencia los parásitos invaden los cordones linfáticos, produciendo linfangitis y linfadenitis regional, la cual se palpa como un rosario. Posteriormente, casi siempre las lesiones se estabilizan y a medida que empieza a prevalecer la reacción del hospedador, la enfermedad tiende a evolucionar hacia la cura espontánea, siendo en la mayoría de las veces, en un periodo entre seis meses y 3 años.

Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

La LCD es causada por *L. aethiopica*. La enfermedad parece iniciarse como una lesión localizada, de aspecto nodular, que poco a poco se disemina por todo el cuerpo por la carencia de una barrera linfocítica. Esta leishmaniasis se caracteriza por la presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas y en algunos casos lesiones verrucosas, (figura 1.9).



Figura 1.9: Leishmaniasis cutánea difusa producida por la infección con *L. aethiopica*.

Las lesiones muestran generalmente límites imprecisos que se confunden con la piel normal, dando a la enfermedad un aspecto que recuerda a la lepra lepromatosa. El examen histopatológico revela atrofia de la epidermis y la presencia, en la dermis, de granulomas bien constituidos, donde predominan células con citoplasma vacuolizado, llenos de parásitos. Estas lesiones no se curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento.

Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

En las zonas endémicas, la LMC es conocida como Espundia y es producida exclusivamente por la infección con *L. braziliensis*. Las lesiones mucosas secundarias pueden aparecer existiendo todavía las manifestaciones cutáneas, o cuando éstas ya han cicatrizado, que es lo más frecuente. En los casos de lesiones mucosas ya no existe la tendencia a la cura espontánea. Las lesiones mucosas se extienden con mayor rapidez que las cutáneas, pueden cubrir toda la mucosa nasal, faringe, laringe, llegar a la tráquea y hasta los bronquios aproximadamente en 2 años.

En un tercio de los pacientes infectados, la enfermedad se manifiesta primeramente en las mucosas, sin presentar antecedentes de lesiones en la piel. En estos casos es posible que la infección primaria haya sido inaparente o que se haya manifestado como una lesión mínima pasando desapercibida para el propio paciente.



Figura 1.10: Leishmaniasis mucocutánea producida por la infección con *L. braziliensis*.

Generalmente, las lesiones mucosas se localizan en las vías áreas superiores. Las lesiones mucosas comienzan a nivel del tabique nasal cartilaginoso, pero pueden también comenzar en otras partes de las vías áreas superiores. Se produce hipertrofia vascular y de los orificios pilo-sebáceos, provocando abundante seborrea. Cuando las lesiones están avanzadas, se presenta exudación, ulceración de toda la mucosa, ulceración del cartílago, y al destruir la mucosa del otro lado se produce la perforación que puede dar lugar a la destrucción parcial o total del tabique, lo cual determina la caída de la punta de la nariz, (figura 1.10). La perforación del tabique nasal y el achatamiento de la nariz sin ulceración de la piel es muy propio de la LMC, y nunca se ve en la LC.

La sintomatología que el paciente puede presentar es un catarro nasal, ardor, respiración forzada, hemorragia al extraerse las costras, y si hay infecciones oportunistas, la secreción es purulenta y puede profundizarse desde la lesión mucosa hasta la mucosa del vestíbulo y labio superior. Este proceso puede extenderse a la piel de la nariz provocando la ulceración de la piel, pudiendo destruir las alas nasales, quedando sólo los orificios de los elementos óseos. La proliferación del borde del tabique que queda, puede llevar a la obstrucción de las fosas nasales provocando la dificultad respiratoria.

Las lesiones en la boca afectan principalmente al paladar, los pilares, la úvula y posteriormente aparecen los procesos destructivos; las amígdalas raramente son afectadas en un inicio, no existe reacción ganglionar y la cara posterior de los labios adquiere un aspecto úlcero-granuloso.

La leishmaniasis mucocutánea en los primeros años de su evolución compromete muy poco el estado general. Se pueden encontrar enfermos con úlceras extensas en el rostro que realizan normalmente su trabajo; sin embargo cuando las lesiones mucosas están muy avanzadas y comprometen la mucosa de la boca y la laringe, la alimentación y la respiración se ven dificultadas, con el consiguiente compromiso del estado general. Algunos enfermos pierden casi por completo la voz y se vuelven sordos. Algunos pacientes viven salivando constantemente y el aliento se vuelve fétido. En estas condiciones, el paciente tiene dificultad para alimentarse por lo que los enfermos presentan desnutrición, con la consiguiente aparición de otras infecciones como la tuberculosis. Este tipo de pacientes con lesiones severas, si no son tratados pueden llegar a morir.

Leishmaniasis visceral (LV)

Es producida por *L. infantum*, *L. chagasi* y *L. donovani* en cuyo caso se denomina Kala-azar (Bray R.S. 1974). La visceralización del parásito se produce como consecuencia del fallo de la respuesta inmune celular. Después de la picadura del vector, los primeros signos y síntomas clínicos aparecen después de un periodo de incubación que varía entre 4 y 10 meses. En muy pocos casos se encuentran lesiones en la zona de la picadura, por lo que en la mayoría pasa desapercibida. Rara vez la enfermedad es aguda y generalmente, tiene una evolución crónica. Cuando ocurre la invasión visceral aparece la fiebre, casi siempre elevada e intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles, también de semanas. El bazo crece gradualmente y sobrepasa el reborde costal. En la fase crónica, la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa ilíaca derecha, abultando considerablemente el abdomen. También se produce hepatomegalia pero en menor magnitud que el crecimiento del bazo. Existe una linfadenopatía generalizada, especialmente de los ganglios mesentéricos. La piel se encuentra hiperpigmentada. La LV se caracteriza por inducir la producción de niveles elevados de anticuerpos, dando como resultado, la aparición de inmunocomplejos circulantes que a veces se depositan en los riñones causando glomerulonefritis. Suele afectar a niños, personas en estado de malnutrición y pacientes con algún tipo de inmunodepresión. En los niños se sospecha de la enfermedad cuando existe fiebre y esplenomegalia y proceden de un área endémica. La mayoría de los niños no tratados mueren pocos meses después de iniciada la enfermedad, (figura 1.11).

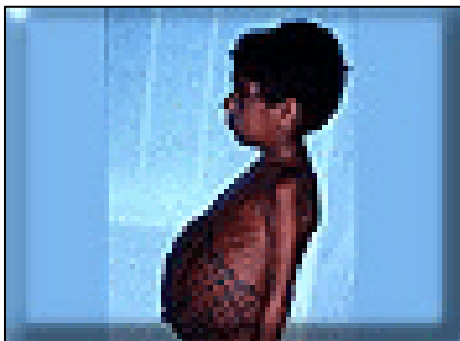


Figura 1.11: Leishmaniasis visceral (esplenomegalia) producida por la infección con *L. donovani*.

En enfermos con la coinfección VIH-*Leishmania*, el cuadro clínico puede ser parecido, aunque suelen presentarse localizaciones atípicas debido a la anergia de los pacientes. En éstos, la enfermedad puede cursar sin esplenomegalia y con lesiones

nodulares o ulcerativas a nivel del tracto gastrointestinal y pulmonar, además el número de parásitos en la médula ósea suele ser elevado. Después de varios meses de enfermedad, el paciente sufre edemas de miembros inferiores, presenta anemia, leucopenia y trombocitopenia (Alvar J., *et. al.* 1997).

1.5. La respuesta humoral según las formas clínicas de *Leishmania*.

La leishmaniasis se caracteriza por una variedad de trastornos inmunopatológicos ya que, en determinadas circunstancias, puede ocurrir la activación de células B policlonales y la respuesta de células T específica de antígeno (Grimaldi G., *et. al.* 1993). Las evidencias clínicas ponen de manifiesto que la producción *in vivo*, de anticuerpos específicos, principalmente de tipo IgG e IgM, no conlleva a la protección del paciente (Liew F. Y., *et. al.* 1993). Sin embargo, *in vitro*, los anticuerpos anti-*Leishmania* tienen la capacidad de lisar promastigotes en presencia de proteínas del complemento, favorecer la fagocitosis de parásitos opsonizados por los mismos anticuerpos e inducir la adherencia de diversas partículas a la superficie de promastigotes y amastigotes (Dwyer D.M. 1976; Pearson R. D., *et. al.* 1980; Herman R. 1980; Mosser D. M., *et. al.* 1984).

El tipo de respuesta humoral depende de la forma clínica de leishmaniasis, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección.

En la LV, la gran cantidad de parásitos presentes en el hígado y en el bazo, dos órganos muy importantes en la iniciación y maduración de la respuesta de anticuerpos, inducen la aparición de una respuesta policlonal (Galvao-Castro B., *et. al.* 1984). La producción de anticuerpos en esta forma clínica de leishmaniasis es muy alta, lo que da un incremento de inmunoglobulinas inespecíficas, aunque también se han detectado altos títulos de anticuerpos específicos (Rezai H. R., *et. al.* 1978; Badaro R., *et. al.* 1986).

En términos generales hay una fuerte respuesta humoral en las leishmaniasis visceral y cutánea difusa, con altos títulos de anticuerpos principalmente de la clase IgG (Galvao-Castro B., *et. al.* 1984), mientras que las leishmaniasis cutánea y mucosa cursan con bajos títulos de anticuerpos (Gutierrez Y., *et. al.* 1991; Grimaldi G., *et. al.* 1993).

Recientemente se ha demostrado una gran diferencia entre las subclases de anticuerpos específicos de *Leishmania* en las distintas formas clínicas de la leishmaniasis. De tal forma que en la LC predominan las subclases de inmunoglobulinas

IgG2a, en la LMC la subclase IgG3, en la LCD la subclase IgG1 y en la LV los anticuerpos predominantes son IgG1 (Ulrick M., *et. al.* 1996). Esta producción selectiva de subclases de anticuerpos parece estar relacionada con las citoquinas secretadas por cada tipo de células (Liew F. Y., *et. al.* 1993). Existen evidencias sobre la relación entre la respuesta Th1 o Th2 y los isotipos predominantes de las inmunoglobulinas específicas: las Th1 son inductoras de la producción de IgG2a, mientras que las Th2 inducen la producción de IgE e IgG1 (Coffman R.L., *et. al.* 1988; Stevens T.L., *et. al.* 1988).

1.6. Patrón de citoquinas y las formas clínicas de *Leishmania*.

Los estudios realizados en humanos para tratar de correlacionar los patrones de citoquinas producidas por células T y las formas clínicas de la leishmaniasis han mostrado un perfil mezclado de citoquinas.

La LC se caracteriza por un patrón de citoquinas tipo Th1 con producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α en niveles significativos (Carvalho E.M., *et. al.* 1985; Scott P., *et. al.* 1988; Liew F.Y., *et. al.* 1991; Castés M., *et. al.* 1993b; Pirmez C., *et. al.* 1993). La producción de IL-5 es mucho más baja que en los pacientes con leishmaniasis cutánea difusa.

Los pacientes con LCD se caracterizan por presentar una respuesta celular débil. Existe un predominio de citoquinas tipo Th2, ya que no hay producción de IFN- γ , ni IL-2 (Castés M., *et. al.* 1993), pero sí presentan niveles significativos de IL-5 y TNF- α (Pisa P., *et. al.* 1990; Castés M., *et. al.* 1993b). Sin embargo, el TNF- α no parece contribuir a la curación de las lesiones en ausencia de una respuesta funcional de linfocitos T.

En la LMC se ha sugerido que el patrón de citoquinas es una mezcla de tipo Th1 y Th2, por lo que induce una respuesta inmunitaria mixta, tanto humoral como celular; sin embargo, cuando se producen ambos patrones de citoquinas, la respuesta Th2 puede predominar sobre la Th1 y la enfermedad puede mantenerse en un estado crónico. Se ha observado que en esta forma clínica se producen niveles séricos de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-5 (Liew F.Y., *et. al.* 1991; Castés M., *et. al.* 1993; Castés M., *et. al.* 1993b).

La LV se caracteriza por una importante inhibición de la respuesta celular que conduce a una multiplicación incontrolada del parásito. No se observa producción de IL-2 e IFN- γ (Carvalho E.M., *et. al.* 1985; Sacks D.L., *et. al.* 1987; Carvalho E.M., *et.*

al. 1992), pero existe una moderada producción de IL-4 (Zwingenberger K., *et. al.* 1990; Carvalho E.M., *et. al.* 1994), la cual desaparece rápidamente, y altos niveles de IL-10, por activación de los linfocitos B (Pirmez C., *et. al.* 1993; Holaday B.J., *et. al.* 1993; Cáceres-Dittmar G., *et. al.* 1993).

1.7. Diagnóstico de leishmaniasis.-

Para llegar al diagnóstico de leishmaniasis primero se deben considerar los antecedentes epidemiológicos, dado que existen cuatro tipos de leishmaniasis cuyas características van a determinar la técnica de diagnóstico a emplear. Por lo tanto conocer el lugar de procedencia del paciente facilita el diagnóstico y por lo tanto el tratamiento a seguir. Después de considerar los antecedentes, se procede al diagnóstico de laboratorio basado en métodos directos que persiguen la visualización del parásito o de su ADN y métodos indirectos que se basan en la detección de la respuesta inmune del hospedador, buscando anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la enfermedad.

1.7.1. Métodos Directos.-

1.7.1.1. Frotis de la lesión

En el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea la obtención de las muestras debe ser efectuada a partir de lesiones activas de la piel o mucosas, teniendo en cuenta que ésta debe realizarse en los bordes de la lesión o en el fondo de la úlcera, después de eliminar la zona superior necrosada. Esta toma de muestras puede realizarse mediante un simple raspado de la lesión con un brocal odontológico, efectuando incisiones de algunos milímetros hasta alcanzar la dermis o por aspiración con aguja o bien mediante biopsia de todo el espesor con un *punch*.

En el caso de la leishmaniasis visceral, la sensibilidad del examen directo varía en función del producto patológico escogido para efectuar el diagnóstico. La punción esplénica, aunque es la que presenta una mayor sensibilidad (95%), dada la localización preferencial de los parásitos en el bazo, se suele dejar como último recurso por los riesgos asociados. Por lo tanto, el método más utilizado, tanto por su facilidad y seguridad de ejecución como por su sensibilidad, es el aspirado de médula ósea (52-70%), realizado por punción esternal en los adultos y de cresta ilíaca en los niños. En individuos inmunodeprimidos esta prueba presenta una sensibilidad de hasta un 94% (78-94%) durante el primer episodio y menor (64%) en las recaídas. El parásito también

puede buscarse en la sangre periférica o en la capa de leucocitos, hígado, tracto gastrointestinal, nódulos linfáticos, líquido pleural, etc.

Se puede proceder a la observación de las formas amastigotes con cualquiera de los productos patológicos obtenidos, tras la tinción de los frotis con el colorante de Giemsa o análogos.

La tasa de demostración parasitaria a través del frotis es variable, sin embargo su sensibilidad es baja y dependerá de la destreza de la persona que realiza la lectura.

1.7.1.2. Cultivo de leishmanias

El cultivo de *Leishmania* es una técnica auxiliar para el diagnóstico directo, ya que permite el aislamiento del parásito y facilita su detección. No existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. A pesar de ello, los medios más aceptados y más frecuentemente utilizados son los medios difásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN) (Dedet J.P., *et. al.* 1999) y los medios líquidos para cultivos de células de insectos o mamíferos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con suero bovino fetal inactivado (10-30%) y a una temperatura de crecimiento entre 22°C a 28°C.

El material puede ser obtenido por punción aspirativa o por biopsia. El material obtenido a través de punción aspirativa puede ser inoculado directamente en el medio de cultivo, y el material obtenido por biopsia debe ser homogeneizado en solución salina con antibióticos (penicilina y estreptomycin o gentamicina) antes de ser inoculado en el medio de cultivo. Cuando se efectúa el cultivo en el medio NNN hay que realizar resiembras cada siete días, practicando al menos cuatro resiembras sucesivas antes de dar los resultados como negativos. En el caso de haber efectuado la siembra en un medio líquido, se debe proceder con una periodicidad inferior (cada 4-5 días, dependiendo de la cepa) y debe mantenerse el cultivo durante un mínimo de un mes.

El cultivo celular, habitualmente de macrófagos, se utiliza raramente en el diagnóstico de leishmaniasis y se aplica más frecuentemente en estudios biológicos del parásito y en ensayos de fármacos con posible actividad leishmanicida.

L. (V.) braziliensis presenta un crecimiento pobre o no se desarrolla en los medios de cultivo, ya que existen pocos amastigotes en los tejidos infectados. La sensibilidad del cultivo está alrededor del 50%.

La técnica del cultivo ofrece ventajas sobre los frotis coloreados por la fácil observación de un gran número de formas promastigotes móviles, en contraste con la dificultad y el mayor tiempo empleado en la búsqueda de formas amastigotes.

1.7.1.3. Inoculación en animales

La inoculación en animales de experimentación, realizada habitualmente en el hámster dorado y por vía intraperitoneal, puede ser de gran utilidad en el caso de cepas de difícil crecimiento o de inóculos contaminados. Esta técnica presenta, sin embargo, el grave inconveniente de su tardía, ya que la observación de los parásitos, generalmente en el bazo hipertrofiado del animal, requiere unos 2-3 meses desde la inoculación.

1.7.1.4. Búsqueda de ADN de Leishmania

Actualmente, la puesta a punto de técnicas de biología molecular es una alternativa excelente en el diagnóstico de leishmaniasis. Para detectar la presencia de ADN del parásito, una de las técnicas más ensayadas es la amplificación del material genómico del parásito por PCR (Ashford D.A., *et. al.* 1995; Belli A., *et. al.* 1998; Piñero J., *et. al.* 1999; Avilés H. *et. al.* 1999). Su sensibilidad es idéntica o superior a la técnica de referencia, que es el cultivo, y superior al examen directo. Además presenta la ventaja de poder disponer de un resultado positivo o negativo con rapidez. Actualmente esta técnica no está comercializada y sólo se utiliza en laboratorios especializados.

1.7.2. Métodos Indirectos.-

1.7.2.1. Intradermorreacción de Montenegro

Este método se basa en poner en evidencia una hipersensibilidad de tipo retardada, que se manifiesta de forma temprana (hacia la cuarta o quinta semana) y que, salvo raras ocasiones, perdura toda la vida. La prueba consiste en la inoculación intradérmica de una solución de leishmanina, formada por una suspensión estéril de promastigotes lisados, fenicada y tamponada. La lectura, por la técnica del bolígrafo, se realiza a las 48-72 h de la inoculación y se considera positiva cuando aparece una induración de un diámetro igual o superior a los 5 mm. La reacción positiva indica contacto previo y tiene gran valor en el estudio de lesiones crónicas o evaluaciones epidemiológicas (Montenegro J. 1926; Da Costa C.A., *et. al.* 1996).

Es un test cutáneo de gran valor predictivo debido a su alta sensibilidad, pero puede dar falsos negativos y positivos en casos de lepra, tuberculosis, epiteloma maligno o *larva migrans*.

1.7.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y/o test enzimáticos (ELISA)

Estas reacciones son muy útiles, principalmente en casos con lesiones extensas o múltiples y en el diagnóstico precoz de las lesiones mucosas primarias o secundarias. Asimismo para el seguimiento post-tratamiento. Estas pruebas consisten en detectar en el suero del paciente anticuerpos circulantes anti-*Leishmania*.

Para el diagnóstico serológico debe tenerse en cuenta que las leishmanias presentan fracciones antigénicas compartidas con otros parásitos kinetoplastidos, pudiendo existir reacciones cruzadas entre ambos. También se han descrito, aunque en menor medida, la existencia de reacciones cruzadas en enfermos de amebiasis, paludismo, tuberculosis, toxoplasmosis, lepra y otras enfermedades infecciosas (Voller A., *et. al.* 1981; Burns J.M., *et. al.* 1993). Por otro lado, la tasa de anticuerpos varía con el estado inmunológico del paciente y con la edad. Así, si bien en los adultos inmunocompetentes los títulos de anticuerpos que se detectan son generalmente altos, no sucede lo mismo en los pacientes inmunocomprometidos (VIH, pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores, etc.), o en los niños de corta edad, en los que los títulos pueden incluso, ser negativos. La seronegatividad al antígeno de *Leishmania* en los pacientes coinfectados con el VIH alcanza un 43% frente a una sensibilidad de las técnicas serológicas del 87-93% en los casos de leishmaniasis visceral en individuos inmunocompetentes (Montalban C., *et. al.* 1990; Alvar J. 1994). Sin embargo, existen diferencias según la prueba empleada, el antígeno utilizado o el laboratorio donde se realiza. La OMS recomienda la utilización conjunta de dos o más pruebas para incrementar la sensibilidad.

La sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas depende de la calidad del antígeno utilizado y de factores intrínsecos a la técnica empleada. La utilización de promastigotes enteros en técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), aporta una notable estabilidad al antígeno en cuanto a su composición y, por lo tanto, homogeneidad de resultados. Por el contrario, el principal inconveniente en la utilización de extractos solubles obtenidos a partir del parásito (sonicación, homogeneización, congelación-descongelación, etc.) está en la heterogénea composición del antígeno obtenido. Su utilización en técnicas de ELISA o de inmunocromatografía es compartida o sustituida por la de antígenos purificados y recombinantes que presentan una elevada sensibilidad y especificidad y evitan las reacciones cruzadas que se dan con la enfermedad de Chagas.

Las inmunoglobulinas habitualmente detectadas suelen ser totales o de la clase IgG. La determinación de IgM, tanto mediante IFI como con la técnica ELISA, puede permitir la detección de un proceso activo subclínico si bien no suele utilizarse. La detección de IgE específicas se asocia con enfermedad cutánea crónica y mucosa y se ha señalado también como un buen indicador de leishmaniasis visceral activa. La detección de anticuerpos en el caso de las leishmaniasis cutáneas del Viejo Mundo es poco sensible. En cambio, puede ser útil para diagnosticar las infecciones causadas por el subgénero *Viannia* en el Nuevo Mundo.

La detección de anticuerpos frente a antígenos de *Leishmania* mediante ELISA a sido la principal alternativa para un diagnóstico rápido (Kar K. 1995). Las moléculas del parásito con carácter antigénico descritas hasta ahora son variadas y numerosas (Jaffe C.L., *et. al.* 1988; Reed S.G., *et. al.* 1990). Algunos son antígenos situados en la superficie del parásito, que se consideran proteínas específicas de *Leishmania*, tales como la PSA, la gp63 (Shreffler W.G., *et. al.* 1993; Gicheru M.M., *et. al.* 1994), la glucoproteína de superficie (gp46) o las proteínas asociadas a lipofosfoglicanos, como es la KMP-11 (Carmelo E., *et. al.* 2002). Otras son proteínas localizadas en el interior del protozoo, conservadas evolutivamente, como pueden ser las proteínas de choque térmico (Ang D., *et. al.* 1991; Young D.B. 1992; Zurita A.I., *et. al.* 2003), las proteínas ribosomales (Soto M., *et. al.* 1993; Soto M., *et. al.* 1995; Soto M., *et. al.* 1995b; Soto M., *et. al.* 1996; González A.C., *et. al.* 2002) y las histonas (Soto M., *et. al.* 1995c; Carmelo E., *et. al.* 2002). Entre las proteínas ribosomales, las ácidas (LiP2a, LiP2b, LiP0/LcP0) (Soto M., *et. al.* 1993b; Soto M., *et. al.* 1995; Soto M., *et. al.* 1995b) son, hasta ahora, las más caracterizadas desde el punto de vista serológico. Estas actúan como importantes antígenos durante la infección con *Leishmania*. Todas estas proteínas han sido caracterizadas principalmente por *Western blot*, empleando sueros de pacientes o de perros infectados.

Una característica común entre la mayoría de los antígenos conservados de *Leishmania*, es su elevada frecuencia de ser reconocidos por sueros de pacientes con leishmaniasis, sin embargo, al presentar secuencias muy conservadas evolutivamente pueden presentar reacción cruzada con anticuerpos generados por otras enfermedades infecciosas (Enfermedad de Chagas) y hasta con los anticuerpos producidos durante procesos de autoinmunidad, (Lupus Eritematoso Sistémico, LES).

Actualmente, se están llevando a cabo estudios para seleccionar antígenos específicos de *Leishmania* y así evitar reacciones serológicas cruzadas con otras

especies de la familia Trypanosomatidae y algunas Mycobacterias (Soto M., *et. al.* 1996b; Zurita A.I., *et. al.* 2003).

Tres proteínas de *L. infantum*, la LiP2a, la LiP2b y la LiP0, se han descrito como importantes antígenos durante la leishmaniasis canina, ya que las proteínas LiP2a y LiP2b son reconocidas por un 80 y un 100% de los sueros de perro con LV, respectivamente (Soto M., *et. al.* 1995b), pero también son reconocidas por los sueros de pacientes con LV y LMC (Soto M., *et. al.* 1996). Sin embargo, a parte de ser reconocidas por el suero de enfermos con leishmaniasis humana son también reconocidas por el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Esta reactividad cruzada se debe al hecho de que el principal epítipo lineal de estas proteínas P2 se localiza cerca de la región conservada carboxilo terminal, la cual presenta un 90% de identidad con las proteínas ribosomales P de humano y representa el principal epítipo autoinmune en el suero de los pacientes con LES y con enfermedad de Chagas. La eliminación de esta región conservada evita la reacción cruzada con el suero de estos pacientes siendo reconocida únicamente por el suero de pacientes con leishmaniasis humana, LMC y LV (Soto M., *et. al.* 1996).

La proteína ribosomal LiP0 es diferente a las P0 de la mayoría de los eucariotas, ya que carece de la típica región C-terminal, aunque es muy similar a la que poseen las arqueobacterias (Soto M., *et. al.* 1993b). El único epítipo de esta proteína LiP0 que es reconocido por los anticuerpos durante la LV canina, se localiza en una posición anterior, pero adyacente, al extremo carboxilo no conservado (Soto M., *et. al.* 1995b).

Se han aislado otra serie de proteínas ribosomales conservadas evolutivamente con el fin de estudiar su capacidad serodiagnóstica. Entre ellas citar las proteínas ribosomales L25 y L14 de *Leishmania braziliensis*, ambas localizadas en la subunidad grande del ribosoma.

La proteína L14 se caracteriza por presentar dos segmentos conservados evolutivamente y 7 aminoácidos también conservados cuya funciones todavía se desconocen (Haynes S.R. 1997). Empleando la proteína recombinante L14 y péptidos sintéticos se demostró que ésta proteína no era válida para el diagnósticos de leishmaniasis al no ser reconocida por los sueros de enfermos con LC y/o LMC (González A.C., *et. al.* En prensa).

La proteína ribosomal L25 juega un importante papel durante la biosíntesis del ribosoma debido a que es una de las primeras proteínas que se unen al ARN ribosomal

mediante tres dominios que se localizan en el extremo carboxilo terminal (El-Baradi T.T.A.L., *et. al.* 1984; Weitzmann C.J., *et. al.* 1900; Rutgers C.A., *et. al.* 1991). La síntesis del ribosoma es un proceso que comienza en el núcleo, por lo que las proteínas ribosomales poseen secuencias que les permiten su translocación desde el citoplasma hacia el núcleo, éstas se denominan Secuencias de Localización Nuclear (SLN) (Rutgers C.A., *et. al.* 1990; Schaap P.J., *et. al.* 1991). En el caso de la L25 de *L. braziliensis* esta secuencia se localiza en el extremo amino terminal, que a diferencia de la región carboxilo, es la menos conservada evolutivamente (González A.C., *et. al.* 2002). La proteína recombinante aislada en condiciones desnaturizantes era reconocida por sueros de personas sanas y de pacientes con LMC, LC y con enfermedad de Chagas, por lo que era una reacción antígeno-anticuerpo no específica. Sin embargo, cuando se analizan péptidos que solapaban la región amino terminal, por ser la menos conservada, la especificidad aumentó, siendo reconocidos únicamente por pacientes con leishmaniasis y con enfermedad de Chagas, por lo que pueden ser empleados como parte de un complejo antigénico para el reconocimiento de enfermedades causadas por tripanosomátidos (González A.C., *et. al.* 2002).

Las proteínas de estrés o de choque térmico, HSPs, constituyen otro grupo de familia de proteínas conservadas evolutivamente. Aunque su expresión es constitutiva, se ha observado un incremento en su síntesis bajo determinados estímulos, ya sea un cambio de la temperatura o cualquier tipo de estrés celular. Aunque su principal papel es la termotolerancia, las HSPs también desempeñan otras funciones vitales en ausencia de estrés, como puede ser el tener un papel esencial durante el proceso de biosíntesis de las proteínas, especialmente en el transporte, translocación y plegamiento de proteínas (Ang D., *et. al.* 1991). Además, las proteínas de estrés han sido identificadas como el mayor inmunógeno en algunos estados de enfermedades infecciosas y síndromes autoinmunes. Concretamente, las Hsp70 de *L. donovani*, de *L. infantum* y de *L. braziliensis* han sido identificadas al ser reconocidas por sueros de leishmaniásicos (MacFarlane J., *et. al.* 1990; Skeiky Y.A.W., *et. al.* 1995; Quijada L., *et. al.* 1996; Zurita A.I. *et. al.* 2003). Las Hsp70 se han encontrado en todos los tipos de células procariotas y eucariotas, por lo que están consideradas como las proteínas conservadas más abundantes en todos los organismos. A pesar de esto, la respuesta celular y humoral que desencadena es muy específica y no induce autoanticuerpos durante la infección (Skeiky Y.A.W., *et. al.* 1995; Quijada L., *et. al.* 1996). La Hsp83 también forma parte de esta familia de proteínas y ha sido descrita como un antígeno inmunodominante

durante la infección causada por *L. infantum* y *L. braziliensis* (Skeiky Y.A.W., *et. al.* 1995; Angel S.O., *et. al.* 1996). También se ha comprobado que sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea americana (LC) reaccionan al enfrentarlos a la proteína Hsp60 de *L. major* y además de una manera específica, ya que dichos sueros no reaccionan contra la Hsp60 de humanos (Rey-Ladino J.A., *et. al.* 1997).

Las histonas forman otro grupo de proteínas conservadas evolutivamente con función estructural, ya que se asocian con el ADN para formar el nucleosoma. Hay cinco clases principales de histonas, (H1, H2A, H2B, H3 y H4) que comprenden la familia de proteínas pequeñas básicas (Galanti N. 1998). La histona H1 ya se ha descrito en varios Trypanosomátidos tales como *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* y *L. braziliensis* (Burri M., *et. al.* 1993; Aslund L., *et. al.* 1994; Fasel N.J., *et. al.* 1994; Martínez E., *et. al.* 2002). Desde el punto de vista del serodiagnóstico, la histona H1 de *L. braziliensis* es reconocida por el 66'6% de los sueros de pacientes con LC, pero esta capacidad antigénica, de elevada sensibilidad, se ve perturbada por presentar reacción cruzada con los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas. Se ha demostrado mediante el empleo de péptidos sintéticos que el determinante antigénico de la histona H1 se localiza en la región central, pero su utilidad para el diagnóstico de LMC producida por *L. braziliensis* es limitada, ya que sólo es reconocido por el 18'75% de los sueros. Sin embargo, la reacción cruzada con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas es nula (Carmelo E., *et. al.* 2002a). En 1992, Soto *et. al.*, describieron por primera vez a la histona H2A de *L. infantum* como molécula antigénica durante la leishmaniasis visceral canina, ya que el 72% de los sueros procedentes de perros infectados con *L. infantum* reconocían dicha proteína (Soto M., *et. al.* 1992). Este resultado se repitió con las histonas H2B, H3 y el fragmento amino terminal de la H4 de *L. infantum*, donde se observó una respuesta humoral elevada de los sueros de perros con LV al enfrentarlos a estas proteínas, siendo del 44% para la histona H4 (Soto M., *et. al.* 1994; Soto M., *et. al.* 1996b; Soto M., *et. al.* 1999). Mediante el empleo de péptidos sintéticos, se ha podido determinar el epítipo antigénico de estas proteínas, y se ha observado que en todos los casos, se localiza en la región menos conservada evolutivamente, ya sea en el extremo amino o en el extremo carboxilo terminal (Soto M., *et. al.* 1995b-c; Soto M., *et. al.* 1996b; Soto M., *et. al.* 1999). También se ha encontrado que el 58% de los sueros de pacientes con Leishmaniasis tegumentaria de América latina tienen anticuerpos que reaccionan con la histona H2B de *L. peruviana* (Montoya Y., *et. al.* 1997).

1.8. Distribución geográfica.-

La LC en el Viejo Mundo se propaga por zonas áridas, como es el centro y oeste de Asia, desde Siria a Afganistán, y por regiones semiáridas del norte de África y Asia. Mientras que la LC en el Nuevo Mundo se distribuye por el centro y sur de América, principalmente en Brasil y Perú, al igual que ocurre con la LMC.

Por último, la LV se distribuye por África oriental, principalmente Sudán y Kenia, también en Bangladesh, noreste de la India y el Nepal y la LV infantil es característica de la cuenca mediterránea. Se extiende hacia el este, a través del suroeste asiático hasta China y hacia el oeste al centro y sur de América, donde la mayoría de los casos se localizan en el noreste de Brasil (figura 1.12).

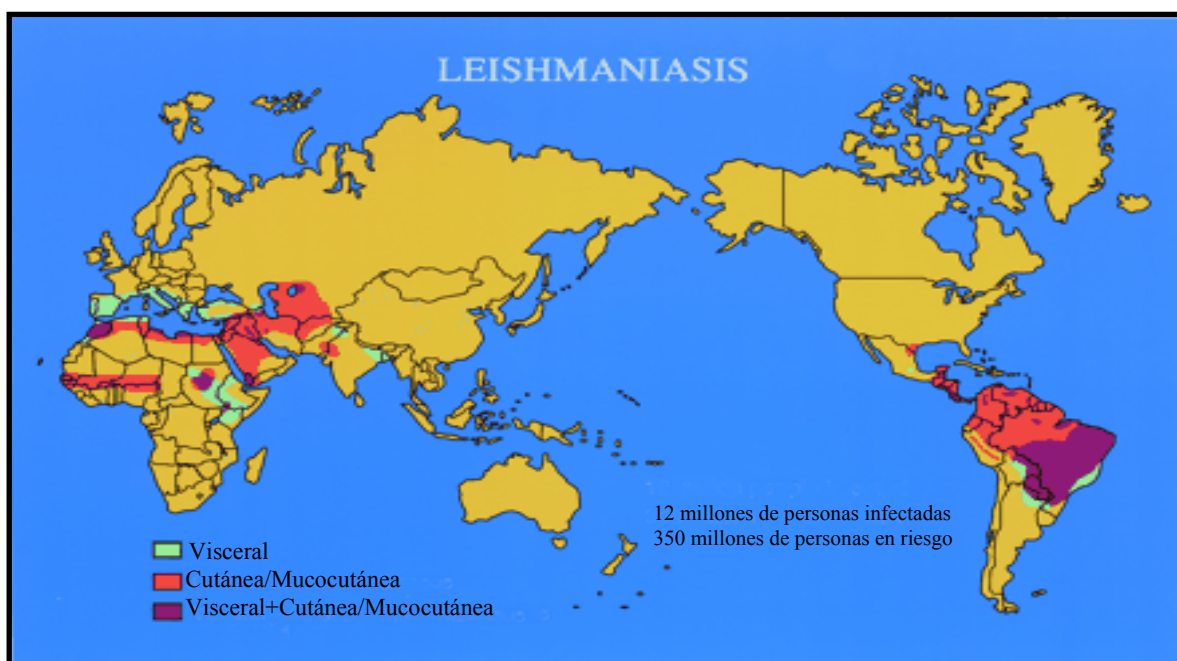


Figura 1.12: Distribución geográfica de las cuatro formas diferentes de leishmaniasis.

1.8.1. La leishmaniasis en España.-

En España, los casos de leishmaniasis declarados son fundamentalmente viscerales, la mayoría de ellos en enfermos infectados por el VIH. De los 1440 casos declarados de coinfección VIH-*Leishmania* entre 1990 y 1998 en la región mediterránea, 835 lo han sido en nuestro país (Alvar J. 1994). La aplicación de la electroforesis de isoenzimas en la caracterización de las cepas de *Leishmania* en España ha permitido incriminar a *Leishmania infantum* como agente responsable de las

leishmaniasis cutánea y visceral, lo que sirvió para descartar a *Leishmania trópica* y a *Leishmania donovani* como agentes etiológicos de ambas formas de leishmaniasis. En nuestro país, *L. infantum* se encuentra distribuida principalmente en la región mediterránea (Ozbel Y., *et. al.* 1995).

Los estudios de epidemiología molecular llevados a cabo, han puesto de manifiesto la existencia de un elevado polimorfismo de las cepas de *L. infantum* en nuestro país, con 22 zimodemas identificados de los 33 descritos en todo el mundo, de los que 12 han sido citados únicamente en España. Algunos de ellos causan la LV, siendo considerados como viscerotropos, mientras que otros se consideran dermatropos al ser aislados únicamente de lesiones cutáneas en pacientes inmunocompetentes. Si bien la leishmaniasis en España se considera una zoonosis, con el perro como reservorio del parásito, tan sólo 6 de los 22 zimodemas identificados han sido aislados del reservorio canino, lo que puede indicar la existencia de zimodemas con un ciclo de tipo antroponótico. De las 12 especies de flebotomos encontradas en España, 2 han sido descritas como vectores de *L. infantum*. Se trata de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, que pueden actuar de forma concomitante en la transmisión de la leishmaniasis.

1.9. Tratamiento de la leishmaniasis.-

Se recomienda que antes de efectuar cualquier tratamiento, se disponga de la confirmación parasitológica. Los derivados antimoniales pentavalentes estibogluconato sódico (Pentostam®) (Goodwin L.G. 1995) y antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Slappendel R.J., *et. al.* 1997; Riera C., *et. al.* 1999), son la primera línea de fármacos en el tratamiento de las leishmaniasis y se caracterizan por ser efectivos frente a las distintas formas clínicas inhibiendo enzimas que participan en la glicólisis y β -oxidación. En el caso de la leishmaniasis visceral se aconseja su administración por vía sistémica, en régimen de hospitalización. Las dosis terapéuticas son de 20 mg de SbV/kg/día durante 28 días. Otros fármacos utilizados son la Anfotericina B, Pentamidina, Alopurinol, Azoles e Inmunomoduladores, tanto inmunoestimuladores como inmunosupresores, que inciden sobre el sistema inmune del hospedador con el fin de reconducirlo a la normalidad. Uno de los inmunoestimuladores que se está empleando hoy en día es una citoquina recombinante, el IFN- γ recombinante, sin embargo su coste es elevado y además presenta efectos secundarios (Croft S.L., *et. al.* 2002).

1.10. Modelo murino de leishmaniasis experimental.-

En la actualidad se han desarrollado numerosos modelos experimentales de leishmaniasis, pero estos modelos no reproducen completamente la enfermedad humana. Uno de los factores que contribuyen a diferenciar entre modelos humanos y animales es la cantidad y naturaleza del parásito inoculado. En una infección natural, el mosquito inyecta en la piel un número muy pequeño de promastigotes metacíclicos (posiblemente de 100 a 1000) junto con una fuerte saliva bioactiva, sin embargo en infecciones experimentales se inyectan de mil a millones de promastigotes derivados de cultivos o amastigotes derivados de tejidos.

Uno de los modelos más empleados es el murino, ya que ha permitido caracterizar cuales son los mecanismos del sistema inmune, necesarios para el desarrollo de una respuesta celular y/o humoral.

Los ratones pueden ser infectados con especies de *Leishmania* patógenas para el hombre y reproducen la mayoría de los aspectos de la enfermedad humana. Dependiendo de la clase de ratón que se use, el rango de susceptibilidades a la enfermedad es diferente. Así, los ratones BALB/c, SWR/J, DBA/2 y A/Jax infectados con *L. major*, *L. mexicana* o *L. amazonensis* son muy susceptibles a la enfermedad, provocándoles grandes úlceras cutáneas que no se curan, y que evolucionan hacia la visceralización y producción de metástasis, provocándoles la muerte. Estos ratones no producen respuesta de hipersensibilidad retardada pero sí producen títulos elevados de anticuerpos. Por otro lado, los ratones C57BL/6, C3H, B10.D2 y CBA infectados con las mismas cepas de *Leishmania* son resistentes a la enfermedad, desarrollan lesiones localizadas, no ulceradas, que curan en 10 a 12 semanas y además son resistentes a la reinfección y se ha demostrado que desarrollan una respuesta de hipersensibilidad retardada (Reiner S.L., *et. al.* 1995).

En este modelo animal, el uso de una población clonal de parásitos elimina la contribución de la diversidad genética de los parásitos y permiten analizar qué factores del hospedador determinan las manifestaciones de la enfermedad.

En los ratones, la eliminación de la infección depende de la polarización hacia la activación de uno de los dos subgrupos de células T CD4+, Th1 ó Th2. Se ha estudiado bien el papel de estos subgrupos de células T CD4+ en la infección por *Leishmania major* en este modelo murino experimental (Reiner S.L., *et. al.* 1995). Para el caso de la infección por *L. infantum*, el fin de la infección es determinada por el balance entre la respuesta Th1 y Th2, que conlleva a la curación o progresión de la enfermedad

respectivamente (González-Asequinolaza G., *et. al.* 1999). La subdivisión en células Th1 y Th2 está basada en el patrón de citoquinas que ellas producen. Los ratones BALB/c producen principalmente citoquinas de tipo Th2, en concreto IL-4 a las pocas horas de la infección con *L. major*, dando como resultado una enfermedad diseminada que finaliza en muchos casos con la muerte del animal entre las doce y catorce semanas (Reiner S.L., *et. al.* 1995; Julia V., *et. al.* 1996; Launois P., *et. al.* 1997; Himmelrich H., *et. al.* 2000; Solbach W., *et. al.* 2000). La neutralización de esta citoquina con anticuerpos específicos o de su receptor, confiere protección en estos ratones. Pero esto no siempre ocurre así, ya que en algunos casos se ha observado que la ausencia de esta citoquina o de su receptor no lleva a diferencias en el nivel de infección de los ratones BALB/c, sino que siguen desarrollando la enfermedad (Noben-Trauth N., *et. al.* 1996; Noben-Trauth N., *et. al.* 1999). Sin embargo, durante el período activo de desarrollo de una lesión, tanto los ratones susceptibles a la infección como los resistentes producen una gran cantidad de citoquinas Th2, concretamente IL-4 (Morris L., *et. al.* 1992; Morris L., *et. al.* 1993). Una diferencia importante entre los ratones susceptibles y los resistentes es que éstos últimos son capaces de redirigir esta respuesta hacia un perfil Th1 y controlar la enfermedad por la vía de la ONS (Liew F. Y., *et. al.* 1990; Heinzl F. P., *et. al.* 1991; Solbach W., *et. al.* 2000). Por lo tanto, no es la ausencia de esta citoquina lo que determina la resistencia a la enfermedad, sino el poder cambiar la respuesta que ella desencadena, lo que hace que los ratones sean resistentes (Sacks D., *et. al.* 2002). Un factor importante para que la respuesta se polarice hacia un fenotipo Th1 o Th2 son las citoquinas que están presentes en un primer momento, la IL-12 y la IL-10 (Solbach W., *et. al.* 2000). La IL-12 se produce si ciertas proteínas del parásito se ponen en contacto con receptores TLR presentes en las células presentadoras de antígenos (CPA), principalmente en las células dendríticas, ya que los macrófagos infectados ven reducida su capacidad de secretar esta interleuquina (Reiner S. L., *et. al.* 1994; Carrera L., *et. al.* 1996; Konecny P., *et. al.* 1999; Von Stebut E., *et. al.* 2000). Estas células al activarse producen IL-12, que activan a los linfocitos T CD4⁺ por la ruta STAT 4/T-bet secretándose las citoquinas que determinan la respuesta Th1 (Stamm L.M., *et. al.* 1999). Pero si las CPA no se activan por esta vía, entonces secretan IL-10 e IL-4 que activan a los linfocitos T CD4⁺ por la ruta STAT 6/GATA 3, produciéndose las citoquinas que desencadenan una respuesta Th2 (Jankovic D., *et. al.* 2001; Sacks D., *et. al.* 2002; Scott P., *et. al.* 2002). Se ha demostrado que la IL-12 es crucial en el control y la curación de las infecciones por *L. major* ya que, el tratamiento con anti-IL-

12 de ratones C3H resistentes a la infección los vuelve susceptibles, desarrollándose una respuesta de tipo Th2 (Sypek J.P., *et. al.* 1993; Scharton-Kersten T., *et. al.* 1995). Además, la IL-12 usada sola o en combinación con antígenos de *Leishmania* estimula el desarrollo de una respuesta tipo Th1 en ratones BALB/c susceptibles e infectados con *L. major* y quedan protegidos de posteriores reinfecciones con esta *Leishmania* (Alonso L.C.C., *et. al.* 1994). Por el contrario, la IL-12 sola es incapaz de prevenir la progresión de la enfermedad en estos ratones cuando el tratamiento se inicia después de la primera semana de infección (Sypek J.P., *et. al.* 1993). Además se ha observado, que en infecciones con *L. mexicana* (Buxbaum L.U., *et. al.* 2002), la IL-12 no juega un papel fundamental en redirigir la respuesta Th2 e iniciar y mantener una respuesta Th1, como ocurre en infecciones con *L. major* (Heinzel F. P., *et. al.* 1993; Sypek J.P., *et. al.* 1993; Stamm L.M., *et. al.* 1999; Park A.Y., *et. al.* 2000; Stobie L., *et. al.* 2000), por lo que deben de existir otros elementos que intervienen en el cambio hacia una respuesta Th1.

En ratones genéticamente resistentes, el IFN- γ juega un papel importante en el desarrollo de células Th1, ya que el tratamiento con anti-IFN- γ , o la eliminación del gen del IFN- γ o de su receptor CD40 ó del ligando de CD40, da como resultado el desarrollo de úlceras cutáneas severas y la visceralización del parásito (Swihart K., *et. al.* 1995). Sin embargo, el IFN- γ no es suficiente para inducir protección en ratones BALB/c susceptibles ya que, a diferencia de la IL-12, ni la dosis única, ni la liberación sostenida de IFN- γ hasta 6 semanas en estos ratones, es capaz de cambiar el curso progresivo de la enfermedad. Por lo tanto, la carencia temprana del IFN- γ no parece ser la razón del fenotipo Th2 en los ratones BALB/c, debido tal vez, a que IFN- γ no inhibe la transcripción de IL-4 (Reiner S.L., *et. al.* 1995).

Otra contribución importante que ha tenido el empleo de este modelo de ratón ha sido el descubrir que la quimioterapia no es efectiva en ausencia de una respuesta inmune mediada por células T. Estos estudios experimentales ponen de manifiesto la necesidad de activar el sistema inmune para que la quimioterapia tenga éxito.

1.11. Proteínas ribosomales estimuladoras de la respuesta inmune celular en el modelo murino.-

Actualmente se han descrito diferentes moléculas estimuladoras capaces de alertar al sistema inmune innato para iniciar una respuesta inmune específica. La recuperación y la resistencia a la reinfección por *Leishmania* depende del desarrollo de

una respuesta de linfocitos T antígeno específica que incluye, la proliferación de células Th1 y la secreción de citoquinas de tipo Th1 que desencadenan una respuesta celular.

Una de las proteínas estimuladoras, capaz de provocar una respuesta inmune mediada por células tipo Th1 e inducir la producción de citoquinas de tipo Th1 es la proteína ribosomal LeIF (factor de iniciación ribosomal) de *L. braziliensis*, homóloga al factor de iniciación 4A de eucariotas (Skeiky, Y.A.W., *et. al.* 1995). Este efecto fue estudiado empleando ratones BALB/c como modelo experimental. Está aceptado que en estos ratones se desarrolla un perfil Th2 entre los 7 y 10 días después de la infección, provocándoles, por tanto, la progresión de la enfermedad. Sin embargo se observó, que células derivadas de los nódulos linfáticos de ratones BALB/c, inmunizados con la proteína ribosomal LeIF y posteriormente infectados con *L. major*, proliferaban al enfrentarlas a esta proteína. Para analizar el tipo de citoquina que inducía, se enfrentó un extracto soluble de proteínas de *Leishmania* a las células de los ratones infectados, observándose niveles altos de IL-4, sin embargo, la estimulación de las mismas células con LeIF inducía niveles de IFN- γ elevados y no aparecía IL-4.

Por lo tanto, ante estas observaciones y en contra de la opinión establecida, los ratones BALB/c infectados pueden desarrollar una respuesta celular Th1 que es detectada al estimular con el antígeno recombinante definido.

La proteína ribosomal LeIF también puede mimetizar el efecto de la IL-12, ya que produce una baja secreción de IL-4 en las células linfáticas de ratones BALB/c infectados con *L. major* (Heinzel F.P., *et. al.* 1993).

Por otra parte, en ausencia de una respuesta proliferativa, la proteína LeIF es capaz de estimular macrófagos para que produzcan IL-12 e IL-18, y posteriormente, son estas citoquinas, las responsables de estimular a las células NK a producir IFN- γ . La ruta que se ha establecido para la producción de IFN- γ es la siguiente: debido a que la proteína LeIF requiere la presencia de IFN- γ para producir IL-12 (Probst P., *et. al.* 1997), se ha postulado que la IL-18 se produce antes que la IL-12 y ésta es la citoquina que actúa sobre las NK para producir IFN- γ . Esta fuente inicial de IFN- γ junto con la LeIF activa la transcripción del gen p35, obteniéndose IL-12. A continuación, la IL-18 y la IL-12 pueden actuar por separado o sinérgicamente sobre las células NK para desencadenar la producción de niveles elevados de IFN- γ e IL-12 (Skeiky Y.A.W., *et. al.* 1998; Soto M., *et. al.* 2000). Por lo tanto, el LeIF puede actuar como una molécula

estimuladora microbiana capaz de alertar al sistema inmune innato para iniciar una respuesta inmune específica (Soto M., *et. al.* 2000).

Otra de las proteínas ribosomales de *Leishmania* estudiada a nivel de su capacidad de generar respuesta celular es la proteína ribosomal ácida P2a de *L. infantum*. Esta proteína induce, *in vitro*, la proliferación de linfocitos T procedentes de ratones BALB/c inmunizados con dicha proteína. Además, es capaz de estimular una fuerte respuesta humoral en estos ratones cuando se administra en ausencia de adyuvante, lo cual indica su potente papel inmunógeno. La estimulación de los linfocitos T es específica del antígeno, ya que la administración de anticuerpos anti-LiP2a inhibe la capacidad proliferativa. Cuando se analiza el patrón de citoquinas que esta proteína conservada es capaz de producir, se observa que induce la producción de IFN- γ (Soto M., *et. al.* 2000).

Por último, la proteína ribosomal LmS3 de *L. major* es un componente de la subunidad pequeña 40S del ribosoma y presenta una secuencia homologa a la proteína ribosomal S3a de eucariotas (Zemzoumi K., *et. al.* 1999). Se expresa en otras especies de *Leishmania* tales como *L. infantum*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* e interviene en numerosos procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación y también en la apoptosis. Esta proteína juega un importante papel en la regulación de las células T y B, inhibiendo la proliferación de las células T tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando se inocula la proteína LmS3 a ratones se produce un aumento en el número de células B que secretan inmunoglobulinas, principalmente del isotipo IgM (Cordeiro da Silva A., *et. al.* 2001).

1.12. Otras proteínas de interés: Las Helicasas.-

Un gran número de procesos genéticos necesitan el desenrollamiento de cadenas doble o de cadenas simples que forma estructuras en horquilla de ADN/ADN, ADN/ARN o ARN/ARN para dar lugar a cadenas simples de polinucleótidos. Estos procesos complejos necesitan de la intervención de diferentes tipos de proteínas, incluyendo las helicasas. A pesar de presentar diferentes funciones biológicas y encontrarse en organismos muy diversos, desde procariotas hasta eucariotas, presentan secuencias conservadas evolutivamente, por lo que se piensa que todos los genes que codifican para las helicasas proceden de un ancestro común.

Gorbalenya y Koonin en 1993, propusieron por primera vez una clasificación de las proteínas helicasas estableciendo cinco grandes grupos según el número de motivos que poseían y según las diferencias en la secuencia consenso de cada motivo.

Los dos grupos con mayor número de helicasas englobadas lo forman las superfamilias 1 y 2 (SF1 y SF2). Estas helicasas se caracterizan por presentar 7 u 8 motivos diferentes que llevan a cabo distintas funciones. Son ADN y ARN helicasas, ya que desenrollan hebras de ADN y de ARN, tanto en dirección 3' a 5' como de 5' a 3'.

A la SF1 pertenecen las proteínas PcrA de *Bacillus stearothermophilis* (Subramanya H. S., *et. al.* 1996), la Rep de *E. coli* (Korolev S., *et. al.* 1997) y la DNA helicasa del virus herpes simples tipo 1 (HSV-1) (Graves-Woodward K. L., *et. al.* 1996).

Las helicasas de la SF2 se pueden englobar en tres familias de proteínas DExx-box, la DEAD-box RNA helicasa y la DExH-box RNA/DNA helicasa (Tanner N. K., *et. al.* 2001). La RNA helicasa A de humano (Lee C.G., *et. al.* 1993), la RNA helicasa A de ratón (Lee C.G., *et. al.* 1998), la NDH II bovina (Zhang S., *et. al.* 1995), la proteína MLE de *D. melanogaster* (Kuroda M.I., *et. al.* 1991), la RNA helicasa del virus Vaccinia (NPH-II) (Gross C.H., *et. al.* 1995), la helicasa del virus de la Hepatitis C (HCV NS3) (Yao N., *et. al.* 1997), UvrB (Theis K., *et. al.* 1999) y las proteínas PRP (Prp2p, Prp22p, Prp16p y Prp43p) de *S. cerevisiae* pertenecen a la familia DExH-box. Las helicasas pertenecientes a la familia DEAD-box RNA helicasa mejor caracterizadas son el eIF-4A (Pause A., *et. al.* 1993), la proteína p68 de humano (Hirling H., *et. al.* 1989), la An3 de *Xenopus* (Gururajan R., *et. al.* 1994), la proteína vasa de *D. melanogaster* (Liang L., *et. al.* 1994) y las proteínas PRP de *S. cerevisiae* (Prp5p, Prp28, Sup2p) involucradas en el procesamiento de pre-ARNm (*pre-mRNA splicing*) en levaduras.

La tercera superfamilia SF3 lo forman ADN y ARN helicasa de virus que se caracterizan por presentar sólo 3 de los 7 dominios descritos.

La cuarta superfamilia SF4 está constituida por ADN helicasas que desenrollan el ADN en dirección 5' a 3' y es una reacción dependiente de ATP. Presentan sólo 5 dominios (I, Ia, II-IV) y generalmente forman estructuras hexaméricas. La DnaB de *E. coli* forma parte de esta SF y participa en la replicación del ADN. La RepA es otra helicasa que pertenece a esta SF (Niedenzu T., *et. al.* 2001).

Un último grupo adicional lo forma el factor de terminación de la transcripción Rho de *E. coli*.

Todas las helicasas, de cualquiera de las superfamilias, se unen al ATP, por lo que todas poseen el motivo I (unión a fosfato P-loop) y el motivo II (unión a ácido aspártico) que son los dominios con actividad ATPasa (Subramanya H. S., *et. al.* 1996). En la figura 1.13 se esquematiza los dominios presentes en cada superfamilia.

		MOTIVOS						
SF	Familias	I	Ia	II	III	IV	V	VI
1		GxxGxGKT	FxxKAA ó PNKILA	DE(Y/F/A)QD	DxDQSIYxWR	RxNxxxxR	HxxK	VGITRAxx
2	DExx	GxxGxGKT	YxxPxxxL	DExx	(S/T)AT	FxxG/T	GLNLxxxxxV	QxxGRAGR
	DExH		TQPPRxxA	DExH			TNxAExSxTxG	QRxGRAGR
	DEAD		TRxLxxxQ	DEAD			RGxx	HxxGRxxR
3		GxPGxGKT/S		DDxx			IVxTTNAxG	
4		xxxxxGKT/S	VxxxxAED	Dxx	FxxH/Q	QQQxxRGxxLxxxxR		
5								

Figura 1.13: dominios presentes en cada superfamilia.

El dominio I corresponde a la secuencia consenso GxxGxGKT y es el dominio de unión a ATP (Walker J.E., *et. al.* 1982; Rozen 1989), aunque para realizar su función sólo son requeridos los 3 aminoácidos finales GK(T/S). La lisina (K) interacciona con el fosfato del MgATP/MgADP y el hidroxilo de la treonina o serina (T o S) se liga al ión Mg^{2+} .

El motivo II es el dominio de hidrólisis del ATP. En un principio fue definido como un único residuo de ácido aspártico (D) (Walker J.E., *et. al.* 1982), y actualmente la secuencia consenso definida es DE(Y/F/A)QD para las helicasas de la SF1 (Soulтанas P., *et. al.* 1999) y como DEx(D/H) para las helicasas de la SF2. El carboxilo del ácido aspártico coordina la interacción del ión Mg^{2+} del MgATP al MgADP; mientras que el ácido glutámico (E) actúa como base catalizadora en la hidrólisis del ATP, ya que la

helicasa utiliza la energía que se genera por esta hidrólisis para romper el enlace de hidrógeno entre las bases complementarias de la doble hélice. Se ha comprobado que la histidina (H) del dominio II, de las DExH-box ARN helicasas, interacciona con la glutamina (Q) del dominio VI (Yao N., *et. al.* 1997; Kim J.L., *et. al.* 1998; Theis K., *et. al.* 1999). En las DEAD-box ARN helicasas, cristalográficamente no se ha visto esta interacción entre estos dos residuos, sin embargo existe una correlación entre las secuencias, es decir, si existe un residuo D en el motivo II existe una H en el motivo VI, y si aparece una H en el motivo II aparece una glutamina (Q) en el dominio VI.

Los dominios Ia y IV, descritos por Gorbalenya y Koonin, son los motivos de unión al ácido nucleico, cuyas secuencias son TQPRRxA o TRxLxxQ para el dominio Ia de las helicasas de la SF2, siendo para las helicasas de la SF1 la secuencia FxxKAA o PNKILA (Caruthers J.M., *et. al.* 2002). La secuencia del dominio IV para la SF2 es FxxG/T y para las helicasa de la SF1 el dominio IV es RxNxxxR (Gorbalenya A.E., *et. al.* 1993).

Los dominios III y V presentan las secuencias consensos, (S/T)AT para la SF2 y DxDQSIYxWR para las helicasas pertenecientes a la SF1. El dominio V corresponde a la secuencia RGxx y TNxAExSxTxxG, para las helicasas de la SF2, DEAD-box y DExH-box, respectivamente, y para la SF1 la secuencia es HxxK. Son los motivos menos conservados entre las diferentes helicasas descritas, no sólo por la secuencia de aminoácidos que presentan sino también por su tamaño. El dominio V está implicado en la unión a ácidos nucleicos de cadena simple y el dominio III coordina la unión al ARN y/o ADN y a la hidrólisis del ATP para llevar a cabo el desenrollamiento, por lo que está especialmente involucrado en la actividad helicasa (Pause y Sonenberg, 1992).

El dominio VI es otro motivo que diferencia a las SF 1 y 2, y es un dominio de unión a ATP. Para las helicasas de la SF1 la secuencia es VGITRxx, presentando un único residuo de arginina (R) en el motivo, el cual interacciona con el fosfato γ del ATP (Gorbalenya A.E., *et. al.* 1993; Soultanas P., *et. al.* 1999). Sin embargo, para las helicasas de la SF2 la secuencia consenso es HxxGRxxR para las helicasas DEAD-box y QRxGRAGR para las DExH-box. En esta superfamilia son varios los residuos de arginina que pueden formar puentes salinos con el grupo fosfato del ATP (Yao N., *et. al.* 1997; Kim J.L., *et. al.* 1998; Theis K., *et. al.* 1999; Caruthers J.M., *et. al.* 2000; Story R.M., *et. al.* 2001) y así llevarse a cabo la actividad ATPasa. Además, el primer residuo del dominio VI presente en las helicasas de la SF2 es, o bien una glutamina (Q)

la cual interacciona con la histidina del dominio II, o bien un residuo de histidina que forma un puente con el ácido aspártico del dominio II (Caruthers J.M., *et. al.* 2002).

Las proteínas DExD/H-box helicasas son componentes esenciales del metabolismo del ARN, ya sea en la transcripción, en el procesamiento del ARN, en la exportación del ARN, en la estabilidad y plegamiento del ARN, en la traducción y en la biosíntesis del ribosoma. Posiblemente actúa desenrollando el ARN, interrumpiendo interacciones ARN-proteína o actuando como chaperonas interviniendo en el plegamiento correcto del ARN.

Las DEAD-box RNA helicasas presentan 8 motivos conservados, el dominio octavo corresponde al motivo Ib, se localiza entre el dominio Ia y el II y la secuencia consenso sería ATPGRL (Linder P., *et. al.* 1989).

Las DExH-box RNA helicasas sólo poseen 7 motivos y el extremo carboxilo terminal presenta un tamaño mayor. Además, en el caso de la proteína MLE de *D. melanogaster* (Lee *et. al.*, 1997) y de la ARN helicasa A de humano en su extremo carboxilo terminal se observan regiones repetidas ricas en glicina, y en el extremo amino poseen dos dominios auxiliares de unión a ARN de cadena doble (Gibson y Thompson, 1994; Zhang y Grosse, 1997).

En ambos casos, todos estos motivos son necesarios para la unión e hidrólisis del ATP, para la unión al ARN y para llevar a cabo su actividad helicasa. Sin embargo, son pocas las proteínas que forman parte de esta superfamilia 2 donde ya se ha demostrado su actividad RNA helicasa dependiente de ATP, ya que la mayoría son descritas por presentar actividad helicasa en base a su secuencia (Tanner N.K., *et. al.* 2001).

In vivo, las helicasas generalmente funcionan en grandes complejos, como son los ribosomas o el spliceosoma, e interaccionan dentro del complejo con factores proteicos que modulan su actividad, por lo que en la mayoría de los casos, una proteína DExD/H helicasa purificada no presenta actividad bioquímica porque no está formando parte de su complejo y la especificidad de la helicasa por su sustrato, *in vitro*, es insuficiente para ver actividad. Además, los cofactores proteicos pueden interactuar con la helicasa actuando como promotores de diana de reconocimiento. Cuando una helicasa participa en múltiples procesos celulares, los cofactores proteicos reclutan a la helicasa para que actúe en el complejo adecuado. Los cofactores también pueden actuar modulando físicamente la actividad helicasa, bien mediante una vía de interacción directa proteína-proteína o bien por vía indirecta reclutando complejos proteicos al sustrato de la helicasa.

En Tripanosomátidos se han descrito helicasas pertenecientes a la superfamilia 2. Concretamente en *Trypanosoma brucei* se han descrito dos proteínas DEAD-box helicasas, la Hel61 que es una helicasa mitocondrial que participa en el proceso kRNA-editing o procesamiento post-transcripcional del ARN mitocondrial (Missel A., *et. al.* 1997), y la Hel64 cuya función se desconoce y con una localización citosólica lo que la caracteriza ya que, por homología de secuencia con la nuclear ARN helicasa p68 debería localizarse en el núcleo (Missel A., *et. al.* 1995; Missel A., *et. al.* 1998). En *Trypanosoma cruzi* se ha descrito una DEAH-box RNA helicasa que pertenece a la familia de proteínas involucradas en el splicing del ARNm con una actividad ATPasa dependiente de ARN, ya que posee los 7 dominios conservados característicos de la superfamilia 2 (Lorenzi H.A., *et. al.* 2000). Otra helicasa descrita en *T. cruzi* es una DEAD-box HelTc cuyo ARNm se encuentra sobreexpresado en tripanosomas metacíclicos, por lo que podría estar contribuyendo en la metaciclologénesis. Por comparación de secuencias homólogas ya descrita con esta helicasa, debe de ser una ARN helicasa aunque su función principal no se ha demostrado, sin embargo cuando se compara con las descritas en *T. brucei* (Missel A., *et. al.* 1995; Missel A., *et. al.* 1997), la homología entre las secuencias es mínima, por lo que deben ser helicasas pertenecientes a familias distintas y además realizar diferentes funciones (Díaz A.M., *et. al.* 2000). Hasta la actualidad no se han descrito proteínas helicasas del género *Leishmania*. De las helicasas descritas, se desconoce su actividad inmunogénica y su capacidad de desencadenar respuesta antigénica.

OBJETIVOS:

Los protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, son endémicos en 100 países, donde se dan unos 2 millones de nuevos casos anuales, existiendo una población de riesgo de unos 350 millones de personas. No hay en la actualidad ni quimioprofilaxis, ni vacunas comercializadas y los tratamientos existentes, son tóxicos y están generando numerosas resistencias por parte de los parásitos. Por ello, desde hace algún tiempo, en el área de Parasitología de la Universidad de La Laguna, se viene trabajando en aportar datos que permitan dar soluciones a estas importantes patologías.

Existen en nuestro laboratorio, diversas moléculas obtenidas de genotecas de expresión y genómicas que deben ser estudiadas, por ello los objetivos de la presente Tesis Doctoral se plantean de la siguiente manera:

1.- Estudiar la antigenicidad e inmunogenicidad de dos moléculas previamente descritas en nuestro laboratorio, concretamente las proteínas ribosomales L14 y L25 de *Leishmania braziliensis*.

2.- Aislar y describir, con el fin de aportar a nuestro laboratorio al menos una nueva molécula que pueda tener interés en la biología celular del protozoo parásito *Leishmania braziliensis*, e iniciar los estudios de inmunogenicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1. Productos químicos y material básico.-

En general se utilizan reactivos de las firmas Merck, Sigma, Roche, Pharmacia, Promega, Stratagene, Bio-Rad, Qiagen, Invitrogen y Millipore, principalmente.

2.2. Tampones.-

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.14 M, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 0.01 M, KH₂PO₄ 1.76 mM pH 7.4
- Solución de suspensión de fago: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM.
- Tampón TAE 50X: Tris-HCl 2 M pH 7.2, 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8, ácido acético glacial 57.1 ml, bromuro de etidio 10 mg/ml y H₂O destilada hasta 1000 ml.
- Tampón de carga para electroforesis de ADN 6X: Azul de bromofenol (BPB) 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v).
- Tampón TBE 10X: Tris base 1 M, ácido bórico 0.83 M, EDTA 10 mM.
- Tampón SSC 20X: NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M pH 7.2
- Tampón de electroforesis de proteínas 10X: Tris-base 30.25g/l, glicina 144g/l, SDS 10 g/l.
- Tampón Laemmli: Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, β-mercaptoetanol 1% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0.002% (p/v), glicerol 10% (Laemmli U.K. 1975).
- Tampón de transferencia de proteínas 1X: Tris-base 25 mM, glicina 14.4 mM, SDS 0.1%, metanol 200 ml.
- Solución de bloqueo: leche en polvo desnatada 5% (p/v) en PBS 1X.
- Tampón de equilibrado de la fosfatasa alcalina: Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM.
- Tampón carbonato: NaHCO₃/Na₂CO₃ 10 mM pH 9.6
- Solución de lavado: Tween-20 (Sigma) 0.05% (v/v) en PBS 1X.
- Tampón citrato: ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 66 mM pH 5.15.
- Solución de revelado: OPD (*o*-fenildiamina) (Sigma) disuelto en tampón citrato en presencia de H₂O₂.
- Solución colorante para proteínas: azul de Coomassie R-250 al 0.2% (p/v) en Metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v).
- Solución decolorante para proteínas: metanol 40%, ácido acético glacial 10%.

- Tampón de lisis de eritrocitos (ACK): NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0.05 mM pH 7.4.

- Fijador PLP: *p*-formaldehído 0.5%, NaIO_4 10 mM, Lisina-HCl 75 mM, fosfato sódico 37 mM, pH 7.4.

- Fenol equilibrado con Tris-HCl pH 8.

- Mezcla clorofórmica: cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1.

2.3. Cepas de *Leishmania*.-

2.3.1. Cepa de *Leishmania braziliensis*.-

- Cepa MOHM/95/LQ8 (zymodema MON-231). Estos parásitos se aislaron a partir de lesiones que presentaban pacientes con leishmaniasis clínicamente diagnosticados y fueron cedidos la Dra. Rosa Luz Pacheco del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de San Antonio Abad, Cusco, Perú, y se caracterizaron en el laboratorio CHU de Montpellier, Francia.

2.3.2. Cepa de *Leishmania amazonensis*.-

- Cepa MHOM/BR/77/LTB0016 caracterizada a través de diferentes técnicas moleculares: análisis del perfil de restricción de DNA del kinetoplasto (Gonçalves *et al.*, 1984), electroforesis de isoenzimas (Momen, 1984) y radioinmunoensayo (RIA) utilizando anticuerpos monoclonales específicos (McMahon-Pratt *et al.*, 1984). Esta cepa fue cedida por la Dra. Rosane Temporal, Laboratorio de Bioquímica de Tripanosomatidos, Departamento de Inmunología, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

2.4. Cepas bacterianas.-

- *Escherichia coli*, cepa XL2-Blue MRF (Stratagene) genotipo: *mcr* A- 183, (*mcr* CB-, *mrr*-, *hsd* SMR-) 173, *end* AI, *sup* E44, *thi*-1, *rec* A1, *gyr* A96, *rel* A1, *lac* (F' *pro* AB, *lacIq* ZAM15, Tn 10, *Amyr*, *Camr*). Empleada para el mantenimiento de los plásmidos de clonaje.

- *Escherichia coli*, cepa Topp 3 (Stratagene) genotipo: Rif^r [F' *pro* AB *lacI*^qZAM15 Tn 10(Tet^r) (Kan^r)]. Empleada para la expresión de la proteínas recombinantes.

• *Escherichia coli*, cepa TOP10F' (Invitrogen) genotipo: F' {*lacI^q*, Tn10(Tet^R)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.

• *Escherichia coli*, cepa BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) genotipo: F' *ompT* *hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal* *dcm* (DE3) pLysS (Cam^R).

2.5. Medios de cultivo.-

2.5.1. Medio de cultivo de *Leishmania*.-

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las formas promastigotes de *Leishmania* fue el medio RPMI:

• Medio RPMI 1640:

RPMI 1640	8.32 g.
Hepes	4.75 g.
NaHCO ₃	1.60 g.
Solución de aminoácidos orgánicos ₍₁₎	100.00 ml.
Solución de vitaminas con fólico ₍₂₎	0.20 ml.
SBFI	200.00 ml.
Agua destilada c.s.p.	1000.00 ml.

(1) Solución de aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares (10X):

Arginina	4.4 g.	Glucosa	7.00 g.
Cisteína	0.8 g.	Fructosa	4.00 g.
Prolina	69.0 g.	Malato	6.70 g.
Glutamato	2.5 g.	α-ketoglutarato	3.70 g.
Glutamina	16.4 g.	Fumarato	0.55 g.
L-ornitina	1.0 g.	Succinato	0.60 g.
Agua bidestilada c.s.p. 1000.00 ml.			

(2) Solución de vitaminas (1000X):

Pantotenato cálcico	10 mg	Cloruro de colina	10 mg
Ácido fólico	10 mg	I-Inositol	20 mg
Riboflavina	1 mg	Nicotinamida	10 mg
Clorhidrato de piridoxal	10 mg	Clorhidrato de tiamina	10 mg
Agua destilada c.p.s.	100 ml.		

El pH del medio es ajustado a 7.2 con NaOH al 10% y al 5%, antes de añadirle el SBFI al 20%. Se esteriliza por filtración empleando filtros VacuCap 90 de 0.2 μm (Gelman) y se almacena a 4°C. Antes de utilizarlo se le añade Gentamicina 80 $\mu\text{g/ml}$, para evitar contaminación bacteriana.

2.5.1.1. Condiciones para el cultivo de *Leishmania*.

El cultivo de las formas promastigotes de *Leishmania braziliensis* se realiza a partir de 25×10^6 parásitos/ml en medio RPMI enriquecido con aminoácidos y vitaminas y suplementado con suero bovino fetal inactivado al 20% (v/v), con agitación suave a 22°C. El cultivo se mantiene en frascos estériles de cultivos celulares de 25 cm^2 (Nunc).

Con objeto de mantener los cultivos en fase logarítmica de crecimiento se realizan pases con medio fresco cada tres días.

Para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo se criopreservan a -80°C con glicerol al 15%.

Las formas promastigotes de *Leishmania amazonensis*, se obtienen a partir de amastigotes aislados de lesiones no ulceradas, para disminuir el riesgo de contaminación, de ratones BALB/c infectados y se mantienen en medio de cultivo Schneider (Sigma), suplementado con 10% de suero bovino fetal estéril inactivado (Gibco) y 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Los parásitos se mantienen en estufa a 26°C y los pases se realizan semanalmente.

Las formas amastigotes de *Leishmania amazonensis*, se obtienen a partir de lesiones no ulceradas de ratones BALB/c infectados con la forma promastigote infectivas. Los animales se sacrifican en cámara de éter y se lavan con alcohol etílico al 70% para descontaminar la piel. Las lesiones se retiran a través de una biopsia y se manipulan asépticamente. Los tejidos obtenidos se maceran en PBS con la ayuda de un homogenizador de vidrio estéril. El material resultante se transfiere a un tubo de vidrio estéril y se deja sedimentar los fragmentos de tejido durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante se somete a centrifugación a 600 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar las formas amastigotes de los restos de tejido del hospedador (sedimento). De nuevo se toma el sobrenadante y se somete a centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener las formas amastigotes en el sedimento.

2.5.2. Medios de cultivo de cepas bacterianas.-

- Medio LB (Luria-Bertani) líquido:

Triptona 1% (p/v), Extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v).

Este medio se emplea para el crecimiento las cepas de *Escherichia coli* XL2-Blue (Stratagene), Toop3 (Stratagene) y BL21(DE3)pLysS (Invitrogen). Para el cultivo en placas de estas cepas, se emplea medio LB-agar que se obtiene añadiendo agar al 2% al medio LB líquido.

- Medio para el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* KW 251:

Medio LB suplementado con maltosa al 0.2% (v/v) y MgSO₄ 10 mM.

Los suplementos permiten inducir la expresión de los receptores de adsorción del bacteriófago λ .

Una vez el bacteriófago λ ha infectado a la bacteria, el crecimiento se realiza en medio LB-*top* agarosa, que se obtiene añadiendo agarosa al 0.8% al medio LB líquido.

Los medios LB se esterilizan en autoclave. Los componentes sensibles al calor (maltosa, Ampicilina) se preparan en forma de disoluciones madre concentradas, se esterilizan por filtración empleando filtros de 0.22 μ m (Millipore) y se añaden al medio de cultivo previamente autoclavado y enfriado a 50°C.

2.5.2.1. Condiciones para el cultivo de *Escherichia coli*.-

Las diferentes cepas de *Escherichia coli* se cultivan en medio LB a 37°C durante 12-16 horas en agitación moderada, empleando matraces Erlenmeyer. Los cultivos se obtienen a partir de colonias aisladas de placas o bien de cultivos criopreservados en glicerol al 30%. La selección de clones resistentes al antibiótico, se realiza añadiendo Ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml para todas cepas de *E. coli* empleadas, y para la cepa BL21(DE3)pLysS se le añade además, cloranfenicol a una concentración final de 34 μ g/ml.

Para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo, éstas se conservan a -80°C en glicerol al 30% (v/v).

2.5.3. Medio DMEM de proliferación.-

El medio completo para linfocitos se compone de:

Medio DMEM (Gibco)

FCS 10%

L-Arginina 0.55 mM

L-Asparagina	0.24 mM
L- Glutamina	2.00 mM
Hepes	10.00 mM
Piruvato sódico	1.00 mM
β -mercaptoetanol	50.00 μ M

Se esteriliza por filtración empleando filtros VacuCap 90 de 0.2 μ m (Gelman) y se almacena a 4°C. Antes de utilizarlo se le añade Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100 μ g/ml y Gentamicina 50 μ g/ml para evitar contaminación bacteriana.

2.6. Aislamiento de ácidos nucleicos.-

2.6.1. Aislamiento de ADN plasmídico.-

Para obtener ADN plasmídico con un elevado grado de pureza se utiliza el *kit* comercial *QIAprep®Miniprep* (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El procedimiento sigue tres pasos: el primero consiste en separar el ADN plasmídico del ADN de la bacteria mediante una lisis alcalina, descrita originalmente por Birnboim y Doly (1979) y modificada posteriormente por Birnboim (1983). En el segundo paso se neutraliza el lisado bacteriano y se ajusta a unas condiciones de alta salinidad en las que el ADN plasmídico se adsorbe a una matriz de sílice. Por último, el ADN plasmídico fijado se lava y se eluye en agua bidestilada estéril o en Tris-HCL 10 mM pH 8.5.

- Como vector de mantenimiento se usan el pUC18 (Invitrogen) y el pGEM-T Easy (Promega).
- Como vectores de expresión se emplearon el pQE 32 (Qiagen) y el pCRT7/NT-TOPO (Invitrogen).

2.6.2. Aislamiento de ADN del bacteriófago λ .-

Para obtener un alto rendimiento en la extracción del ADN recombinante positivo del fago λ Gem12 (Promega) es necesario partir de un lisado de fagos a gran escala. Para ello hay que determinar la dilución del *stock* de fago a la que se produce la lisis total de la placa y a partir de ese punto preparar seis placas por fago recombinante positivo. Tras la lisis total se le añade a cada placa 4 ml. de solución de suspensión de fago. Las placas se incuban a 4°C con agitación suave durante toda la noche y a continuación, se recoge el sobrenadante que contiene los fagos eluidos. Para eliminar los restos celulares, se le añade al sobrenadante 500 μ l de cloroformo, se mezcla por

inversión y se centrifuga a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El lisado clarificado constituye el *stock* de fago a partir del cual se extrae el ADN.

EL aislamiento de ADN de fago se realiza empleando el *kit* comercial *Wizard® Lambda Prep. DNA Purification System* (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El método se basa en la eliminación de la cubierta del fago y la purificación del ADN mediante su unión a una resina, lavado y elución con agua bidestilada estéril.

2.7. Cuantificación de ácidos nucleicos.-

Para cuantificar la concentración de ácidos nucleicos en las diferentes muestras, se mide la absorbancia de las mismas a 260 nm, tomando como índice de extinción 50 ($\mu\text{g/ml}$)⁻¹cm⁻¹ para el ADN y 40 ($\mu\text{g/ml}$)⁻¹cm⁻¹ para el ARN.

2.8. Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas.-

2.8.1. Digestión del ADN con Endonucleasas de Restricción.-

Las digestiones del ADN del fago λ -L14 con enzimas de restricción, se lleva a cabo de acuerdo a las condiciones de tampón de reacción y temperatura especificadas por el fabricante. El volumen de reacción oscila entre 20 y 100 μl y el tiempo de incubación es de 12 horas.

Las enzimas de restricción empleadas son Hind II, Hind III, Sph I, BamH I, Sal I y EcoR I (Roche).

2.8.2. Tratamiento del ADN con fosfatasa alcalina.-

Se emplea para eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonaje, con el fin de evitar su religamiento. La desfosforilación se realiza durante 1 hora a 37°C, empleando fosfatasa alcalina del intestino de ternera (Roche) en una proporción de 1U de enzima por μg de ADN en el tampón de desfosforilación. El ADN previamente se linealiza y se purifica antes de ser desfosforilado.

El plásmido desfosforilado se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y de esta forma la fosfatasa se separa del ADN.

2.8.3.- Tratamiento del ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*.-

Esta enzima es una cadena polipeptídica simple obtenida por proteólisis de la ADN polimerasa I de *E. coli* que conserva intacta la actividad polimerasa 5'→3' y exonucleasa 3'→5', pero carece de la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa de *E. coli*.

En este caso, la enzima se utiliza para eliminar los residuos de adenina que incorpora la Taq polimerasa en el extremos 3' después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y así obtener fragmentos con extremos romos.

El fragmento Klenow que se emplea forma parte de un *kit* comercial *SureClone Ligation Kit*, por lo que se sigue las recomendaciones del fabricante.

2.8.4. Ligación de fragmentos de ADN.-

La ADN ligasa del fago T4 (Roche) cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-OH y 5'-P de ADN adyacentes. En las reacciones de ligación se emplea 1U de enzima en un volumen final de 20 µl y el tampón de reacción suministrado por la casa comercial. La concentración de vector que se utiliza es de 50 µg, mientras que la del inserto se ajusta a una proporción molar de 1:1, 1:3 y 3:1 (inserto:vector). La mezcla se incuba primero durante 2 horas a 16°C y luego toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de ligación se emplea para transformar células *E. coli* competentes.

2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).-

Las reacciones de amplificación por PCR se realizan en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600. Las condiciones de reacción se optimizan de acuerdo a lo descrito por Rychlik W., *et. al.* 1990.

El volumen final de la mezcla de reacción es de 50 µl y en ella se incluye 0.5 U de la enzima Taq ADN polimerasa del sistema *AmpliTaq® DNA polymerase* (Perkin-Elmer), 20 pmol de cada cebador, tampón de reacción 1x (Perkin-Elmer) y una concentración de 200 µM de cada nucleótido (Roche). La cantidad de ADN molde es de 20 ng, excepto para amplificar la región codificante completa de la Helicasa. En este caso se emplea, 100 ng de ADN. La mezcla de reacción se somete a una desnaturalización de 3 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a la temperatura de hibridación del cebador y 2 minutos a 72°C y se finaliza con

una elongación de 72°C durante 10 minutos. La temperatura de hibridación del cebador se calcula según la fórmula:

$$T_m (\text{°C}) = 4 \times (\text{G+C}) + 2 \times (\text{A+T})$$

2.10. Secuenciación de ADN.-

2.10.1. Reacción de secuenciación.-

La secuenciación del ADN se realiza utilizando los componentes del *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* (Amersham Pharmacia) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La termo-sequenasa es una ADN polimerasa termoestable, creada por ingeniería genética, específicamente para la secuenciación del ADN (Tabor S., *et. al.* 1995) y que mantiene la precisión de la T7 ADN polimerasa.

La cantidad de ADN plasmídico que se emplea es de 2 µg y 20 pmol de cebador. Las reacciones de secuenciación se llevan a cabo en un termociclador modelo GeneAmp 9600 de Perkin Elmer. Las condiciones de secuenciación son de 3 minutos a 95°C y 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento del cebador y 1 minuto a 72°C.

Los oligonucleótidos sintéticos que se utilizan en la reacción de secuenciación, están marcados en su extremo 5' con carbocianina:

pUC/M13 forward: 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

pUC/M13 Reverse: 5' GTCATAGCTGTTTCCTG 3'

pQE-Type III: 5' CGGATAACAATTCACACAG 3'

pQE-Reverse: 5' GTTCTGAGGTCATTACTGG 3'

T7 Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

pBRSET Reverse: 5' TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'

2.10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y urea.-

Los fragmentos de ADN generados en la reacción de secuenciación se separan en geles preparados *ReproGel™ High Resolution* (Amersham Pharmacia) de poliacrilamida y urea. El tampón de electroforesis es TBE 0.5X y las condiciones de la electroforesis son 1500 V, 60 mA, 30 W y 55°C. La electroforesis y el análisis posterior

de los resultados se realizan en un secuenciador automático AlfExpress DNA Sequencer de Amersham Pharmacia. El procesamiento de los resultados y el almacenaje de los datos se realizan empleando el *software* Alf Manager v. 3.1.

2.11. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.-

La separación de los fragmentos de ADN de doble cadena se realiza en geles de agarosa, con un porcentaje de agarosa entre 0.8% y 1.5%, según los casos, en tampón TAE 1x. Las electroforesis se llevan a cabo en cubetas submarinas de desarrollo horizontal (Bio-Rad) bajo una diferencia de potencial de 5 V/cm. Las muestras se preparan en tampón de carga de alta densidad descrito como de tipo II por Sambrook J., *et. al.* 1989.

Para la visualización del ADN se añade al gel de agarosa 0.2 µg/ml de bromuro de etidio y se le hace incidir luz ultravioleta de longitud de onda de 340 nm a través de una transiluminador (Ultra-Lum). La documentación fotográfica se obtiene mediante un sistema Gel Printer en papel térmico Mitsubishi P90.

Como marcadores de peso molecular se utilizan:

- ADN del fago λ digerido con *Hind* III (Roche). Los fragmentos obtenidos tienen un tamaño de: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 120 pb.

- Marcador de peso molecular X (Roche), derivado de un fragmento de 1018 pb y sus multímeros y fragmentos del plásmido pBR322. Los fragmentos presentan un tamaño de: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220/201, 154/134 y 75 pb.

- Marcador de peso molecular XIV (Roche), los tamaños que presentan son: 2642, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb.

2.12. Elución del ADN desde geles de agarosa.-

Para la purificación de fragmentos de ADN de tamaño específico obtenidos por PCR o para la separación y extracción de insertos de ADN de su vector de clonaje mediante digestión con enzimas de restricción, se separan las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente la agarosa se solubiliza por calor y el ADN se absorbe a una matriz de sílice y se eluye en tampón Tris-HCL 10 mM pH 8.5. En todos los casos se emplea el *kit* comercial *Quiaex II gel extraction* (Qiagen)

siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este *kit* permite extraer fragmentos de ADN de 0.04-50 Kb de tamaño.

2.13. Clonaje del extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25 en el vector de expresión pQE.-

A partir del clon pQE-L25 (Gonzalez A.C., *et al.* 2002), que contiene la secuencia completa que codifica para la proteína ribosomal L25, se obtiene mediante PCR el fragmento que codifica para el extremo amino de la proteína, empleando como cebadores el L25A-a 5' TTCACCATGGCTGCTGCTCC 3' y el L25A-b 5' GCGTCGTGGGCCGACAG 3'. El producto amplificado se purifica eluyéndolo desde el gel de agarosa al 1% (apartado 2.12) y se obtiene como un fragmento romo fosforilado y purificado mediante el empleo del *Kit* comercial *SureClone Ligation Kit* (Pharmacia Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Una vez se obtiene el inserto, se realiza el clonaje en el sitio *Sma* I del vector de expresión pQE32, que pertenece a la serie pQE (Qiagen). Este vector permite la sobreexpresión de la proteína clonada bajo el control del promotor *LacI*, de tal forma, que la proteína recombinante contiene una cola de seis histidinas en el extremo amino-terminal. Esta cola permite la purificación de la proteína utilizando una cromatografía de afinidad que consiste en una resina a la que se le une un ión metálico como Ni^{2+} o Co^{2+} que tiene afinidad por las histidinas. El vector pQE32, después de purificarlo, se digiere con la enzima de restricción *Sma* I y a continuación, se desfosforila empleando la fosfatasa alcalina.

Cuando se obtienen el inserto y el vector, se realiza la ligación y posteriormente, la mezcla de ligación es transformada en la cepa competente de *E. coli* Topp3. Para seleccionar el clon en el que el plásmido porta el inserto en la posición correcta se realiza una PCR colonia (apartado 2.16.3). Una vez aislado, la secuencia se confirma mediante secuenciación empleando los cebadores del pQE, pQE-TypeIII y pQE-Reverse (apartado 2.10.1) El clon que contiene el inserto, en la orientación adecuada y en pauta, se denomina clon pQE-L25a de *L. braziliensis*.

2.14. Clonaje del extremo carboxilo terminal de la proteína ribosomal L25 en el vector de expresión pCRT7/NT-TOPO.-

El fragmento que codifica para el extremo carboxilo terminal de la proteína ribosomal L25 se obtiene mediante PCR empleando como ADN molde el clon pQE-

L25 (Gonzalez A.C., *et al.* 2002) y como cebadores el L25C-a 5' AGTGTGATCCGCTACCCA 3' y el L25C-b 5' CTAGATCTTGTTGGCGGTG 3'. El producto amplificado con los residuos de adenina en sus extremos 3' se purifica desde el gel de agarosa al 1% y se clona en el vector de expresión pCRT7/NT-TOPO que se caracteriza por presentar residuos de deoxitimidina en los extremos 3'. La reacción de ligación se lleva a cabo empleando la enzima Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* siguiendo las recomendaciones del *Kit* comercial *pCRT7 TOPO TA cloning Kit* (Invitrogen). Este vector permite la sobreexpresión de la proteína clonada bajo el control del promotor del fago T7, de tal forma que la adición de IPTG induce la expresión de la T7 ARN polimerasa que se une al promotor y transcribe el gen de interés. La proteína recombinante obtenida contiene una cola de seis histidinas en el extremo amino-terminal que permite la purificación de la proteína utilizando una cromatografía de afinidad como en el caso anterior.

Transcurrida la ligación, la mezcla es transformada en la cepa competente de *E. coli* TOP10F'. Los clones positivos, que portan el inserto en la orientación adecuada, son seleccionados mediante PCR colonia (apartado 2.16.3) empleando los cebadores del plásmido (apartado 2.10.1). A continuación, se extrae el ADN plasmídico de los clones positivos y se secuencian para confirmar la pauta y la orientación. El plásmido positivo se transforma en células *E. coli* competentes BL21(DE3)pLysS para la expresión. El clon que contiene el inserto, en la orientación adecuada y en pauta, se denomina clon pCR-L25c de *L. braziliensis*.

2.15. Clonaje de la proteína DEVH-box helicasa en el vector de expresión pQE.-

Como paso previo al clonaje del gen que codifica para la proteína DEVH-box helicasa en un vector de expresión, se procede a clonar la región codificante del mismo en el plásmido pGEM-T (Promega), diseñado para clonar productos de PCR, mediante la unión de los residuos de adenina, añadidos por la Taq ADN polimerasa durante la PCR, con los residuos de timidina insertados en el plásmido. El fragmento codificante se obtiene mediante PCR utilizando como molde el fago genómico L14, que contiene la unidad génica que codifica la helicasa de *L. braziliensis*, y como cebadores Hel-a 5' GCTATGGCTTTTAACCTGGAC 3' y Hel-b 5' CTTCTGCGCCGTCGTTTCG 3'. El amplificado se clona en el vector pGEM-T y al plásmido recombinante se le denomina pGEM-HLb.

Seguidamente, a partir del plásmido pGEM-HLb, y mediante PCR empleando la misma pareja de cebadores, se clona la región que codifica para la helicasa en el sitio Sma I del vector de expresión pQE32. El vector pQE se prepara siguiendo los mismos pasos que se emplean para el clonaje del extremo amino de la proteína ribosomal L25. La selección de los posibles clones positivos se realiza mediante PCR colonia (apartado 2.16.3). Una vez aislados, la secuencia se confirma mediante secuenciación empleando los cebadores del pQE, (apartado 2.10.1). El plásmido recombinante se denomina pQE-HLb.

2.16. Transformación de ADN en *E. coli*.-

2.16.1. Preparación de células *E. coli* competentes.-

Las cepas de *E. coli* que se utilizan en este trabajo para la transformación con ADN plasmídico son XL2-Blue, Topp3, TOP10F' y BL21(DE3)pLysS. Para la preparación de las células competentes se inocula una colonia bacteriana en 5 ml de medio de cultivo LB líquido y, tras 12 horas de incubación a 37°C, este cultivo se utiliza para inocular 100 ml de medio LB líquido precalentado a 37°C, el cual es incubado a la misma temperatura, con agitación vigorosa, hasta que alcanza una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. A continuación, el cultivo se mantiene en agua/hielo durante 5 minutos y seguidamente las células se recogen por centrifugación a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C. Las células se resuspenden en 20 ml de MgCl₂ 100 mM, previamente enfriado en hielo, y se incuban en agua/hielo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se recogen nuevamente por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C y se resuspenden en 2 ml de CaCl₂ 100 mM y se incuban 1 hora en agua/hielo. Finalmente, a la suspensión de células competentes se le añade glicerol estéril a una concentración final del 20% (v/v), se fraccionan en alícuotas y se guarda a -80°C un mínimo de 24 horas y un máximo de 6 meses, antes de ser utilizadas.

2.16.2. Transformación de células bacterianas competentes.-

El proceso de transformación de células *E. coli* competentes se realiza mediante choque térmico. En primer lugar, 100 µl de las células competentes, una vez extraídas de -80°C se mantienen en hielo durante 5-10 minutos, se mezclan con ADN plasmídico circular a una concentración entre 1-50 ng o con toda la mezcla de ligación y se mantiene en hielo durante 30 minutos. A continuación, la mezcla se somete a un choque

térmico que consiste en calentarla a 42°C durante 2 minutos y enfriarla rápidamente en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se añade a la mezcla 300 µl de medio LB líquido y se incuba durante, al menos, 1 hora a 37°C en agitación, para permitir que las bacterias se recuperen. Por último, se siembran diferentes cantidades de bacterias (100 µl y 200 µl) en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con ampicilina y se incuban durante 12 a 16 horas a 37°C.

2.16.3. Selección de colonias recombinantes de *E. coli*.

Todos los plásmidos que se utilizan en este trabajo portan el gen de resistencia a la ampicilina, por lo que la selección de los transformantes se basa en el hecho de que sólo las bacterias que contienen en su interior el plásmido pueden crecer en medio LB con ampicilina.

Para chequear los clones que contienen el plásmido recombinante, se inoculan colonias aisladas en medio LB líquido con ampicilina y se dejan crecer durante 6-8 horas. Transcurrido este tiempo, se realiza una PCR colonia (Comes A.N. *et. al.* 1997) que consiste en tomar 100 µl del cultivo crecido y calentarlo a 95°C durante 10 minutos, a continuación, se centrifuga a 10000 x g durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante en un tubo limpio. Finalmente se realiza una reacción de PCR empleando como ADN molde 2 µl del sobrenadante recogido y como cebadores los que porta el plásmido, en este caso, como los plásmidos utilizados son el pQE y el pCRT7/NT-TOPO los cebadores son el pQE-Type III - pQE-Reverse y el T7 Forward - pBRSET Reverse, respectivamente.

2.17. Purificación en condiciones nativas de las proteínas ribosomales recombinantes L14 (PRL14r), L25 (PRL25r), de sus extremos amino (PRL25a-r) y carboxilo (PRL25c-r) y de la DEVH-box helicasa de *L. braziliensis*.

2.17.1. Inducción en *E. coli* de la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r, PRL25c-r y de la DEVH-box helicasa y la solubilización de las mismas.

Para la inducción de la PRL14r, PRL25r y PRL25a-r en un sistema bacteriano, se utiliza la cepa Topp3 de *E. coli*, transformada con los plásmido pQE-L14, pQE-L25 y pQE-L25a. Una vez que el cultivo alcanza una DO₆₀₀ de 0.6-0.8, se realiza la inducción durante 2 horas a 37°C con IPTG 0.1 mM y 0.5 mM (Roche), en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina (Roche). Transcurrida la inducción, la masa bacteriana se recoge

por centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos. El sedimento bacteriano se solubiliza empleando el protocolo descrito por Marañón C., *et. al.* 2000, con algunas modificaciones. El sedimento se resuspende en tampón fosfato 9 mM, pH 8, NaCl 50 mM y lisozima a 1mg/ml y se agita durante 1 hora a 4°C. La suspensión se sonica durante 8 minutos y se centrifuga a 13000 x g durante 30 minutos a 4°C. En la fase insoluble permanecen las proteínas en forma de cuerpos de inclusión. Esta fracción insoluble se vuelve a resuspender en tampón fosfato 9 mM pH 8, NaCl 50 mM y SDS 0.025% y se mantiene en agitación, en las mismas condiciones anteriores. Después de sonicar, la fase soluble e insoluble se separan por centrifugación a 13000 x g durante 30 minutos a 4°C. La fracción que permanece precipitada se vuelve a resuspender en el mismo tampón empleando 0.05% de SDS. Después de la centrifugación, se confirma el resultado de la solubilización visualizando cada fracción en un gel SDS-PAGE al 15% tiñendo con azul de Coomassie. A continuación se realiza la purificación de las proteínas recombinantes solubilizadas mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺.

Para el caso de la PRL25c-r, el sistema bacteriano que se emplea para su inducción es la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. Todos los pasos necesarios para su inducción y solubilización son idénticos a los anteriores, con la excepción del empleo de cloranfenicol a 34 µg/ml junto con la ampicilina a 100 µg/ml como antibióticos.

Para el caso de la proteína recombinante DEVH-box helicasa, la cepa bacteriana que se utiliza y las condiciones de inducción son iguales a las empleadas para la PRL14r, PRL25r y PRL25a-r, pero la solubilización se consigue de la siguiente manera: se realiza una primera solubilización empleando tampón fosfato 9 mM pH 8, NaCl 50 mM y SDS 0.025%. La fracción insoluble donde se encuentra la proteína recombinante, se vuelve a resuspender en el mismo tampón usando SDS 0.05%. En esta segunda solubilización, parte de la proteína aparece en la fracción soluble, pero la solubilización completa se consigue resuspendiendo el segundo precipitado en el mismo tampón con la misma cantidad de SDS.

2.17.2. Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺.

Para conseguir la unión de las proteínas recombinantes a la resina, el extracto soluble se lleva a concentraciones finales de NaCl 300 mM, tampón fosfato 50 mM y PMSF 1 mM para permitir el enlace de coordinación entre la cola de histidinas y la resina Ni-NTA, sobre todo teniendo en cuenta que la unión His-Ni²⁺ tiene que ocurrir en presencia de detergente. La resina Ni-NTA agarosa (Qiagen), una vez equilibra con

tampón fosfato 50 mM, NaCl 300 mM y SDS 0.05% durante 1 hora, se une en frío a la proteína durante 4 horas en agitación. A continuación, la resina se empaqueta en una columna y el eluido se pasa varias veces por la misma. Seguidamente, la resina se lava con 10 ml del tampón anterior aumentando la concentración de imidazol en cada lavado (0, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 150 mM de imidazol). El contenido proteico de cada fracción se visualiza mediante SDS-PAGE. La ausencia de contaminantes LPS, en la proteína recombinante purificada, se comprueba mediante el ensayo semicuantitativo del E-toxate (Sigma).

2.18. Cuantificación de proteínas.-

Para determinar la concentración de las proteínas se utiliza el método Bradford M.M. 1976, empleando el reactivo “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad). En cada determinación se realiza una curva patrón de concentración tomando la albúmina como proteína de referencia.

2.19. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE.-

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida se emplea el sistema Mini-Protean II Cell (Bio-Rad). El rango de concentración de los geles varía en función del tamaño de la proteína que se desea discriminar, por ello, se usan geles de un rango de concentraciones de 10-15%, y para su realización se utiliza el protocolo descrito por Sambrook J., *et. al.* 1989. A las muestras se les añade tampón Laemmli, se hierven durante 10 minutos y se centrifugan durante 1 minuto a 13000 x g, antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se desarrolla en tampón de electroforesis de proteínas SDS-PAGE 1X a amperaje constante, de 12/20 mA. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se visualizan sumergiendo primero el gel en solución colorante para proteínas, según el método descrito por Fairbannks G., *et. al.* 1971, y, a continuación, se destiñe lavándolo con una solución de metanol al 40% (v/v) y ácido acético glacial al 10% (v/v). Una vez desteñido, el gel se seca a vacío entre papel celofán.

Como marcador de peso molecular se emplea el “Prestained SDS-PAGE estandar, broad range” (Bio-Rad): 195’6, 107’1, 58’7, 41’2, 27’5, 20’4, 15’1 y 6’4 Kda.

2.20. Diálisis.-

Los extractos proteicos purificados se someten a diálisis para eliminar el SDS y el imidazol empleados en la solubilización y purificación, respectivamente. Para ello,

las muestras se introducen en bolsas de membrana de diálisis tubular de 16 mm de diámetro (Sigma), con un límite de exclusión de 12 KDa y se sumergen en tampón PBS 1X y PMSF 1 mM durante 4 horas en agitación a 4°C. A continuación, y manteniendo las mismas condiciones de incubación, se realiza un cambio de tampón empleando ahora PBS 0.5X. Finalmente, las bolsas se dejan en agitación toda la noche a 4°C en tampón PBS 0.1X. Transcurrida la diálisis, las proteínas se recogen y se cuantifican antes de liofilizarlas.

2.21. Liofilización.-

Las proteínas recombinantes purificadas y dializadas se concentran empleando un liofilizador. Las muestras concentradas se resuspenden en tampón PBS 1X y se mantienen a -20°C hasta su utilización.

2.22. Síntesis de péptidos.-

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína ribosomal L25, se diseñaron 3 péptidos solapantes que abarcaban la región amino terminal de la proteína:

23083 ⁴APKTAKKAAPKDVKATKVVKVT²⁵

23089 ¹⁹TKVVKVTRKSYTRPQFRRPHTYRRPAIAKPS⁵⁰

23085 ⁴³RPAIAKPSNRVTESKDITAF⁶³

La localización de los péptidos en la secuencia aminoacídica de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* se representa en la figura 2.1.

1	M	A	A	A	P	K	T	A	K	K	A	A	P	K	D	V
17	K	A	T	K	V	V	K	V	T	T	R	K	S	Y	T	R
33	P	Q	F	R	R	P	H	T	Y	R	R	P	A	I	A	K
49	P	S	N	R	V	T	X	E	S	K	D	I	T	A	F	S
65	V	I	R	Y	P	L	T	T	D	K	A	M	K	K	I	E
81	E	N	N	T	L	T	F	I	V	D	A	C	A	N	K	T
97	E	I	K	K	A	M	R	K	L	Y	Q	V	K	A	V	K
113	V	N	T	L	I	R	P	D	G	L	K	K	A	Y	I	R
129	L	S	A	A	H	D	A	L	D	T	A	N	K	I	G	L
145	V	#														

Figura 2.1: Secuencia de aminoácidos de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* donde se señala en rojo el péptido 23083, en azul el péptido 23085 y sombreado en amarillo el péptido 23089.

Todos los péptidos se sintetizaron en el laboratorio del Dr. M. E. Patarroyo, empleando la metodología de fase sólida con las variaciones del sistema de síntesis múltiple en fase sólida (Houghten R.A. 1985) y se purifican con éter etílico. La pureza se analiza mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna semipreparativa C18 en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo de 10-40%. Para verificar el proceso de síntesis se determinó el tiempo de retención de cada péptido mediante HPLC utilizando como control un péptido de secuencia conocida. La síntesis correcta de los péptidos fue verificada mediante secuenciación automática utilizando un secuenciador en fase líquida Beckman 890M.

2.23. Sueros.-

Los sueros empleados en el estudio de la antigenicidad de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r, mediante *Western blot* o ELISA, son:

- 10 sueros de pacientes con leishmaniasis mucocutánea (LMC) y 10 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (LC), ambas producidas por *L. braziliensis*, procedentes de Cusco, Perú. Todos estos sueros fueron cedidos por la Dra. Rosa Luz Pacheco, del Departamento de Microbiología de la Universidad San Antonio Abad de Cusco.
- 10 sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica procedentes de Brasil, cedidos por la Dra. Geny Aparecida; y otros 2 sueros de pacientes con Chagas crónico cedidos por el Dr. Manuel Carlos López, del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra.
- 10 sueros de personas sanas de S/C de Tenerife que nunca han viajado a zonas endémicas de la enfermedad.

Todos los pacientes con leishmaniasis presentaban lesiones activas y los cultivos de sus biopsias dieron positivos. Los sueros con Chagas crónico eran todos positivos por fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA. Los sueros fueron ensayados previamente por ELISA en nuestro laboratorio frente a proteínas totales de *L. braziliensis* a una dilución 1:400. Todos los sueros de las personas sanas de S/C de Tenerife resultaron negativos frente a proteínas totales y se utilizaron como controles negativos.

2.24. Transferencia de proteínas (*Western blot*).

La transferencia de proteínas desde geles de acrilamida a membrana se realiza por el método estándar descrito por Towbin H., *et. al.* 1979, utilizando el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad y la membrana de nitrocelulosa que se emplea es la Immobilon-P (Millipore). La electro-transferencia se lleva a cabo en tampón de transferencia 1X durante 2 horas a 150 mA o a 30 mA durante toda la noche, a 4°C. La eficiencia del proceso se comprueba sumergiendo la membrana en una solución que contiene Ponceau S al 0.5% (p/v) en ácido acético glacial al 1% (v/v).

2.25. Inmunodetección de proteínas fijadas a membranas.

Una vez transferida las proteínas a la membrana, ésta se bloquea durante 2 horas en solución de bloqueo y seguidamente, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, con sueros de pacientes con leishmaniasis y sanos a una dilución de 1/750 en solución de bloqueo. A continuación se realizan 5 lavados: 2 lavados de 5 minutos con PBS 1X, otros 2 lavados de 10 minutos con NP-40 (Sigma) 0.05% y Tween-20 (Sigma) 0.05% en PBS 1 X y un último lavado de 10 minutos con PBS 1X. Después de los lavados, se realiza la incubación a temperatura ambiente, con el anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulina G de humano o de ratón, según el caso, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma), a una dilución 1/2000 en solución de bloqueo durante 1 hora. Transcurrida la incubación y después de realizar, de nuevo, los 5 lavados, la membrana se equilibra sumergiéndola en tampón de equilibrado de la fosfatasa alcalina. Finalmente, la membrana se cubre con este tampón suplementado con el substrato cromogénico NBT/BCIP 1:50 (Roche) y se deja en la oscuridad para que la reacción colorimétrica se lleve a cabo. Una vez el color alcanza la intensidad deseada, la reacción se detiene con abundante agua bidestilada y la membrana se conserva seca entre papel Whatman 3MM.

2.26. Serodiagnóstico.

2.26.1. Con la PRL25r y PRL25a-r.

Para evaluar el reconocimiento antigénico de la PRL25r y PRL25a-r por los sueros relatados, se realiza el método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando placas *microtiter Immulon 4HBX (High Binding Extra)* de 96 pocillos, Dynex. Las placas son sensibilizadas con 5 µg/ml de proteína en tampón carbonato, en

un volumen de 100 µl por pocillo durante 1 hora a 37°C y seguidamente, se incuban toda la noche a 4°C. Las cantidades óptimas de proteínas se ajustaron experimentalmente con anterioridad. A continuación, y después de incubar las placas nuevamente a 37°C durante 1 hora, las proteínas no unidas se desechan y las placas se lavan 2 veces durante 5 minutos con solución de lavado a temperatura ambiente y en agitación. Después de los lavados, las placas se bloquean con solución de bloqueo durante 2 horas a 37°C y a continuación, se incuban con 100 µl de los sueros de los pacientes por pocillo, a una dilución 1:100 en solución de lavado y leche en polvo desnatada al 5% (p/v) durante 1 hora a 37°C. Tras desechar esta solución y lavar las placas 5 veces, éstas se incuban con un anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulina IgA + IgG + IgM (H+L) humano conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:2000 en la misma solución que los sueros anteriores, añadiendo 100 µl por pocillo. Después de incubar 1 hora a 37°C, se tira el anticuerpo y las placas se lavan 5 veces. Por último, se revela añadiendo 100 µl por pocillo de solución de revelado durante 30 minutos en oscuridad y la reacción se detiene con 50 µl por pocillo de H₂SO₄ 2N. La densidad óptica se determina a 492 nm en un lector de placas (Titertek Multiskan® PLUS).

2.26.2. Con los péptidos sintéticos.-

Los ensayos de ELISA con los péptidos se realiza de la misma forma que para las proteínas recombinantes, excepto la fijación a las placas, que se realiza disolviendo el péptido a una concentración de 20 µg/ml en tampón PBS, e incubando 100 µl por pocillo durante 1 hora a 37°C y a continuación, toda la noche a 4°C.

2.27. Inmunización de ratones BALB/c con la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r.-

En todas las inmunizaciones se utilizan ratones hembras de la cepa BALB/c (H-2 K^d, D^d, A^d, E^d) de entre 6-8 semanas de edad (Irwin M.J., *et. al.* 1989). Las proteínas se inoculan por vía subcutánea y en todos los casos, las inoculaciones se realizan el día 0, 21 y 63, y en ellas se utiliza por ratón 20 µg de proteína purificada y dializada frente a PBS en un volumen de 100 µl. Se establecen 10 grupos, cada uno de ellos constituido por 3 ratones y organizados de la siguiente manera:

Los grupos 1, 2 y 3 forman los ratones inmunizados con la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r, respectivamente, disueltas en solución salina.

Los grupos 4 y 5 lo constituyen los ratones que reciben la PRL14r disuelta en solución salina y emulsionada con IFA (1:1, v/v) respectivamente.

El grupo 6 lo forman los ratones que recibieron una primera dosis de la PRL14r sola y en las dos dosis siguientes recibieron dicha proteína unida covalentemente a la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi* en una proporción molar de 4:1 usando una solución de glutaraldehído al 0.2% (Marañón C., *et. al.* 2001).

Los grupos 7 y 8 son los controles, en este caso los ratones se inoculan con solución salina y con IFA disuelta en dicha solución, respectivamente.

2.28. Estudio de la respuesta humoral inducida en ratones de la cepa BALB/c por la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r.-

Para analizar la respuesta humoral inducida por estas proteínas en los ratones, se realizan sangrías del plexo retro-orbital de los animales, cada tres semanas después de la primera inoculación (semana 3, 6, 9 y 12). La sangre extraída se incuba en tubos a temperatura ambiente hasta permitir la formación del coagulo. El suero obtenido por la retracción del coagulo se extrae mediante centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos y se almacena a -20°C hasta su utilización en los ensayos inmunoenzimáticos.

2.28.1. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).-

Para determinar los títulos de anticuerpos en los ratones inmunizados, frente a la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r, se utiliza el método de ELISA descrito en el apartado 2.26.1. La cantidad de proteína fijada es de 5 µg/ml en tampón carbonato pH 9.6. Los sueros se cuantifican por duplicado a una dilución 1:100 y 1:200. El segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se incuba a una dilución 1:2000 para la IgG (Fab específica) (Sigma, St Louis, MO, USA), a 1:1000 para el isotipo de inmunoglobulina IgG_{2a} (Nordik) y a 1:8000 para la subclase específica IgG₁ (Nordik). Los sueros de los ratones preinmunes se usan como controles negativos. La densidad óptica se determina a 492 nm en un lector de placas (Titertek Multiskan® PLUS). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

2.29. Estudio de proliferación de células esplénicas inducida por la PRL14r, PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r en ratones BALB/c.-

Cuatro semanas después de la segunda inmunización se sacrifica un ratón por grupo, se extraen los bazos asépticamente y se homogenizan con PBS suplementado con FCS 1% (Life Technologies, Eggenstein, Germany). Después de centrifugar a 1300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en tampón ACK durante 3 minutos en hielo. La reacción de lisis de eritrocitos se detiene añadiendo tampón PBS suplementado con FCS 1% y se centrifuga a 1300 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan 3 veces en medio DMEM de proliferación y se resuspenden en dicho medio para su posterior recuento. Los esplenocitos viables se cuentan por exclusión con azul trypan en una cámara de Neubaver.

Los esplenocitos se distribuyen en placas de 96 pocillos con fondo liso a una concentración de 4×10^5 células/pocillo y por triplicado. A estas células, previamente se les agrega el estímulo, como el mitógeno Concanavalina A (Con A), a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St Louis, MO, USA), cada una de las proteínas recombinantes a concentraciones de 20, 4 y 0.2 $\mu\text{g/ml}$ o PBS como control. El volumen final por pocillo es de 200 μl y se ajusta con medio DMEM. Las placas se incuban a 37°C durante 3 días en una atmósfera de CO_2 . Transcurrido este tiempo, se adiciona 0.5 $\mu\text{Ci/pocillo}$ de timidina metil- ^3H y las células se vuelven a incubar otras 18 horas a 37°C. Finalmente, el ADN genómico se fija a membranas de fibra de vidrio usando un colector Inotech y la radiactividad incorporada se mide en un contador de centelleo microbeta Wallac 1450. El índice de estimulación se calcula como la media aritmética de las c.p.m. del cultivo estimulado - la media aritmética de las c.p.m. del cultivo control / la media aritmética de las c.p.m. del cultivo control.

2.30. Estudio de protección en ratones de la cepa BALB/c.-

Para los estudios de protección se establecen 3 grupos, con 4 ratones BALB/c por grupo. El grupo 1 lo forman los ratones inmunizados con la PRL25r disuelta en solución salina. El grupo 2 lo constituyen los ratones inmunizados con la PRL25a-r, también disuelta en solución salina. El grupo 3 lo forman los ratones control que reciben solución salina. Se realizan 3 inmunizaciones por vía subcutánea y espaciadas 15 días. En cada dosis se administra 20 μg de cada proteína en 100 μl de volumen final. Dos

semanas después de la tercera dosis, los ratones son infectados con promastigotes infectivos de *L. amazonensis*. Las formas promastigotes conteniendo un alto porcentaje de parásitos metacíclicos se lavan dos veces con PBS, se ajustan a una concentración de 10^5 parásitos/ml y se inoculan 50 μ l por vía subcutánea en la pata trasera derecha de los ratones utilizados. A partir de la cuarta semana, tras la infección, se mide semanalmente el tamaño de la lesión, empleando para ello un calibrador Vernier (Sigma).

2.31. Estudio de los niveles de IgG frente a la PRL25r y a su extremo amino en ratones BALB/c antes y después de la infección con *L. amazonensis*.

Para analizar la respuesta humoral inducida por estas proteínas en los ratones de la cepa BALB/c, se realizan sangrías del plexo retro-orbital de los animales, dos semanas antes de la infección y diez semanas después de la infección con promastigotes de *L. amazonensis*. La sangre extraída se incuba en tubos a temperatura ambiente hasta permitir la formación del coagulo. El suero obtenido por la retracción del coagulo se extrae mediante centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos y se almacena a -20°C hasta su utilización en los ensayos inmunoenzimáticos, cuya metodología es idéntica a la descrita en el apartado 2.28.1.

2.32. Inmunización de ratones BALB/c con la proteína DEVH-box helicasa.

En la inmunización se utilizan ratones hembras de la cepa BALB/c (H-2 K^d, D^d, A^d, E^d) de entre 6-8 semanas de edad (Irwin M.J., *et. al.* 1989). Se establecen 4 grupos de 6 ratones BALB/c por grupo a los que se les realizan tres inoculaciones por vía subcutánea los días 0, 14 y 28.

El grupo 1 está formado por los ratones que recibieron 20 μ g de la proteína DEVH-box helicasa disuelta en solución salina por dosis.

El grupo 2 lo constituyen los ratones inmunizados con 20 μ g de dicha proteína emulsionada con adyuvante. Se utilizó adyuvante completo de Freund en la primera inoculación y adyuvante incompleto de Freund en las restantes en la proporción 1:1 (v/v).

El grupo 3 y 4 esta formado por 3 ratones cada grupo y serían los grupos controles a los que se le administra solución salina y dicha solución emulsionada con adyuvante, respectivamente.

Antes de la primera inoculación se extrajo suero, como se explica en el apartado 2.28, para usarlo como control preinmune y posteriormente se realizaron sangrías cada 2

semanas, la última sangría se llevó a cabo 10 semanas después de la primera inmunización.

2.33. Estudio de la respuesta humoral inducida en ratones de la cepa BALB/c por la proteína DEVH-box helicasa.-

Para analizar la respuesta humoral inducida por esta proteína en los ratones, se realizan sangrías del plexo retro-orbital de los animales, cada dos semanas después de la primera inoculación (semana 2, 4, 6 y 10) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.28.

2.33.1. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).-

Para determinar los títulos de anticuerpos en los ratones inmunizados, frente a la proteína DEVH-box helicasa recombinante, se utiliza el método de ELISA descrito en el apartado 2.26.1 y 2.28.1.

2.34. Inmunolocalización de la proteína DEVH-box helicasa en la forma promastigote de *L. braziliensis*.-

Para detectar la presencia de la proteína DEVH-box helicasa en el parásito, se parte de 10^6 promastigotes/ml de *L. braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento y se lavan dos veces con PBS 1x. A continuación se dejan secar al aire sobre portaobjetos (76mm x 26mm) 30 μ l de esta suspensión. Seguidamente se fijan mediante su incubación con el fijador PLP durante 10 minutos y se realiza un lavado con PBS 1x durante 5 minutos. Para permeabilizar los parásitos, se sumergen los portas en una solución de Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 minutos y se lavan con PBS. El primer anticuerpo (anti-Hel, generado en ratones BALB/c) se utiliza a la dilución 1/20 y 1/100 en PBS 1x y se incuba en una cámara húmeda a 37°C durante 1 hora. Después de una serie de 4 lavados de 5 minutos con PBS 1X, se añade el segundo anticuerpo, un anti-mouse IgG conjugado con fluoresceína (Sigma), a la dilución 1/50 propuesta por el fabricante para este tipo de ensayos, y se incuba durante 1 hora a 37°C. Trascurrido este tiempo se realizan 5 lavados con PBS y finalmente, las preparaciones se observan en el microscopio de fluorescencia Dialux 20 EB (Leitz).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

3.1. PROTEÍNA RIBOSOMAL L14 RECOMBINANTE (PRL14r).-

3.1.1 Expresión y solubilización en condiciones nativas de la PRL14r de *L. braziliensis*.-

La secuencia de aminoácidos de la proteína ribosomal L14 de *L. braziliensis* fue descrita en la tesis doctoral de la Dra. Violeta Alonso (número de acceso AF233642). La proteína recombinante se obtuvo por el clonaje de la región codificante en el vector de expresión pQE32 (Qiagen), obteniéndose el clon pQE-L14 (González *et. al.*, en prensa). Dicho clon fue transformado en la cepa M15 de *E. coli*, para su inducción. Los ensayos de inducción consistieron en añadir al medio LB, 0.1 mM y 0.5 mM de IPTG, durante 2 horas, y como se puede comprobar en la figura 3.1.1, empleando estas condiciones se obtiene la sobreexpresión de una proteína de 22 KDa, tamaño que coincide con el esperado, tanto con 0.1 mM como con 0.5 mM de IPTG. Por lo tanto las condiciones óptimas de expresión se consiguen utilizando 0.1 mM de IPTG durante 2 horas, debido a que grandes concentraciones de este inductor provoca un aumento en la formación de cuerpos de inclusión.

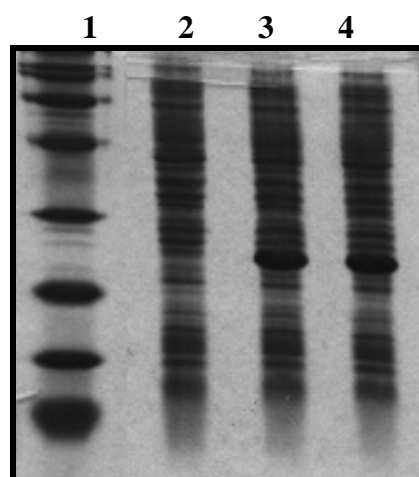


Figura 3.1.1: Ensayo de inducción de la PRL14r de *L. braziliensis* en *E. coli*.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-L14 crecidas durante 2h sin inducir.

Columnas 3-4: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-L14 inducidas durante 2h con 0.1 mM y 0,5 mM de IPTG, respectivamente.

Es conocida la dificultad que puede presentar la solubilización de proteínas recombinantes obtenidas en este tipo de células, por ello se realizaron diferentes ensayos de solubilización. El eluyente empleado fue tampón fosfato 9.0 mM y NaCl 50 mM, en presencia de cantidades crecientes del detergente aniónico SDS, durante una hora a 4°C. En la figura 3.1.2 se muestran los diferentes sedimentos y sobrenadantes obtenidos durante los tres ciclos de sonicación. En la primera sonicación sin SDS, la proteína permanece por completo de forma insoluble. Cuando se emplea 0.025% de SDS, la proteína comienza a solubilizarse, aunque la mayor parte permanece todavía precipitada, mientras que utilizando 0.05% de SDS se consigue la solubilización completa de la PRL14r.

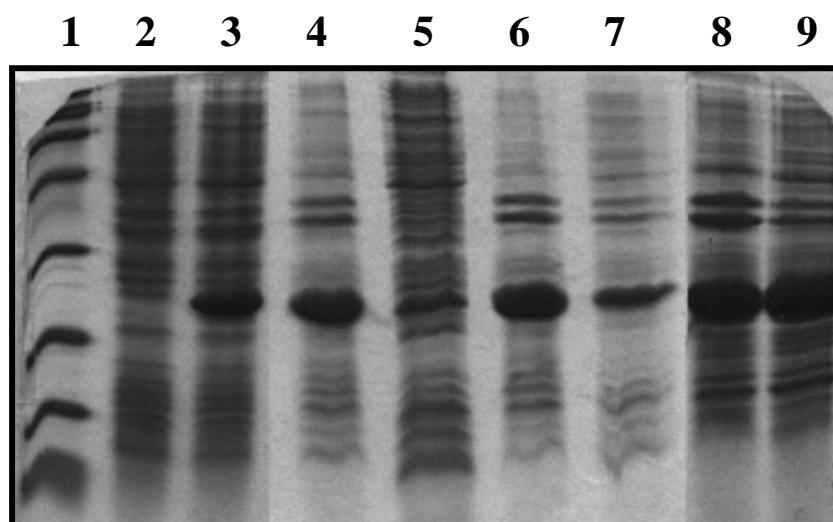


Figura 3.1.2: Electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% del producto de la solubilización de la PRL14r con Tampón Fosfato 9mM, NaCl 50mM y SDS en cantidades crecientes.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: bacterias transformadas con pQE-L14 crecidas durante 2h sin inducir.

Columna 3: bacterias transformadas con pQE-L14 inducidas durante 2h con 0.1 mM de IPTG.

Columna 4: Sedimento obtenido sin SDS.

Columna 5: Sobrenadante obtenido sin SDS.

Columna 6: Sedimento obtenido con SDS al 0.025%.

Columna 7: Sobrenadante obtenido con SDS al 0.025%.

Columna 8: Sedimento obtenido con SDS al 0.05%.

Columna 9: Sobrenadante obtenido con SDS al 0.05%.

3.1.2 Purificación en condiciones nativas de la PRL14r de *L. braziliensis*.

La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad empleando la resina de Ni²⁺ (Qiagen) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La figura 3.1.3

muestra el producto obtenido tras los lavados de la resina con tampón fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, SDS 0.05% y concentraciones crecientes de imidazol.

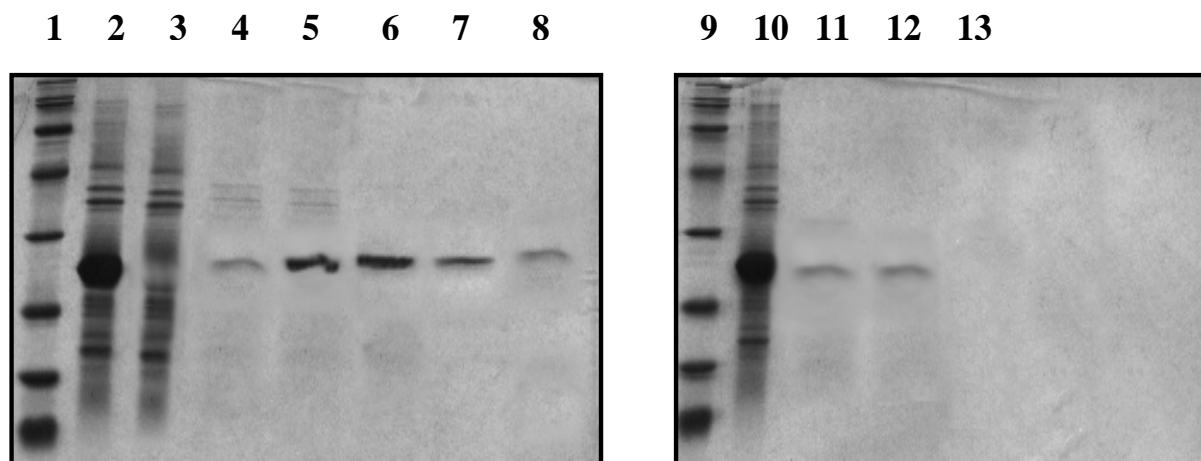


Figura 3.1.3: Purificación de la PRL14r mediante cromatografía de afinidad en resina de NTA-Ni²⁺, 20 µl de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: Sobrenadante obtenido con SDS al 0.05%.

Columna 3: Eluido de la resina.

Columna 4: Lavado a pH 8 con 5 mM de imidazol.

Columna 5: Lavado a pH 8 con 10 mM de imidazol.

Columna 6: Lavado a pH 8 con 15 mM de imidazol.

Columna 7: Lavado a pH 8 con 20 mM de imidazol.

Columna 8: Lavado a pH 8 con 50 mM de imidazol.

Columna 9: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 10: Sobrenadante obtenido con SDS al 0.05%.

Columna 11: Lavado a pH 8 con 100 mM de imidazol.

Columna 12: Lavado a pH 8 con 150 mM de imidazol.

Columna 13: Resina después de los lavados.

Como se puede ver, la unión de la proteína a la resina es muy débil ya que la proteína comienza a eluirse desde los primeros pasos de lavado, desde 5 mM de imidazol y se va eluyendo en los sucesivos lavados hasta 150 mM de imidazol. Se puede observar que después de los pasos de elución y de lavado no existen trazas de la proteína unida a la resina.

Durante el paso de elución principalmente, aunque también en los primeros pasos de lavado (5 mM de imidazol), se eluyen otras proteínas contaminantes de *E. coli* que también se unen a la resina.

Las fracciones que contenían la PRL14r purificada fueron dializadas frente a PBS 0.1X y liofilizadas. La proteína liofilizada se resuspendió en agua destilada y se determinó su concentración, obteniendo una concentración de 4.2 µg/ml, de lo que se

deduce un rendimiento de 4 mg de proteína por litro de cultivo. Los niveles de endotoxinas que presentó esta proteína recombinante purificada eran inferiores a los límites de detección del *kit* empleado, (menos de 0.1 unidades de endotoxinas/ml).

3.1.3. Respuesta humoral inducida por PRL14r de *L. braziliensis*.-

Este estudio se llevó a cabo inoculando en ratones BALB/c, la PRL14r por vía subcutánea, en presencia o en ausencia de adyuvante. Como adyuvantes se emplearon el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) emulsionado con la proteína recombinante y la proteína Hsp70 de *T. cruzi* unida covalentemente a dicha proteína. La cantidad de proteína inoculada y los tiempos de inmunización se describen en el apartado 2.27 de materiales y métodos.

Evolución de IgG frente a la proteína ribosomal L14

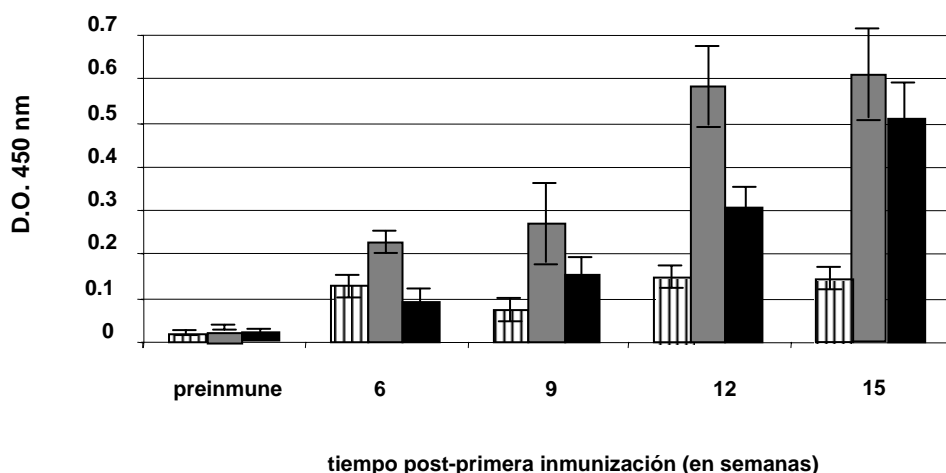


Figura 3.1.4: Análisis de la respuesta de anticuerpos IgG de ratones BALB/c inmunizados con la PRL14r de *L. braziliensis* sola (barra rayada), emulsionada con IFA (barra gris), o con una primera dosis de PRL14r sola y dos dosis posteriores de dicha proteína unida covalentemente a la proteína Hsp70 de *T. cruzi* (barra negra). Cada valor representa la absorbancia determinada como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

Como puede apreciarse en la figura 3.1.4, los animales inoculados sólo con la PRL14r no presentaron variaciones en la cantidad de anticuerpos anti-PRL14r a lo largo del ensayo. Los sueros procedentes de los ratones inmunizados con la proteína emulsionada con IFA experimentaron una importante elevación de anticuerpos anti-PRL14r en la semana 12 manteniéndose hasta la semana 15, post-primera inmunización.

Los sueros de los ratones inoculados con la proteína PRL14r unida covalentemente a la Hsp70 de *T. cruzi* presentaron un máximo en la semana 15.

Observando la figura 3.1.4 podemos ver que seis semanas después de la tercera inmunización (semana 15), se aprecia claramente una respuesta humoral contra el antígeno PRL14r, obteniéndose valores de D.O. de 0.62 y 0.5, a una dilución 1:100 del suero procedente de los ratones inoculados con la PRL14r emulsionada con IFA y unida covalentemente a la Hsp70 de *T. cruzi*, respectivamente.

Para conocer qué isotipo de inmunoglobulina es el responsable del aumento de los niveles de IgG en respuesta a los diferentes inóculos, se analizaron los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a mediante ELISA. Los sueros estudiados procedían de los ratones que presentaron niveles elevados de IgG frente a la PRL14r. En las figuras 3.1.5a y 3.1.5b se puede observar que a partir de la semana 12 después de la primera inmunización (semana 15), los ratones inmunizados con la PRL14r unida a la Hsp70 muestran una clara polarización de la respuesta hacia la producción de IgG2a, con un índice IgG2a/IgG1 de 1.6. Sin embargo, los ratones inmunizados con la PRL14r emulsionada con IFA mostraron un índice IgG2a/IgG1 de 1, tanto en la semana 12 como en la semana 15 después de la primera inoculación.

Evolución de IgG1 frente a la PRL14r

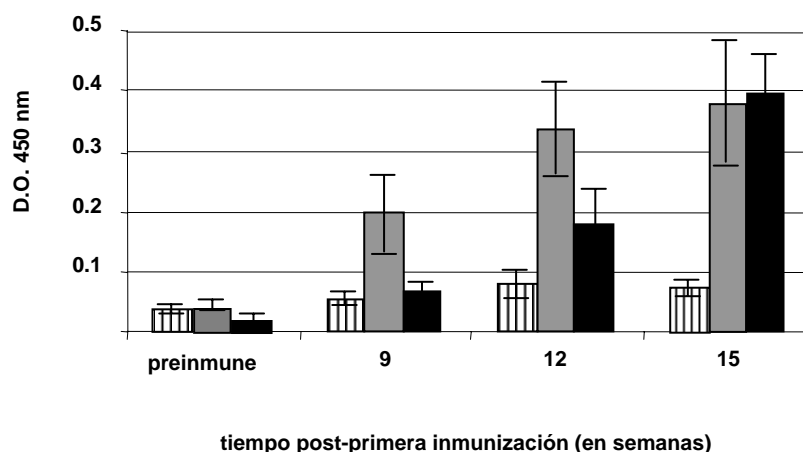


Figura 3.1.5a: Análisis de la respuesta de anticuerpos IgG1 de ratones BALB/c inmunizados con la PRL14r de *L. braziliensis* sola (barra rayada), emulsionada con IFA (barra gris), o con una primera dosis de PRL14r sola y dos dosis posteriores de dicha proteína unida covalentemente a la proteína Hsp70 de *T. cruzi* (barra negra). Cada valor representa la absorbancia determinada como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

Evolución de IgG2a frente a la PRL14r

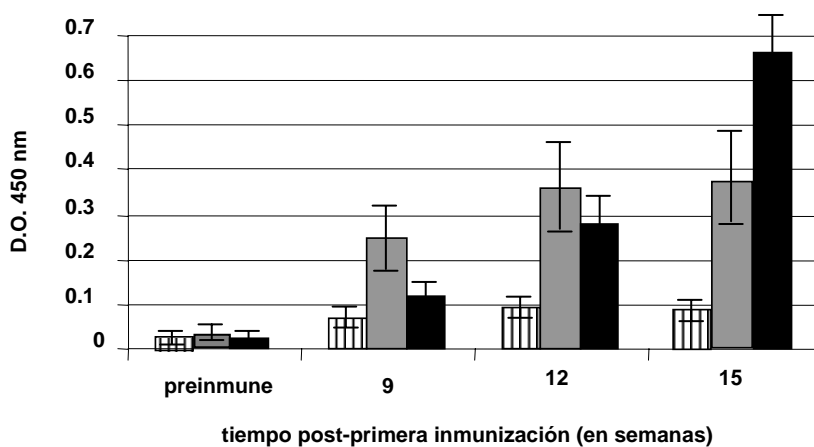


Figura 3.1.5b: Análisis de la respuesta de anticuerpos IgG2a de ratones BALB/c inmunizados con la PRL14r de *L. braziliensis* sola (barra rayada), emulsionada con IFA (barra gris), o con una primera dosis de PRL14r sola y dos dosis posteriores de dicha proteína unida covalentemente a la proteína Hsp70 de *T. cruzi* (barra negra). Cada valor representa la absorbancia determinada como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preimmune.

3.1.4. Proliferación de células esplénicas inducida por la PRL14r de *L. braziliensis* en ratones BALB/c.-

Cuatro semanas después de la segunda inmunización (semana 7), los ratones inmunizados fueron sacrificados y sus bazos fueron extraídos y homogeneizados como se describe en el apartado 2.29 de materiales y métodos. Con los esplenocitos obtenidos se realizaron los ensayos de linfoproliferación, enfrentando estas células a diferentes concentraciones de la PRL14r (0.2, 4 y 20 $\mu\text{g/ml}$).

Los resultados obtenidos mostrados en la figura 3.1.6, revelan que los esplenocitos procedentes de los ratones, tras dos inmunizaciones con la PRL14r sola, producen baja proliferación celular cuando se enfrentan a esta proteína. Únicamente se detecta una ligera respuesta cuando la concentración de proteína recombinante enfrentada es de 20 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, los esplenocitos aislados de los ratones inoculados primero sólo con la PRL14r, y a continuación, unida covalentemente a la Hsp70 de *T. cruzi*, presentan una significativa proliferación celular, con un índice de estimulación de 3 en presencia de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de PRL14r. Cuando el ensayo se realiza con los esplenocitos procedentes de los ratones inoculados con dicha proteína emulsionada con IFA, se obtiene un índice de estimulación de 4.8 a la misma

concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PRL14r. Como era de esperar, los esplenocitos obtenidos de los ratones control no muestran estimulación de los esplenocitos cuando se enfrentan a la PRL14r.

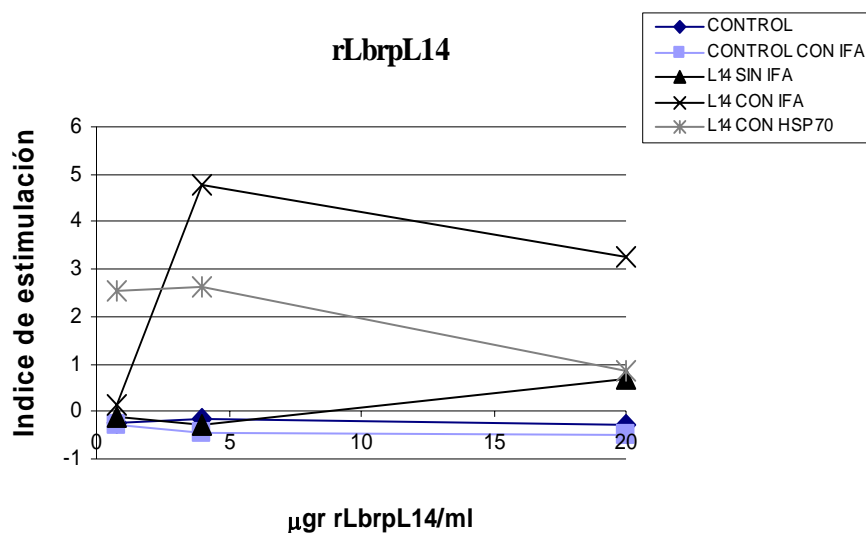


Figura 3.1.6: Proliferación de células esplénicas inducida por la PRL14r de *L. braziliensis*.

Los esplenocitos procedentes de los ratones inmunizados con solución salina (◆), solución salina con IFA (■), PRL14r sola (▲), PRL14r emulsionada con IFA (×) y PRL14r unida covalentemente a la Hsp70 de *T. cruzi* (*), fueron aislados cuatro semanas después de la segunda inmunización y cultivados durante tres días en presencia de 0.2, 4 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PRL14r. Después de añadir 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ de [metil- ^3H] timidina, las células se incubaron otras 6 horas más a 37°C y posteriormente se midió el ^3H incorporado. El índice de estimulación es calculado como [media aritmética de las c.p.m. (cultivo estimulado) – media aritmética de las c.p.m. (cultivo control)] / media aritmética de las c.p.m. (cultivo control).

3.1.5. Discusión.-

En este trabajo se ha realizado la purificación de la PRL14r de *Leishmania braziliensis*, empleando el protocolo descrito por Marañón C., *et. al.* 2000, que nos permitió solubilizar y purificar la proteína recombinante bajo condiciones nativas.

La PRL14r de *L. braziliensis* se presenta como indetectable para los ratones BALB/c cuando es inoculada sin adyuvante. Resultados similares se obtuvieron cuando se enfrentó dicha proteína a sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea y con enfermedad de Chagas (González A.C., *et. al.* En prensa), por lo tanto podemos concluir que la PRL14r no es visible para el sistema inmune.

Sin embargo, cuando dicha proteína se inocula unida a la proteína Hsp70 de *T. cruzi* se obtiene una marcada respuesta tipo Th1, hecho que se ve confirmado por la

capacidad de generar una importante estimulación de los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con dicha mezcla. El efecto inmunomodulador de las proteínas de choque térmico ha sido ampliamente demostrado por diversos autores (Singh-Jasuja H., *et. al.*, 2001). Un ejemplo es la proteína viral p24 HIV-1, esta proteína por si sola no genera respuesta inmunológica, pero cuando se inocula unida covalentemente a la Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de desarrollar respuesta celular y humoral (Suzue K., *et al.* 1996). De igual manera, ratones inmunizados con la proteína KMP-11 de *T. cruzi* sola, no generan respuesta alguna, pero si se presenta unida a la Hsp70 de *T. cruzi*, se obtiene una importante respuesta celular con elevación de IgG2a (Marañón C., *et. al.*, 2001; Planelles L., *et. al.*, 2001). No sólo la Hsp70 es capaz de generar inmunomodulación, también otras proteínas de choque térmico tienen capacidad de modular la respuesta inmunológica como es el caso de la Hsp83 de *L. infantum* que unida a la proteína de unión a membrana (MBP) de *L. infantum* consigue niveles elevados de IgG (Rico A. I., *et. al.* 1999).

La inoculación subcutánea de la PRL14r emulsionada con IFA también estimula una respuesta humoral por parte de los ratones BALB/c, sin embargo no existen diferencias de los niveles de los isotipos de inmunoglobulina (IgG1 e IgG2a) como ocurre en el caso anterior, lo que induciría una respuesta mixta Th1-Th2. Los esplenocitos de los inoculados con esta emulsión experimentaron una importante estimulación al ser enfrentados a la RPL14r.

Estos resultados hacen que consideremos a esta proteína como una buena candidata para generar cierta protección contra el parásito, así como una proteína óptima como control para el estudio de moléculas moduladoras de respuesta inmunológica.

3.2. PROTEÍNA RIBOSOMAL L25 RECOMBINANTE (RPL25r).-

3.2.1. Clonaje del extremo amino de la PRL25r de *Leishmania braziliensis*.-

La secuencia completa que codifica la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* fue descrita previamente en mi tesis de licenciatura, y clonada en el vector de expresión pQE (Qiagen), obteniéndose el clon pQE-rpL25 que codifica la proteína ribosomal L25 recombinante (PRL25-r) (González A.C., *et. al.* 2002). La figura 3.2.1 muestra la secuencia de dicha proteína que se encuentra depositada en la base de datos Genbank con el número de acceso AF234162.

```

                                     M A A A P K T
1  GTTTCTGTACTTTATTGCAGTGTTGTTTTTCACCATGGCTGCTGCTCCGAAGAC
   A K K A A P K D V K A T K V V K V T
55  CGCCAAGAAGGCTGCGCCGAAGGATGTGAAGGCGACCAAGGTTGTCAAGGTGAC
   T R K S Y T R P Q F R R P H T Y R R
110 GACGCGGAAGTCTACACCCGCCCGCAGTTCCGCCGCCCGCACACCTACCGCAG
   P A I A K P S N R V T X E S K D I T
165 GCCAGCAATCGAAAGCCGAGCAACCGCGTGACCSTGGAGTCGAAGGACATTAC
   A F S V I R Y P L T T D K A M K K I
220 TGCCTTCAGTGTGATCCGCTACCCACTGACGACAGACAAGGCGATGAAGAAGAT
   E E N N T L T F I V D A C A N K T E
275 CGAGGAGAACAAACACCCTGACCTTCATCGTGGATGCCTGCGCCAACAAGACCGA
   I K K A M R K L Y Q V K A V K V N T
330 GATCAAGAAGGCGATGCGCAAGCTGTACCAGGTCAAGGCTGTGAAGGTCAACAC
   L I R P D G L K K A Y I R L S A A H
385 CCTGATCCGCCCGGATGGTCTGAAGAAGGCTTACATCCGCCTGTCTGCGGCCCA
   D A L D T A N K I G L V # #
440 CGACGCTCTGGACACCGCCAACAAGATCGGTCTTGTCTAGTAAGGTGGTGCGGC
495 TACTTTTGGGATTATTTTTTTATTACCTTTTTTTTTTCAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 3.2.1: Secuencia de aminoácidos de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* (AF234162). En rojo se señala la secuencia de nucleótidos que codifica para el extremo amino terminal de la proteína, obtenida por PCR empleando los cebadores amino-A y amino-B (apartado 2.13 de materiales y métodos). La secuencia de localización nuclear (NLS) aparece en gris.

La región amino terminal de esta proteína se clonó de forma independiente por amplificación por PCR como se indica en el apartado 2.13 de materiales y métodos. El producto amplificado que presentó un tamaño de 192 pb (figura 3.2.2), fue purificado desde gel de agarosa al 1%, se trató con la enzima Klenow para eliminar las adeninas protuberantes fruto de la PCR (*SureClone Ligation Kit* (Pharmacia Biotech), y a

continuación el fragmento se insertó en el vector pQE32 (Qiagen), previamente linealizado con Sma I y desfosforilado como se explica en el mismo apartado, (figura 3.2.3.).

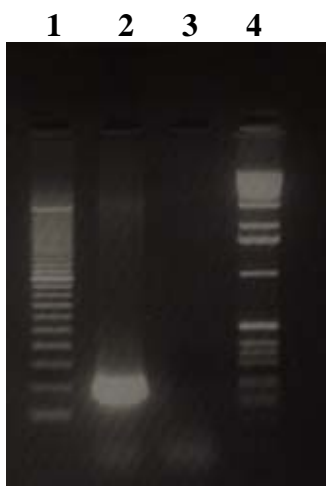


Figura 3.2.2: Electroforesis en gel de agarosa al 1'5% del producto de amplificación por PCR.

Columna 1: Marcador de XIV (Roche).

Columna 2: Fragmento amplificado que codifica para el extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* obtenido por PCR a partir de 20 ng de ADN plasmídico pQE32-L25.

Columna 3: Control negativo de PCR, ADN plasmídico sin inserto.

Columna 4: Marcador X (Roche).

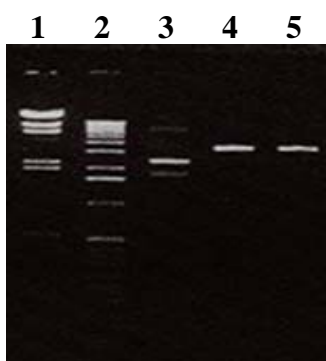


Figura 3.2.3: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del vector de expresión plasmídico pQE (Qiagen).

Columna 1: Marcador de peso molecular II (Roche).

Columna 2: Marcador X (Roche).

Columna 3: ADN del vector pQE32 purificado.

Columna 4: 1µg del vector pQE32 digerido con 1U de la enzima SmaI.

Columna 5: 1µg del vector pQE32/SmaI desfosforilado con 1U de fosfatasa alcalina.

Fruto del clonaje y transformación en las bacterias *E. coli* de la cepa M15 se obtuvieron más de 200 colonias, que teóricamente poseían el plásmido. Para seleccionar los clones que contenían el inserto en la orientación adecuada, se realizó una PCR-colonia picando 16 colonias, resultando que 4 clones portaban el inserto con el tamaño y la orientación correcta, (figura 3.2.4.).

Una vez confirmado por secuenciación, que estos clones contenían la secuencia correcta que codifica el extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* y en la pauta de lectura adecuada para su expresión, se realizó el ensayo de inducción de uno de los clones que se denominó pQE-L25a para obtener la proteína ribosomal L25amino recombinante (PRL25a-r).



Figura 3.2.4: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos a partir de la PCR colonia con las 16 colonia elegidas al azar.

Columna 1: Marcador XIV (Roche).

Columnas 2-17: Amplificados obtenidos de cada colonia con los cebadores pQE type III y Amino-B. Los clones 4, 6, 9 y 15 dan el tamaño esperado.

Columna 18: Control negativo de la PCR.

Columna 19: Marcador X (Roche).

3.2.2. Clonaje del extremo carboxilo de la proteína ribosomal L25 de *Leishmania braziliensis*.-

El fragmento que corresponde con el extremo carboxilo terminal de la proteína ribosomal L25 se señala en azul en la figura 3.2.5a.

```

                                     M A A A P K T A
1  GTTTCTGTACTTTATTGCAGTGTGTTTTTCACCATGGCTGCTGCTCCGAAGACCGCCA
   K K A A P K D V K A T K V V K V T T R K
60  AGAAGGCTGCGCCGAAGGATGTGAAGGCGACCAAGGTTGTCAAGGTGACGACGCGGAAG
   S Y T R P Q F R R P H T Y R R P A I A K
120 TCCTACACCCGCCCGCAGTTCCGCCGCCGCACACCTACCGCAGGCCAGCAATCGCAA
   P S N R V T X E S K D I T A F S V I R
179 GCCGAGCAACCGCGTGACCSTGGAGTCGAAGGACATTACTGCCTTCAGTGTGATCCGCT
   Y P L T T D K A M K K I E E N N T L T F
238 ACCCACTGACGACAGACAAGGCGATGAAGAAGATCGAGGAGAACAACACCCTGACCTTC
   I V D A C A N K T E I K K A M R K L Y Q
297 ATCGTGGATGCCTGCGCCAACAAGACCGAGATCAAGAAGGCGATGCGCAAGCTGTACCA
   V K A V K V N T L I R P D G L K K A Y
356 GGTCAAGGCTGTGAAGGTCAACACCCTGATCCGCCCGGATGGTCTGAAGAAGGCTTACA
   I R L S A A H D A L D T A N K I G L V #
415 TCCGCCTGTCTGCGGCCACGACGCTCTGGACACCGCCAACAAGATCGGTCTTGTCTAG
#
474 TAAACGCAGAATTTGGCGGTGGTGC GGCTACTTTTGGGATTATTTTTTATTACCTTTTT
532 TTTTCAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 3.2.5a: Secuencia de aminoácidos de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* (AF234162). En azul se señala la secuencia de nucleótidos que codifica para el extremo carboxilo terminal de la proteína obtenida por PCR utilizando los cebadores carboxi-A y carboxi-B (apartado 2.14 de materiales y métodos). Los tres dominios de unión al ARN ribosómico se señalan en gris.

Esta región se obtuvo por PCR, como se describe en el apartado 2.14 de materiales y métodos, resultando un fragmento amplificado de 237 pb que coincide con la distancia en nucleótidos que separa los cebadores, figura 3.2.5b.



Figura 3.2.5b: Electroforesis en gel de agarosa al 1'5% del producto de amplificación por PCR.

Columna 1: Marcador X (Roche).

Columna 2: Fragmento amplificado que codifica para el extremo carboxilo terminal de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* obtenido por PCR a partir de 20 ng de ADN plasmídico pQE32-L25.

Columna 3: Control negativo de PCR, ADN plasmídico sin inserto

Columna 4: Marcador XIV (Roche).

Una vez que el fragmento amplificado fue purificado y clonado en el vector de expresión pCRT7/NT-TOPO (Invitrogen), se transformó en la cepa TOP10F' de *E. coli*. Se obtuvieron un gran número de colonias de las que se eligieron 12 al azar, se analizaron por PCR-colonias y dio como resultado que sólo una presentaba el inserto en las condiciones deseadas, (figura 3.2.6). Este clon se denominó pCR-L25c, se secuenció para confirmar que su secuencia y su pauta de lectura era la correcta y así poder obtener la proteína ribosomal L25 carboxilo recombinante (PRL25c-r).

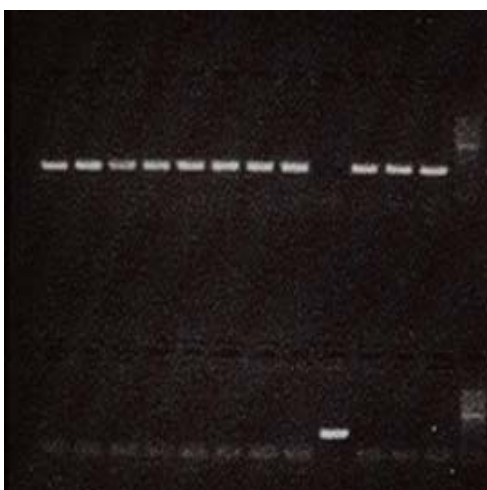


Figura 3.2.6: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos a partir de la PCR colonia con las 12 colonia elegidas al azar.

Columna 1: Control negativo de la PCR

Columnas 2-13, 1° fila: Amplificados obtenidos de cada colonia con los cebadores Carboxilo-A y pRSET-Rev.

Columna 2-13, 2° fila: Amplificados obtenidos de cada colonia con los cebadores Carboxilo-B y pT7-Forward.

Columna 14: Marcador XIV (Roche).

3.2.3. Expresión y solubilización en condiciones nativas de las PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de *L. braziliensis*.-

Los ensayos de inducción se realizaron empleando diferentes concentraciones de IPTG, 0.1 mM y 0.5 mM, y se observó que las condiciones óptimas de expresión de estas proteínas recombinantes se consigue al inducir con 0.1 mM de IPTG a 37°C durante 2 horas, (figura 3.2.7). El tamaño obtenido de cada proteína es de 20 KDa para la PRL25r, 12 KDa para la PRL25a-r y de 14 KDa para la PRL25c-r, que coincide con el peso molecular teórico esperado.

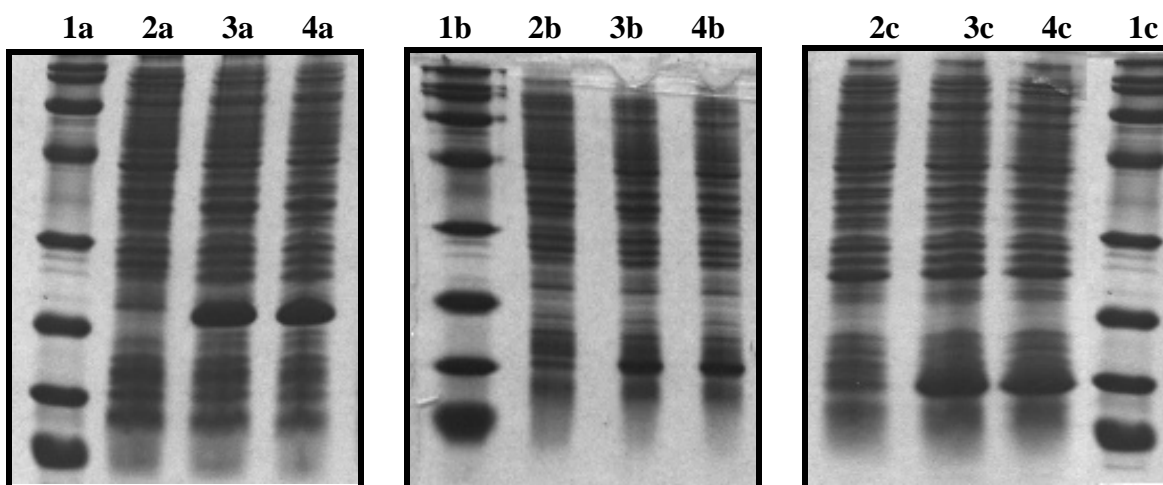


Figura 3.2.7a

Figura 3.2.7b

Figura 3.2.7c

Figura 3.2.7: Gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie donde se visualiza el ensayo de inducción de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de *L. braziliensis* en *E. coli*.

Columna 1a, 1b, 1c: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2a, 2b, 2c: bacterias *E. coli* transformadas con pQE-L25, pQE-L25a y pCR-L25c, respectivamente, crecidas durante 2h sin inducir.

Columna 3a, 3b, 3c: bacterias *E. coli* transformadas con pQE-L25, pQE-L25a y pCR-L25c, respectivamente, e inducidas durante 2h con 0.1 mM de IPTG.

Columna 4a, 4b, 4c: bacterias *E. coli* transformadas con pQE-L25, pQE-L25a y pCR-L25c, respectivamente, e inducidas durante 2h con 0.5 mM de IPTG.

La solubilización de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r se consiguió empleando como eluyente, tampón fosfato 9 mM, NaCl 50 mM y el detergente aniónico SDS a diferentes concentraciones (0%, 0.025% y 0.05%), durante 1 hora a 4°C. Las figuras 3.2.8, 3.2.9 y 3.2.10 muestran los diferentes precipitados y sobrenadantes obtenidos durante los tres ciclos de sonicación, para las tres proteínas PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r, respectivamente. Como se puede observar, las proteínas comienzan a solubilizarse cuando se emplea 0.025% de SDS, pero la mayoría permanecen en forma

insoluble, sin embargo, utilizando 0.05% de SDS se consigue la solubilización completa de las tres proteínas recombinantes.

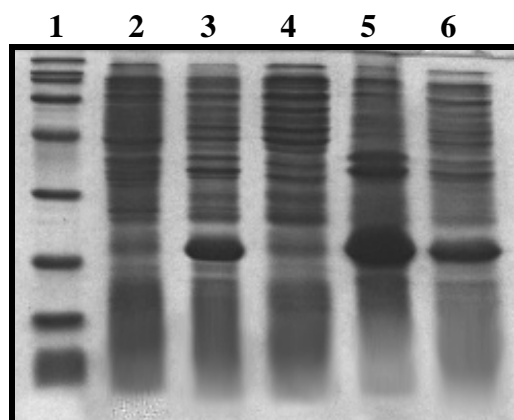


Figura 3.2.8: Solubilización de la PRL25r mediante el uso de SDS, 10 μ l de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: bacterias *E. coli* transformadas con pQE-L25 crecidas durante 2h sin inducir.

Columna 3: bacterias *E. coli* transformadas con pQE-L25 inducidas durante 2h con 0.1 mM de IPTG.

Columna 4: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato y NaCl sin SDS.

Columna 5: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.025%.

Columna 6: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.025%.

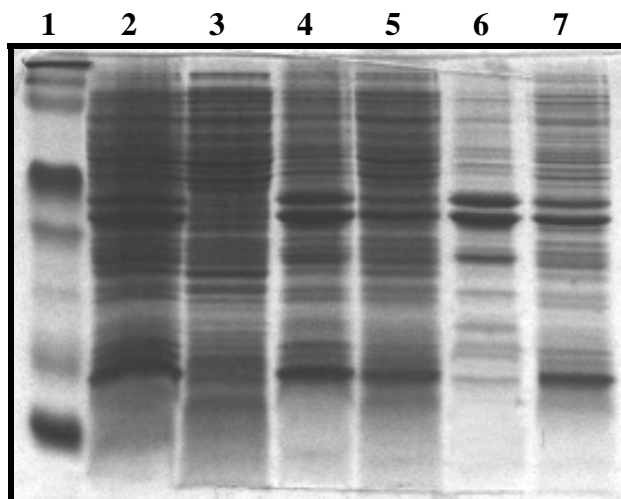


Figura 3.2.9: Solubilización de la PRL25a-r mediante el uso de SDS, 10 μ l de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Kaleidoscope prestained Standard” (Bio-Rad).

Columna 2: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato y NaCl sin SDS.

Columna 3: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato y NaCl sin SDS.

Columna 4: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.025%.

Columna 5: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.025%.

Columna 6: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.05%.

Columna 7: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.05%.

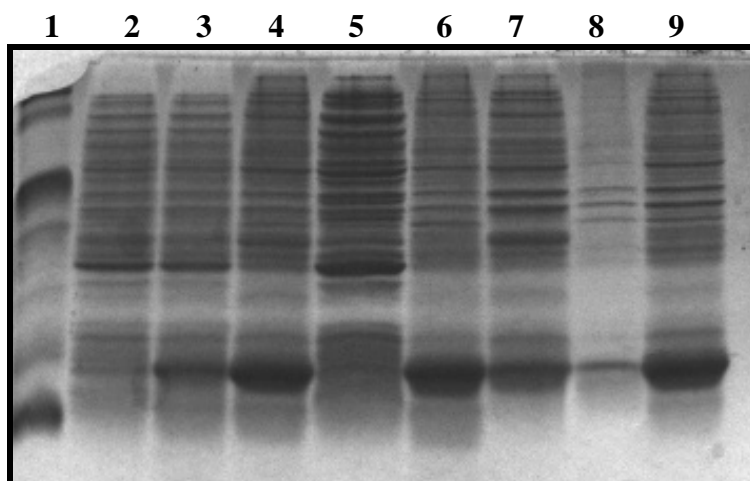


Figura 3.2.10: Solubilización de la PRL25c-r mediante el uso de SDS, 10 μ l de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Kaleidoscope prestained Standard” (Bio-Rad).

Columna 2: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pCR-L25C crecidas durante 2h sin inducir.

Columna 3: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pCR-L25C inducidas durante 2h con 0.1 mM de IPTG.

Columna 4: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato y NaCl sin SDS.

Columna 5: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato y NaCl sin SDS.

Columna 6: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.025%.

Columna 7: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.025%.

Columna 8: Precipitado obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.05%.

Columna 9: Sobrenadante obtenido tras solubilizar con tampón fosfato, NaCl y SDS al 0.05%.

3.2.4. Purificación de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de *L. braziliensis*.

Los sobrenadantes obtenidos tras la tercera sonicación fueron los empleados para realizar la purificación de las tres proteínas recombinantes siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.17.2 de materiales y métodos. En las figuras 3.2.11, 3.2.12 y 3.2.13 se observan las diferentes fracciones proteicas purificadas, obtenidas mediante concentraciones crecientes de imidazol (0, 5, 10, 15, 20, 50, 100 y 150 mM).

La unión de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r a la resina es buena ya que no se observan trazas de estas proteínas en el eluyente. En las tres purificaciones, la unión de la proteína a la resina es muy débil ya que se empiezan a eluir desde los primeros pasos de lavado, desde 5 mM de imidazol y se obtienen por completo con 100 mM de imidazol, no observándose restos de estas proteínas unidas a la resina.

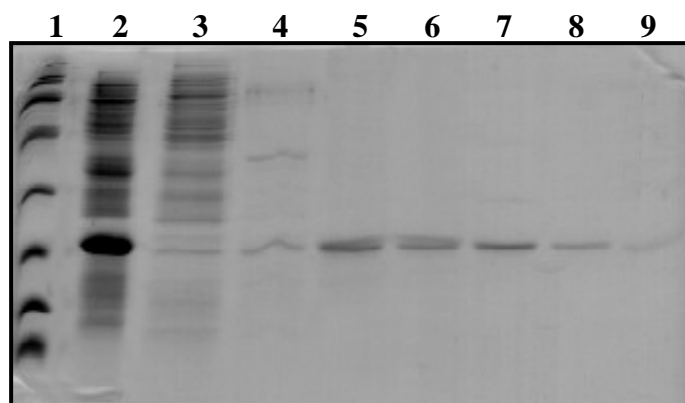


Figura 3.2.11: Purificación de la PRL25r mediante cromatografía de afinidad en resina de NTA-Ni²⁺, 20 µl de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: Sobrenadante obtenido tras solubilizar tras la tercera sonicación e incubado con la resina durante 4 horas a 4°C en agitación suave.

Columna 3: Eluido de la resina.

Columna 4: Lavado a pH 8 con 5 mM de imidazol.

Columna 5: Lavado a pH 8 con 10 mM de imidazol.

Columna 6: Lavado a pH 8 con 15 mM de imidazol.

Columna 7: Lavado a pH 8 con 20 mM de imidazol.

Columna 8: Lavado a pH 8 con 50 mM de imidazol.

Columna 9: Lavado a pH 8 con 100 mM de imidazol.

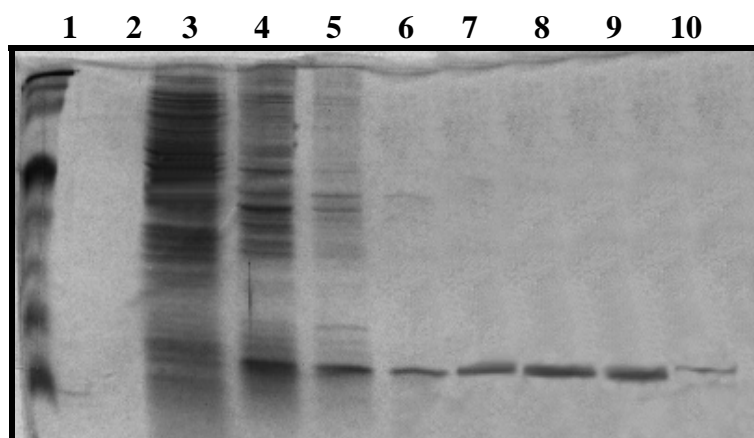


Figura 3.2.12: Purificación de la PRL25a-r mediante cromatografía de afinidad en resina de NTA-Ni²⁺, 20 µl de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: Resina al final de la purificación.

Columna 3: Eluido de la resina.

Columna 4: Lavado a pH 8 con 5 mM de imidazol.

Columna 5: Lavado a pH 8 con 10 mM de imidazol.

Columna 6: Lavado a pH 8 con 15 mM de imidazol.

Columna 7: Lavado a pH 8 con 20 mM de imidazol.

Columna 8: Lavado a pH 8 con 50 mM de imidazol.

Columna 9: Lavado a pH 8 con 100 mM de imidazol.

Columna 10: Lavado a pH 8 con 150 mM de imidazol.

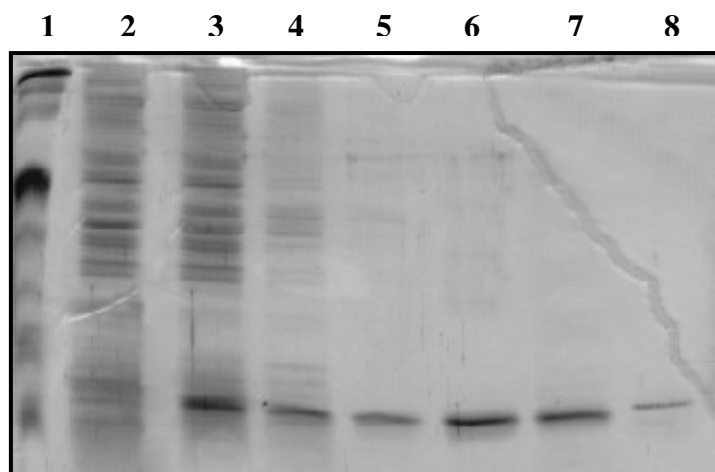


Figura 3.2.13: Purificación de la PRL25c-r mediante cromatografía de afinidad en resina de NTA-Ni²⁺, 20 µl de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: Eluido de la resina.

Columna 3: Lavado a pH 8 con 5 mM de imidazol.

Columna 4: Lavado a pH 8 con 10 mM de imidazol.

Columna 5: Lavado a pH 8 con 15 mM de imidazol.

Columna 6: Lavado a pH 8 con 20 mM de imidazol.

Columna 7: Lavado a pH 8 con 50 mM de imidazol.

Columna 8: Lavado a pH 8 con 100 mM de imidazol.

Sin embargo como se puede apreciar, al mismo tiempo que comienzan a eluirse las proteínas recombinantes, además se eluyen en los lavados con 5 mM de imidazol otras proteínas contaminantes de *E. coli*, que permanecían unidas a la resina.

Las fracciones donde se observó la mayor pureza de estas proteínas fueron las elegidas para realizar los sucesivos ensayos. Para el caso de la PRL25r la fracción obtenida con 20 mM fue la empleada, para la PRL25a-r se eligió la fracción obtenida con 50 mM y para la PRL25c-r se cogió la fracción resultante empleando 10 mM de imidazol. Después de liofilizarlas se resuspendieron en agua bidestilada y se determinaron las concentraciones de cada una. Estas oscilaban entre 3-5 mg de proteína por litro de cultivo.

Los niveles de endotoxinas presentes en estas proteínas recombinantes purificadas fueron inferiores a los límites de detección del *kit* empleado, (menos de 0.1 unidades de endotoxinas/ml).

3.2.5. Análisis serológicos frente a la PRL25r de *L. braziliensis*.-

Mediante la técnica de ELISA se estudió el reconocimiento inmunológico de esta proteína por individuos con leishmaniasis mucocutánea y cutánea, así como por pacientes con enfermedad de Chagas. Como controles negativos se emplearon sueros de españoles de la provincia de Santa Cruz de Tenerife que no habían estado en contacto con los parásitos que provocan esta enfermedad.

CODIGO	rpL25T	CODIGO	rpL25T
LMC	0,29	Try 1	1,237
LMC	0,452	Try 4	2,345
LMC	0,255	Try 7	1,264
LMC	2,353	Try 8	2,468
LMC	2,407	Try 10	2,848
LMC	2,43	Try 12	1,335
LMC	2,512	Try 14	1,558
LMC	2,726	Try 15	0,47
LMC	2,908	Try 16	2,918
LMC	2,434	Try 21	2,984
LC	0,13	S/C 1	1,302
LC	0,229	S/C 2	0,631
LC	2,605	S/C 3	0,602
LC	2,600	S/C 4	1,958
LC	2,715	S/C 5	1,287
LC	2,415	S/C 6	0,765
LC	2,488	S/C 7	0,858
LC	2,620	S/C 8	1,021
LC	3,150	S/C 9	1,816
LC	2,965	S/C 10	1,394
PROMEDIO	1,163	DESV EST	0,473

Tabla 3.2.1: ELISA con la PRL25r de *L. braziliensis*. Los valores de D.O. se tomaron a 490 nm. Los códigos LC y LMC corresponden a los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea, respectivamente, el código Try corresponde a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y los códigos S/C son los sueros que proceden de personas sanas de la Provincia de Santa Cruz de Tenerife sin contacto con la enfermedad.

Todos los sueros, incluso los negativos, presentan una gran reactividad frente a la PRL25r. Como se observa en la tabla 3.2.1 existe reconocimiento de la proteína tanto por sueros del grupo control negativo como de cada uno de los grupos de pacientes.

Este mismo ensayo se realizó por “Western blot” obteniéndose los mismo resultados. Como revela la figura 3.2.14, todos sueros reconocen en mayor o menor medida la proteína ribosomal L25 recombinante.

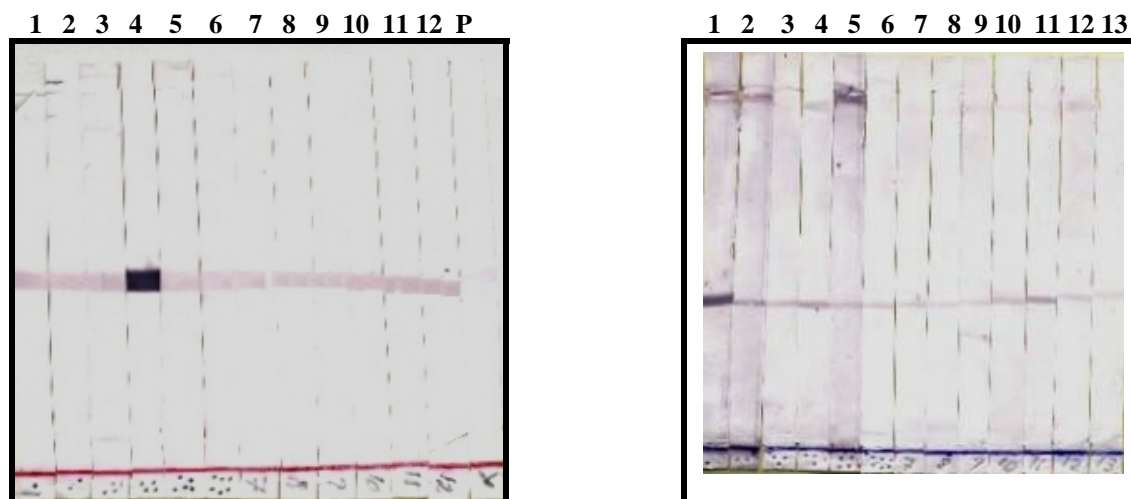


Figura 3.2.14: “Western blot” con la PRL25r de *L. braziliensis*:

Columnas 1- 6: sueros de pacientes con leishmaniasis a la dilución 1:750.

Columnas 7-12: sueros de pacientes sanos de la provincia de Santa Cruz de Tenerife a la dilución 1:750.

La columna P y 13 corresponden a la banda teñida con Ponceau para demostrar que la transferencia es correcta.

3.2.6. Análisis serológicos frente a la PRL25a-r de *L. braziliensis*.

El extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis* presenta una elevada homología con el mismo extremo amino de la misma proteína descrita en *Trypanosoma brucei* (71% de identidad). Sin embargo, esta alta homología desaparece cuando se compara con la proteína ribosomal L25 de *Homo sapiens*, de *Schizosaccharomyces pombe* y de rata (31%, 31% y 34% de identidad, respectivamente) (González A C., *et. al.* 2002).

Por ello, se decidió analizar la capacidad diagnóstica de este fragmento, frente a los mismos sueros que se utilizaron en el punto anterior.

Como se puede ver en la tabla 3.2.2, el 100% de los sueros de pacientes con leishmaniasis y el 70% de los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, presentan D.O. superiores a 1,3, sin embargo los sueros control negativo no superan D. O. de 0,8.

CODIGO	rpL25A	CODIGO	rpL25A
LMC	1.322	Try 1	1.429
LMC	2.405	Try 4	2.344
LMC	2.540	Try 7	1.680
LMC	2.634	Try 8	2.410
LMC	2.565	Try 10	2.663
LMC	2.377	Try 12	0.492
LMC	2.448	Trp 14	0.217
LMC	2.528	Trp 15	0.041
LMC	1.943	Trp 16	2.543
LMC	3.054	Trp 21	2.496
LC	2.157	S/C 1	0,321
LC	2.060	S/C 2	0,131
LC	2.588	S/C 3	0,136
LC	2.680	S/C 4	0,602
LC	2.647	S/C 5	0,12
LC	2.542	S/C 6	0,116
LC	2.221	S/C 7	0,138
LC	2.949	S/C 8	0,813
LC	2.815	S/C 9	0,628
LC	2.933	S/C 10	0,656
PROMEDIO			0,366
DESV. EST.			0,278
Pto. de corte			0,921

Tabla 3.2.2: ELISA con la PRL25a-r de *L. braziliensis*. Los valores de D.O. se tomaron a 490 nm. Los códigos LC y LMC corresponde a los sueros de los pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea, respectivamente, el código Try corresponde a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y los códigos S/C son los sueros que proceden de personas sanas de la Provincia de Santa Cruz de Tenerife sin previo contacto con la enfermedad. Se consideran positivos aquellos sueros que superan el punto de corte, el cual se establece en la media de los sueros negativos mas dos desviaciones estándar. En negrita se indican los sueros considerados positivos.

Cuando se analizó esta reactividad por “Western Blot” (figura 3.2.15), los sueros de pacientes leishmaniásicos, también reconocían la PRL25a-r y los sueros control negativo no reaccionaron con dicha proteína en idénticas condiciones.



Figura 3.2.15a

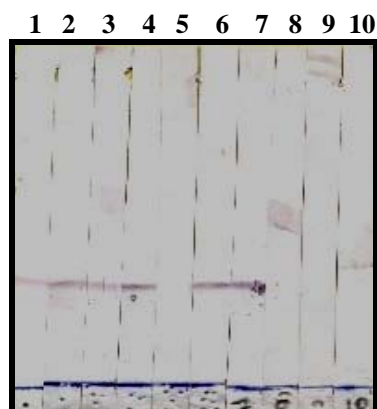


Figura 3.2.15b

Figura 3.2.15: “Western blot” con la PRL25a-r de *L. braziliensis*:

Figura 3.2.15a:

Columnas 1- 6: sueros de pacientes con leishmaniasis a la dilución 1:750.

Columnas 7-12: sueros de pacientes sanos de la provincia de Santa Cruz de Tenerife a la dilución 1:750.

La columna P corresponde a la banda teñida con Ponceau para demostrar que la transferencia es correcta.

Figura 3.2.15b:

Columnas 1-7: sueros de pacientes con leishmaniasis a la dilución 1:750.

Columnas 8-9: sueros de pacientes sanos de la provincia de Santa Cruz de Tenerife a la dilución 1:750. La

columna 10 corresponde a la banda teñida con Ponceau para demostrar que la transferencia es correcta.

3.2.7. Serodiagnósticos con los péptidos sintéticos del extremo amino de la proteína ribosomal L25 de *L. braziliensis*.-

Como consecuencia de la antigenicidad que presentaba el extremo amino terminal de la proteína L25 de *L. braziliensis*, se decidió sintetizar 3 péptidos que solaparan esta región amino para intentar identificar algún epítipo responsable del reconocimiento. Considerando positivos aquellos sueros que superen el punto de corte, el cual se establece como la media de los sueros negativos mas dos desviaciones estándar (punto de corte 0,1), el péptido 23083 era reconocido por un 30% (6/20) de los sueros leishmaniásicos, el péptido 23085 fue reconocido por un 35% (7/20) de los sueros y el péptido 23089 por un 40% (8/20) de los sueros. Este resultado se muestra en la tabla 3.2.3.

Con respecto a los sueros de los pacientes chagásicos, el reconocimiento fue de un 20% para los tres péptidos analizados. Ninguno de los sueros control negativo presentaron una reacción positiva con los péptidos analizados, de igual manera que ocurrió en el ensayo de “Western blot” contra la PRL25a-r.

CODIGO	PEPTIDO 23083	PEPTIDO 23085	PEPTIDO 23089	CODIGO	PEPTIDO 23083	PEPTIDO 23085	PEPTIDO 23089
LR 385	0,045	0,042	0,238	Try 1	0,101	0,05	0,053
LR 449	0,062	0,077	0,069	Try 4	0,064	0,063	0,053
LR 470	0,039	0,052	0,106	Try 7	0,109	0,052	0,048
LR 471	0,043	0,047	0,046	Try 8	0,055	0,042	0,104
LR 494	0,069	0,058	0,050	Try 10	0,057	0,103	0,042
LR 497	0,066	0,041	0,136	Try 12	0,041	0,047	0,031
LR 502	0,045	0,050	0,055	Try 14	0,052	0,047	0,042
LR 537	0,055	0,115	0,037	Try 15	0,036	0,059	0,04
LR 538	0,062	0,059	0,171	Try 16	0,044	0,112	0,042
LR 539	0,041	0,108	0,055	Try 21	0,047	0,048	0,103
LR 517	0,102	0,074	0,053				
LR 572	0,041	0,103	0,044	S/C 1	0,051	0,061	0,044
LR 584	0,064	0,075	0,128	S/C 2	0,064	0,062	0,037
LR 618	0,070	0,057	0,102	S/C 3	0,036	0,036	0,026
LR 620	0,056	0,075	0,050	S/C 4	0,047	0,047	0,032
LR 626	0,103	0,108	0,039	S/C 5	0,047	0,046	0,046
LR 647	0,109	0,107	0,108	S/C 7	0,06	0,051	0,031
LR 652	0,105	0,059	0,054	S/C 8	0,057	0,06	0,033
LR 667	0,136	0,119	0,044	S/C 9	0,048	0,046	0,046
LR 692	0,106	0,111	0,106	S/C 10	0,037	0,058	0,033
PROMEDIO		0,053	0,052	0,036			
DES. EST.		0,010	0,009	0,008			
Pto. Corte		0,073	0,070	0,052			

Tabla 3.2.3: ELISA con los tres péptidos que solapan el extremo amino terminal de la proteína L25 de *L. braziliensis*. Los valores de D.O. se tomaron a 490 nm. El código LR corresponde a los sueros de los pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea, el código Try corresponde a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y el código S/C son los sueros que proceden de pacientes sanos de la Provincia de Santa Cruz de Tenerife sin contacto con la enfermedad. Se consideran positivos aquellos sueros que superan el punto de corte, el cual se establece como la media de los sueros negativos mas dos desviaciones estándar. En negrita se indican los sueros considerados positivos.

3.2.8. Análisis serológicos frente a la PRL25c-r de *L. braziliensis*.-

El extremo carboxilo terminal de la proteína L25 de *L. braziliensis* corresponde con la región conservada entre sus homólogas ya descritas. Para poder confirmar si era este extremo de la proteína el responsable del reconocimiento inespecífico que presenta la PRL25r, se realizó un “Western blot” empleando como antígeno esta fracción terminal de la proteína.

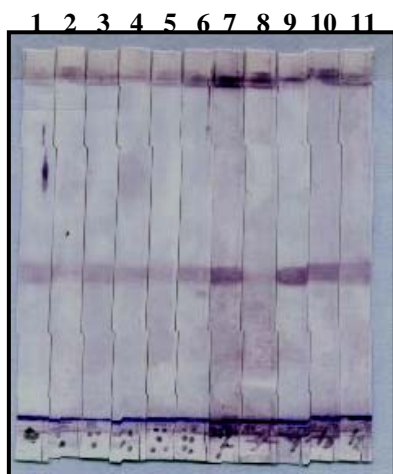


Figura 3.2.16: “Western blot” con la PRL25c-r de *L. braziliensis*:

Columnas 1- 6: sueros de pacientes con leishmaniasis a la dilución 1:750.

Columnas 7-11: sueros de pacientes sanos de la provincia de Santa Cruz de Tenerife a la dilución 1:750.

Como se puede observar en la figura 3.2.16, todos los sueros ensayados se comportan de forma idéntica a como ocurría cuando se enfrentaban a la PRL25r.

3.2.9. Respuesta humoral inducida por la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de *L. braziliensis* en ratones BALB/c.-

Con el fin de conocer si la PRL25r y sus extremos, PRL25a-r y PRL25c-r, de *L. braziliensis* eran capaces de desencadenar una respuesta humoral anti-PRL25r, anti-PRL25a-r y anti-PRL25c-r, se inocularon ratones BALB/c con dichas proteínas recombinantes por vía subcutánea. En todos los casos, la proteína fue purificada y dializada frente a PBS, inoculando dichas proteínas en tres dosis de 20 µg, los días 0, 21 y 63 del ensayo. Cada tres semanas, tras la primera inoculación, se tomaron muestras de sangre del plexo retro-orbital de los ratones.

Como se puede observar en la figura 3.2.17, los sueros de los ratones inoculados con la PRL25r, presentan una respuesta de anticuerpos apreciable frente a esta proteína (D.O. 0,38 +/- 0,05) a partir de la semana 9, alcanzando en la semana 12 valores de 1,24 +/- 0,04 de D.O., lo que supone un aumento de 24 veces frente al nivel de IgG para los ratones control (D.O. 0,051). Por otra parte, los ratones inmunizados con la PRL25a-r sola, muestran una ligera respuesta anti-PRL25a-r a partir de la semana 12, mucho menor que la proteína completa, con valores de D.O. 4 veces mayor (D.O. 0,26 +/- 0,06) que los ratones control. En la figura se puede observar como los ratones inmunizados con la PRL25c-r no generan anticuerpos detectables contra esta proteína

recombinante, siendo los niveles de IgG anti-RPL25c-r iguales a los de los ratones control.

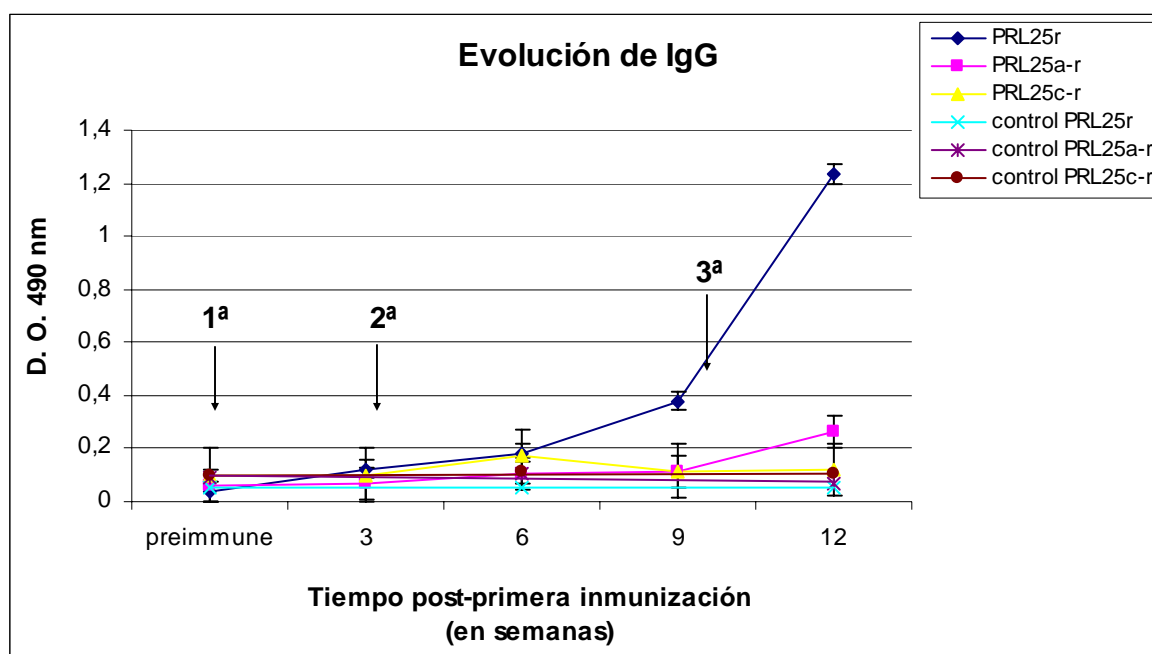


Figura 3.2.17: Análisis de la respuesta humoral inducida mediante la inoculación subcutánea de 20 µg de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r en ratones BALB/c. A partir de la primera dosis se realizaron sangrías cada tres semanas de todos los grupos establecidos, (apartado 2.31 materiales y métodos). Niveles de IgG anti-PRL25r (♦) detectados mediante ELISA en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25r. Niveles de IgG anti-PRL25a-r (■) en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25a-r. Niveles de IgG anti-PRL25c-r (▲) detectados en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25c-r. Niveles de IgG anti-PRL25r (×), de IgG anti-PRL25a-r (*) y de IgG anti-PRL25c-r (●) detectados en los sueros de los ratones control inmunizados con solución salina. La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preimmune. Las flechas indican el momento de cada una de las inmunizaciones.

Ante estos resultados se decidió analizar qué isotipos de inmunoglobulina G (IgG1 o IgG2a) era responsable de la elevación de la IgG generada contra la PRL25r y PRL25a-r. Los resultados se representan en las figuras 3.2.18 y 3.2.19, respectivamente.

Los resultados del análisis de los isotipos muestran que la PRL25r induce una respuesta tipo IgG1 a partir de la semana 9 al igual que ocurre con la IgG total, alcanzando un valor 4,5 veces mayor (D.O. 0,9 +/- 0,04) que el de los ratones control en la semana 12. El isotipo IgG2a no supera el doble del valor de los ratones control frente a dicha proteína.

Por otro lado, cuando analizamos la PRL25a-r no se aprecia variación del isotipo IgG1 con respecto al ratón control, sin embargo, para el isotipo IgG2a los sueros de los

ratones inmunizados con la PRL25a-r, presentan valores 4 veces mayor (D.O. 0,28 +/- 0,05) que el de los sueros de los ratones control.

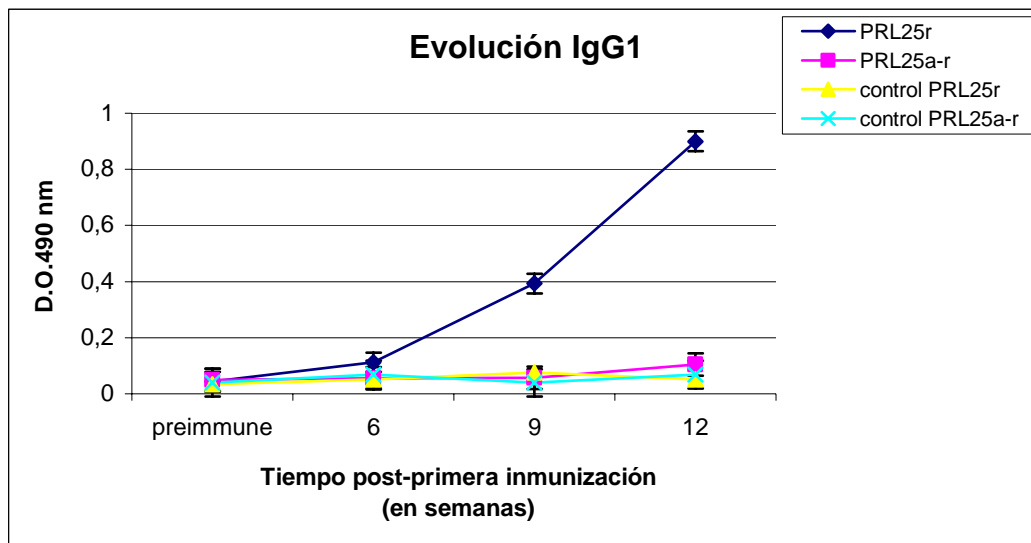


Figura 3.2.18: Análisis del isotipo de inmunoglobulina IgG1 inducido mediante la inoculación subcutánea de 20 µg de la PRL25r y de la PRL25a-r. Niveles de IgG1 anti-PRL25r (♦) en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25r. Niveles de IgG1 anti-PRL25a-r (■) en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25a-r. Niveles de IgG1 anti-PRL25r (▲) y de IgG1 anti-PRL25a-r (×) detectados en los sueros de los ratones control inmunizados con solución salina. La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preimmune.

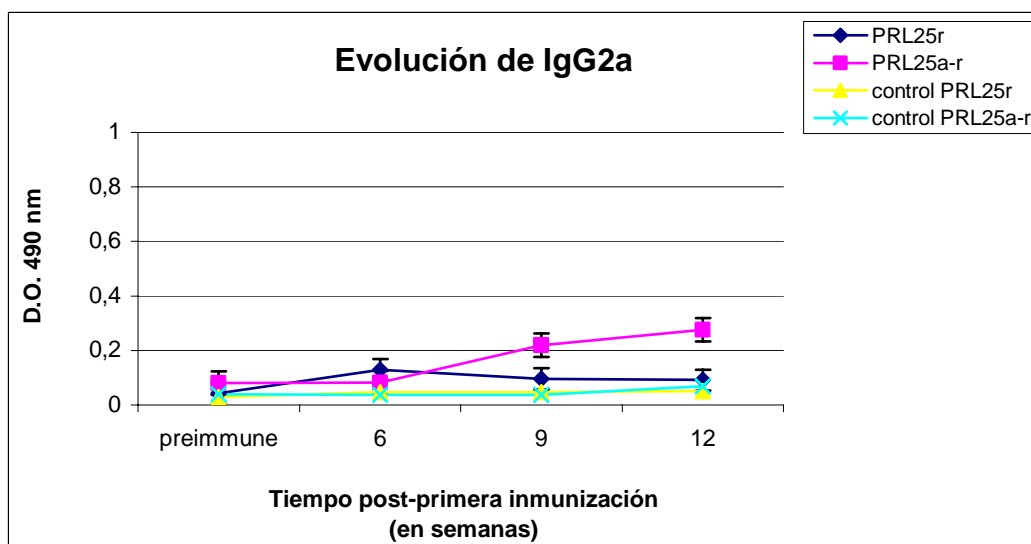


Figura 3.2.19: Análisis del isotipo de inmunoglobulina IgG2a inducido mediante la inoculación subcutánea de 20 µg de la PRL25r y de la PRL25a-r. Niveles de IgG2a anti-PRL25r (♦) detectados en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25r. Niveles de IgG2a anti-PRL25a-r (■) en los sueros de los ratones inmunizados con la PRL25a-r. Niveles de IgG2a anti-PRL25r (▲) y de IgG2a anti-PRL25a-r (×), detectados en los sueros de los ratones control inmunizados con solución salina. La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preimmune.

3.2.10. Proliferación de células esplénicas inducida por la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de *L. braziliensis* en ratones BALB/c.-

Cuatro semanas después de la segunda inmunización (semana 7), los ratones inmunizados fueron sacrificados y sus bazos fueron extraídos y homogeneizados como se describe en el apartado 2.29 de material y métodos. Con los esplenocitos obtenidos se realizaron *in vitro* los ensayos de linfoproliferación, enfrentando estas células a diferentes concentraciones de la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r. Como se puede observar en la figura 3.2.20, los esplenocitos de los ratones BALB/c inmunizados con la PRL25r, no respondían a dicha proteína a ninguna de las concentraciones proteicas probadas.

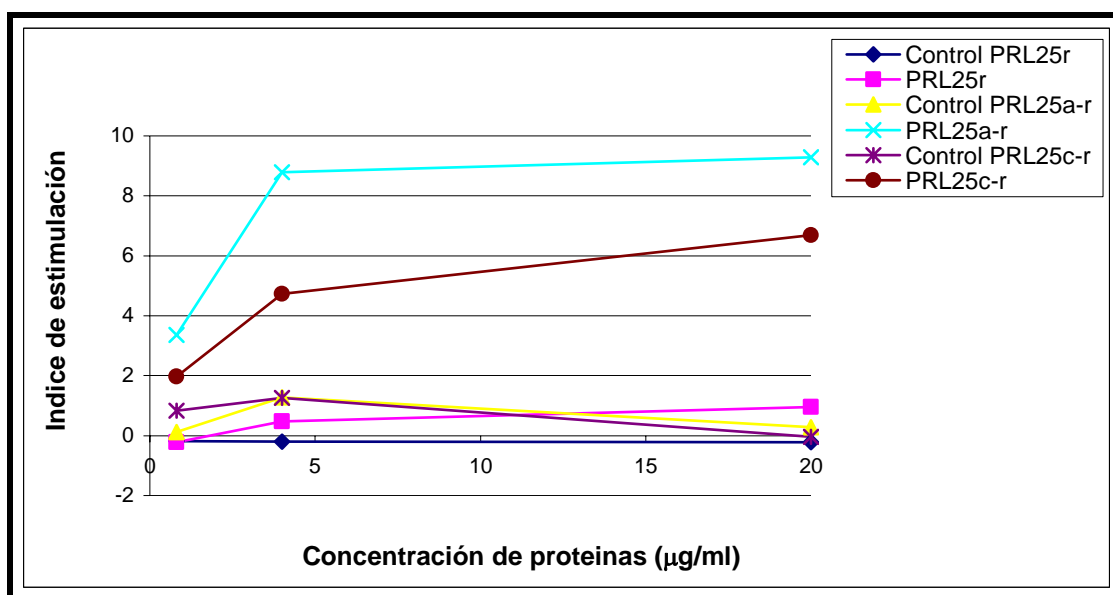


Figura 3.2.20: Proliferación de células esplénicas de ratones inoculados con la PRL25r, PRL25a-r y PRL25c-r de *Leishmania braziliensis*. Los esplenocitos (4×10^5 por pocillo) procedentes de los ratones inoculados con: solución salina (\blacklozenge , \blacktriangle , $*$), PRL25r (\blacksquare), PRL25a-r (\times) y PRL25c-r (\bullet), fueron aislados cuatro semanas después de la segunda inmunización y estimulados *in vitro* con distintas concentraciones (0.2, 4 y 20 $\mu\text{g/ml}$) de su correspondiente proteína recombinante. Tras el tercer día de incubación se añadió 0.5 $\mu\text{Ci/pocillo}$ de [metil- ^3H] timidina y las células se incubaron otras 6 horas a 37°C y posteriormente se midió el ^3H incorporado. Todas las muestras se procesaron por triplicado. El índice de estimulación se calculó como [media aritmética de las c.p.m. (cultivo estimulado) – media aritmética de las c.p.m. (cultivo control)] / media aritmética de las c.p.m. (cultivo control).

Cuando se enfrentó la PRL25a-r a los esplenocitos procedentes de los ratones inoculados con dicha proteína, éstos presentaron una estimulación significativa con respecto al control, con índices superiores a 8 tanto frente a 4 como a 20 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. La PRL25c-r consiguió inducir una respuesta linfoproliferativa, aunque menor

que el extremo amino terminal, al enfrentarla a los esplenocitos de los ratones inmunizados con esta proteína, alcanzándose índices de proliferación superiores a 4,5 cuando se empleó 4 µg/ml de proteína y de 6,7 al enfrentarlos a 20 µg/ml de proteína. Como era de esperar ninguna de las proteínas indujeron proliferación de las células esplénicas de los ratones control.

3.2.11. Protección generada con la PRL25r y la PRL25a-r en ratones BALB/c infectados con *Leishmania amazonensis*.-

Para poder conocer si la PRL25r y la PRL25a-r de *Leishmania braziliensis*, tienen capacidad de alterar la evolución de la leishmaniasis cutánea, se empleó un modelo de infección experimental, utilizando ratones de la cepa BALB/c, y *Leishmania amazonensis* como cepa de *Leishmania* infectiva.

Las inoculaciones se realizaron en tres dosis de 20 µg de la PRL25r o PRL25a-r, por vía subcutánea, y a intervalos de dos semanas. Dos semanas después de la última inoculación, se realizó el ensayo de infección, inoculando 10^5 promastigotes infectantes de *Leishmania amazonensis*, de la cepa MHOM/BR/77/LTB0016, en la pata trasera derecha de cada ratón BALB/c. A partir de la cuarta semana, tras la infección, se realizaron semanalmente las mediciones del tamaño de las lesiones.

En la figura 3.2.21, se muestra la evolución del tamaño de la pata para cada grupo de ratones. Los ratones infectados a los que se les había inoculado solución salina, presentaban un tamaño de lesión de 6,17 mm en la octava semana y de 8,4 en la semana 10. Los ratones inmunizados previamente con la PRL25r mostraron un tamaño medio de lesión de 5,27 mm en la semana 8 y de 7,13 mm en la décima semana, lo que supone una disminución del 15%, con respecto al tamaño de la lesión que desarrollan los ratones salinos infectados a lo largo de las 14 semanas.

Los ratones inmunizados con la PRL25a-r, mostraron una disminución del tamaño de la lesión, con respecto al control, a partir de la semana 7 presentando en la semana 8 un tamaño medio de las lesiones de 4,6 mm, y de 5,8 mm en la semana décima, lo que supone una disminución del tamaño de pata del 25% y del 31%, respectivamente, con respecto al tamaño presentado en los ratones control infectados no inmunizados. Como se puede observar los ratones salinos sin infectar mostraron un tamaño medio de pata de 2 mm durante todo el ensayo.

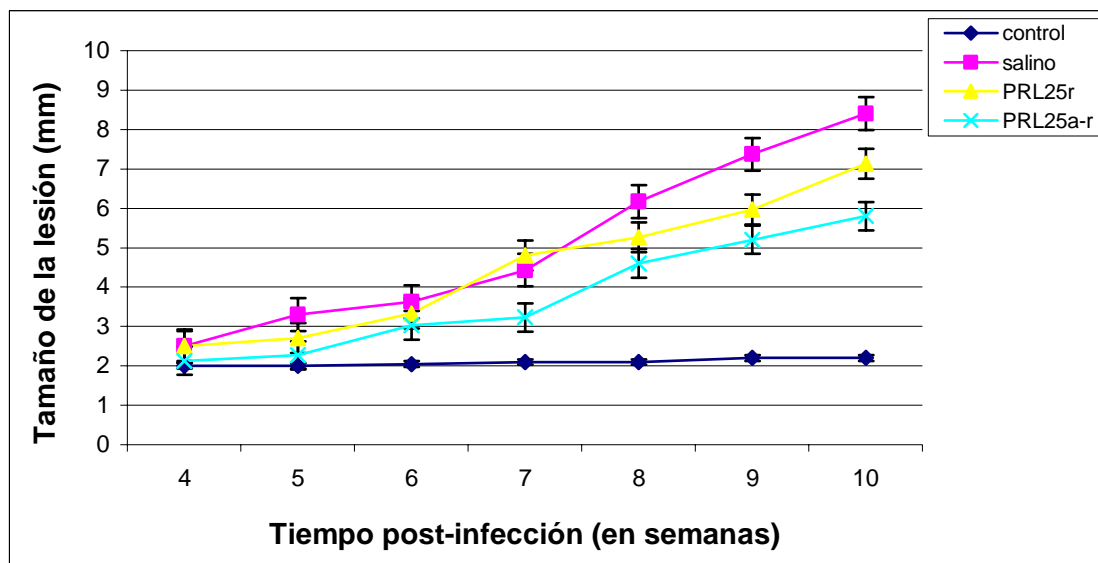


Figura 3.2.21: Niveles de protección generados con la PRL25r y PRL25a-r en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*. Ratones inoculados con solución salina sin infectar (♦), con solución salina (■), PRL25r (▲) y PRL25a-r (×), infectados con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis* dos semanas después de la tercera dosis. Cuatro semanas tras la infección se mide al tamaño de lesión de cada grupo de ratón. El tamaño de la lesión en cada semana se representa como la media de las lesiones de cada ratón por grupo.

3.2.12. Niveles de IgG frente a la PRL25r y a su extremo amino en ratones BALB/c antes y después de la infección.-

Con el fin de analizar como afecta la infección experimental a la respuesta humoral que generaban estas proteínas en los ratones, se tomaron muestras de sangre del plexo retro-orbital de cada ratón, 14 semanas después de la infección y se compararon con los valores de IgG obtenidos en el momento de la infección. Se midieron por ELISA los niveles de IgG y de cada isotipo de inmunoglobulina G (IgG1 e IgG2a) de los sueros de cada grupo de ratones, frente a la PRL25r y a la PRL25a-r.

Como se muestra en la figura 3.2.22, no se aprecia un aumento significativo del valor medio de los niveles de IgG anti-PRL25r 14 semanas después de la infección, obteniéndose valores de D.O. de 1,25 (+/- 0,4) en ambos casos. Cuando analizamos los sueros de los ratones no vacunados vemos que los valores de IgG anti-PRL25r aumentan tres veces en los ratones control tras la infección.

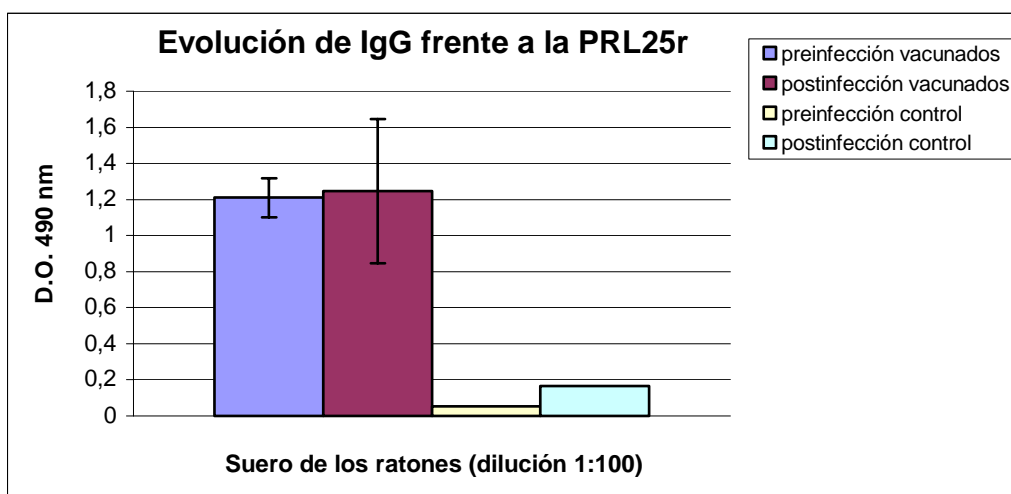


Figura 3.2.22: Análisis de la respuesta humoral mediante ELISA inducida en ratones BALB/c, antes y después de la infección con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis*. Niveles de IgG anti-PRL25r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con PRL25r antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). Niveles de IgG anti-PRL25r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

La evolución de los isotipos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a, antes y después de la infección con *L. amazonensis* en este grupo de ratones, se muestra en las figuras 3.2.23 y 3.2.24.

Los valores del isotipo IgG1 detectados en los sueros de los ratones frente a la PRL25r presenta un ligero aumento después de la infección (1,45 veces), con valores de D.O. de 1,1 (+/- 0,09) y 1,61 (+/- 0,08), antes y después respectivamente. Los niveles de IgG2a pasan de 0,11 D.O. antes de la infección a 0,05 D.O. después de la infección, lo cual supone una ligera disminución.

Cuando analizamos los niveles de IgG1 e IgG2a, (figuras 3.2.23 y 3.2.24) en los sueros de los ratones control no vacunados observamos que existe un aumento de ambas inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a de siete veces después de la infección, cuando se enfrenta a la PRL25r.

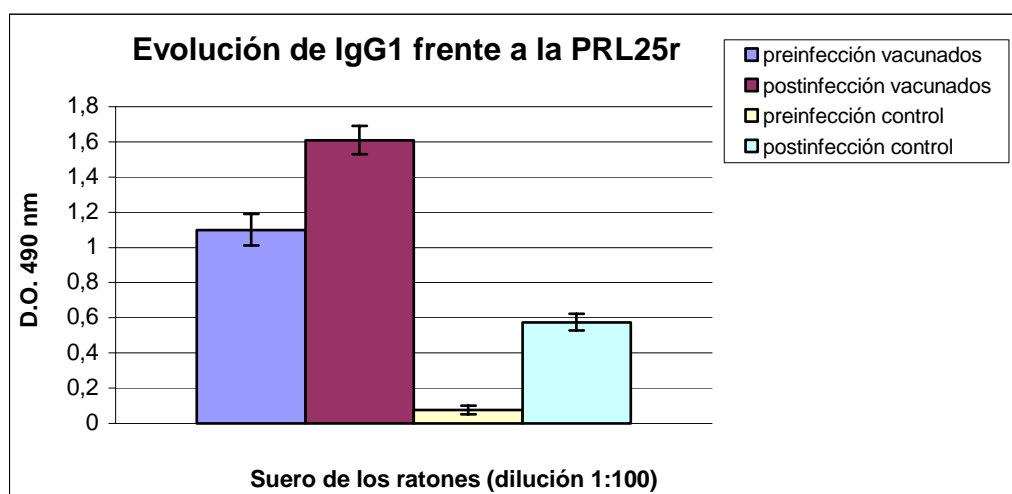


Figura 3.2.23: Análisis del isotipo de inmunoglobulina IgG1 mediante ELISA inducido mediante la inoculación subcutánea en ratones BALB/c, antes y después de la infección con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis*. Niveles de IgG1 anti-PRL25r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con PRL25r antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). Niveles de IgG1 anti-PRL25r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

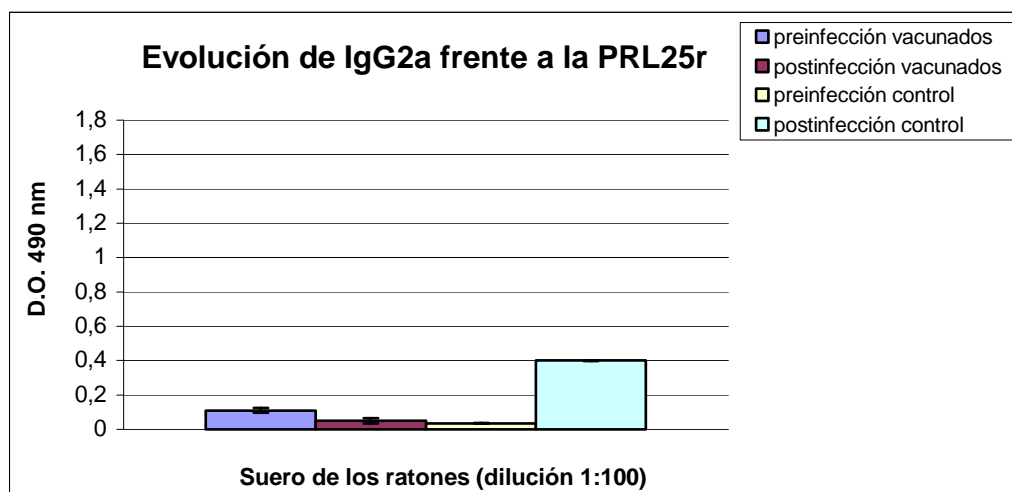


Figura 3.2.23: Análisis del isotipo de inmunoglobulina IgG2a mediante ELISA inducido mediante la inoculación subcutánea en ratones BALB/c, antes y después de la infección con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis*. Niveles de IgG2a anti-PRL25r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con PRL25r antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). Niveles de IgG2a anti-PRL25r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

La figura 3.2.25 muestra los valores de anticuerpos específicos contra la PRL25a-r en el grupo de los ratones BALB/c inmunizados con dicha proteína, antes y después de la infección con *L. amazonensis*. Como se puede observar, no se existen variaciones significativas de los niveles de IgG anti-PRL25a-r antes y después de la infección con *L. amazonensis*, dando valores de D.O. de 0,3 (+/- 0,06) y 0,27 (+/- 0,03), respectivamente. Cuando analizamos los niveles de IgG en los sueros de los ratones control, (figura 3.2.25), observamos que existe un aumento en los niveles de IgG de 3 veces tras la infección.

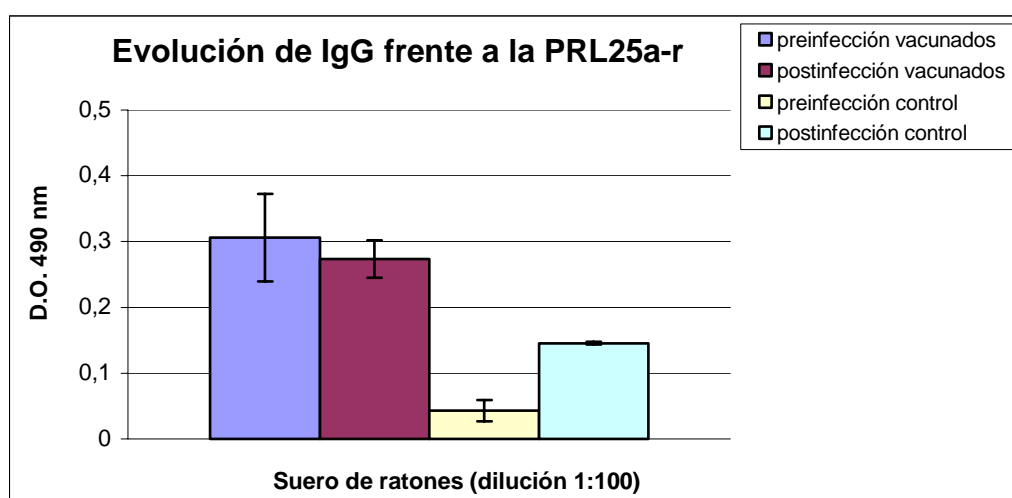


Figura 3.2.25: Análisis de la respuesta humoral mediante ELISA inducida en ratones BALB/c, antes y después de la infección con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis*. Niveles de IgG anti-PRL25a-r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con PRL25a-r antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). Niveles de IgG anti-PRL25a-r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

Las figuras 3.2.26 y 3.2.27 muestran los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-PRL25a-r, que presentaba cada grupo de ratón, antes y después de la infección con *L. amazonensis*.

Con respecto a los sueros procedentes de los ratones inmunizados con la PRL25a-r se observa que los valores de IgG1 anti-PRL25a-r después de la infección disminuyen la mitad tras la infección, presentando valores de D.O. de 0,28 antes (+/- 0,05) y de 0,13 después (+/- 0,03), (figura 3.2.26). El isotipo IgG2a de estos mismos ratones aumenta 1,2 veces después de la infección.

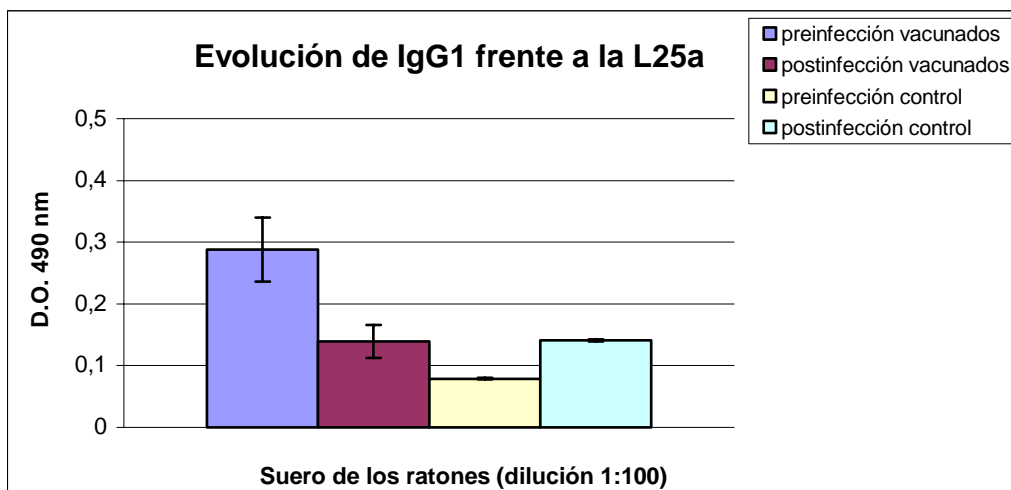


Figura 3.2.26: Análisis del isotipo de inmunoglobulina IgG1 inducido en ratones BALB/c, antes y después de la infección con 10^5 promastigotes de *L. amazonensis*. Niveles de IgG1 anti-PRL25a-r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con PRL25a-r antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). Niveles de IgG1 anti-PRL25a-r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

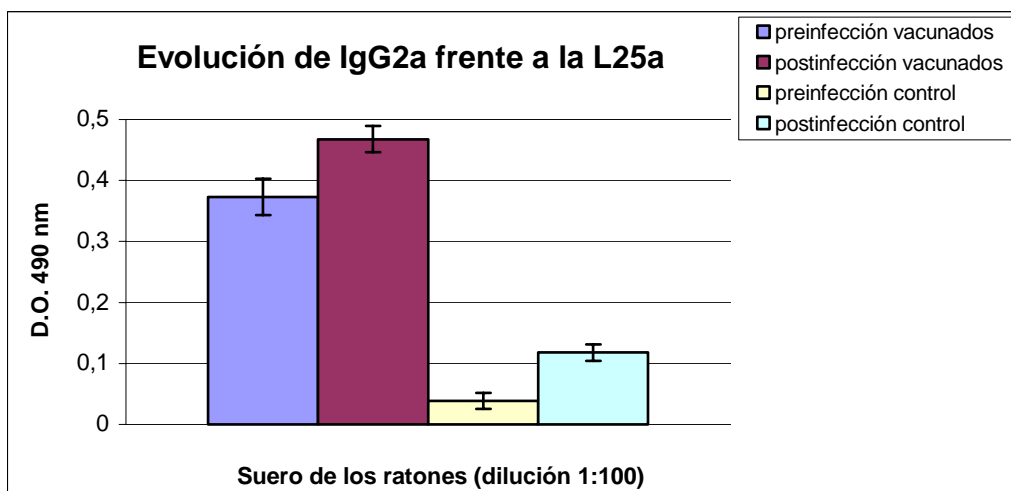


Figura 3.2.27: Análisis del isotipo de inmunoglobulina IgG2a inducido en ratones BALB/c, antes y después de la infección con 10^5 promastigotes/ml de *L. amazonensis*. Niveles de IgG2a anti-PRL25a-r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con PRL25a-r antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). Niveles de IgG2a anti-PRL25a-r detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina antes y después de la infección, respectivamente (■ y ■). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

Cuando analizamos los niveles de IgG1 e IgG2a en los sueros de los ratones control sin vacunar, (figuras 3.2.26b y 3.2.27b) observamos que existe un aumento de 1,5 veces del isotipo IgG1 y de 3,6 del IgG2a.

3.2.13. Discusión.-

En este trabajo se ha realizado la purificación de la PRL25r de *Leishmania braziliensis*, así como el clonaje, expresión y purificación de los fragmentos codificantes de su extremo amino y carboxilo terminal, en dos vectores de expresión procariotas diferentes, generándose los clones pQE-L25A y pCR-L25C. La utilización del protocolo descrito por Marañón C., *et. al.* 2000, nos permitió solubilizar y purificar las proteínas recombinantes bajo condiciones nativas evitando así la utilización de agentes desnaturalizantes.

La búsqueda de proteínas antigénicas con sensibilidad y especificidad, es la posible solución para el diagnóstico rápido de enfermedades causadas por especies del género *Leishmania* (Kar K. 1995; Jaffe C.L., *et. al.* 1988; Reed S.G., *et. al.* 1990). En la actualidad se han estudiado diferentes proteínas tales como las proteínas de choque térmico (Ang D., *et. al.* 1991; Young D.B. 1992; Zurita A.I., *et. al.* 2003), histonas (Soto M., *et. al.* 1995c; Carmelo E., *et. al.* 2002) o proteínas ribosomales ácidas (LiP2a, LiP2b, LiP0/LcP0) (Soto M., *et. al.* 1993; Soto M., *et. al.* 1995; Soto M., *et. al.* 1995b; Soto M., *et. al.* 1996; González A.C., *et. al.* 2002), que son proteínas que actúan como importantes antígenos durante la infección con *Leishmania*. La gran identidad que presentan con sus homólogas de otras especies, provocan la aparición de reacciones cruzadas con anticuerpos generados por otros agentes infecciosos (Enfermedad de Chagas) así como en procesos de autoinmunidad, (Lupus Eritematoso Sistémico). En el caso de las proteínas ribosomales ácidas P2a y P2b de *L. infantum*, el uso de las proteínas recombinantes correspondientes a la región menos conservada de estas proteínas, consigue eliminar las reacciones cruzadas y reconocer los sueros de pacientes con leishmaniasis humana, LMC y LV (Soto M., *et. al.* 1995b; Soto M., *et. al.* 1996).

En el caso de la PRL25r cuando se presenta como proteína recombinante completa es reconocida por todos los sueros, incluso los procedentes de individuos sanos, comprobándose que es el extremo carboxilo terminal el responsable de la inespecificidad. Sin embargo cuando se analizan los mismos sueros frente a su extremo amino terminal, se aprecia una importante diferencia en el reconocimiento de esta proteína por parte de los sueros de los pacientes y de los individuos sanos. Por lo tanto, el uso de regiones no conservadas dentro de proteínas conservadas aumenta la especificidad de la proteína y las hace útiles para el uso diagnóstico.

El péptido 23089 ha sido el que mayor reconocimiento a presentado, sin embargo, no se puede delimitar un epítipo concreto dentro de esta región. Si

comparamos el reconocimiento por parte de estos sueros, de las proteínas recombinantes y de los péptidos, los valores son mucho menores en el caso de los péptidos, característica que ya ha sido descrita por otros autores.

La capacidad inmunogénica de la PRL25r de *L. braziliensis* se pone de manifiesto en los ensayos de ELISA que se representan en las figuras 3.2.17, 3.2.18 y 3.2.19. Estos ensayos nos permiten concluir que la inoculación subcutánea de la PRL25r, en ausencia de adyuvante, es capaz de generar una respuesta humoral en ratones de la cepa BALB/c a partir de la segunda inoculación siendo máxima tras la tercera inmunización y que el isotipo de IgG generado es de tipo IgG1, el cual se mantiene después de la infección con *Leishmania amazonensis*. Por otra parte esta elevada respuesta humoral en ratones, genera una escasa proliferación de los esplenocitos procedentes de dichos ratones inmunizados con esta proteína. Un caso similar ocurre con las proteínas recombinantes TSA y LmST1 de *L. major* cuando son inoculadas en esta cepa de ratones vía subcutánea. Estas proteínas generan un aumento de los niveles de inmunoglobulinas de isotipo IgG1 pero no IgG2a y además, los esplenocitos no se estimulan cuando se les presentan estos antígenos (Campos-Neto A., *et. al.* 2001). Una posible explicación ante estos resultados podría ser que estos antígenos no son presentados en el bazo sino en ganglios linfáticos periféricos. El hecho de que exista reconocimiento de la PRL25r por parte de los sueros de los ratones infectados sin previa vacunación y que su respuesta no se polarice hacia el isotipo IgG1 sino que se obtiene una mezcla de ambas, indica la capacidad moduladora de esta proteína como vacuna aunque para este tipo de parasitosis sería de desear que la respuesta tendiese hacia la proliferación de linfocitos Th1. Con respecto a la evolución del tamaño de las lesiones en los ratones a los que se les ha inoculado esta proteína, lejos de generar una gran protección, si se observa una ligera disminución del tamaño de la lesión con respecto a los ratones no vacunados. Un efecto similar ocurre cuando se inoculan ratones de la cepa BALB/c con la proteína Leish-111f de *L. major*, en este caso la proteína genera una respuesta celular de tipo Th2 lo que indujo la síntesis de inmunoglobulinas del isotipo IgG1, ésto condujo a la escasa capacidad protectora que presentaba esta proteína después de la infección con *L. major* (Coler R.N., *et. al.* 2002).

Tomando estos datos podemos concluir que la PRL25r es inmunogénica en ratones BALB/c y además la respuesta celular la orientada hacia una respuesta de tipo Th2. Este resultado indica que la PRL25r de *L. braziliensis* es un inductor de la

respuesta humoral en ratones, aún cuando el grado de conservación entre esta proteína y su homóloga del ratón es del 67%.

En cuanto al extremo carboxilo terminal de la proteína ribosomal L25 (PRL25c-r) presenta una elevada capacidad de proliferación linfocitaria cuando se enfrenta a los esplenocitos procedentes de los ratones inmunizados con dicha proteína, aunque no genera aumento de la inmunoglobulina IgG específica, sin embargo, tanto los sueros de los individuos sanos como los leishmaniásicos son capaces de reconocerla. Esto nos hace pensar que estos anticuerpos son debidos a proteínas de otras especies y no a la PRL25c-r de *L. braziliensis*. Por otra parte, no se analizó su capacidad protectora debido a la identidad que presenta su secuencia de aminoácidos con las PRL25 de los potenciales hospedadores de *L. braziliensis*.

El extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25 (PRL25a-r), es la región menos conservada evolutivamente entre las PRL25 descritas de eucariotas. Cuando se inocula de forma subcutánea sin adyuvante, presenta gran capacidad de proliferación linfocitaria al enfrentarla a los esplenocitos de los ratones inmunizados con dicha proteína. Sin embargo, sólo induce una ligera respuesta humoral que se polariza hacia la formación de inmunoglobulinas del isotipo IgG2a, isotipo que se mantiene tras la infección con *L. amazonensis* en los ratones vacunados. Estos mismos ratones presentaron una disminución del tamaño de lesión del 31% con respecto al tamaño que presentaban por los ratones sin vacunar.

Se acepta que una proteína genera inmunidad protectora frente a *Leishmania* si es capaz de inducir una respuesta de tipo Th1 y evitar la activación de la respuesta tipo Th2 (Sjölander A., *et. al.* 1998). Este es el caso de los antígenos gp63, gp46/M2 y PSA-2 de *L. major*, LiP2a de *L. infantum* o el factor de iniciación LeIF de *L. braziliensis* que protegen a estos ratones de la leishmaniasis (Handman E., *et. al.* 1995, Soto M., *et. al.* 2000, Skeiky Y. A. W., *et. al.* 1998). La ligera protección generada por la proteína L25a, similar a la obtenida por Solioz *et. al.* con la H1 de *L. major* (1,6 mm de reducción en el tamaño de la lesión con respecto a los ratones control) (Solioz N., *et. al.* 2000), puede deberse a la capacidad que presenta esta proteína de polarizar la respuesta inmune hacia el tipo Th1.

Por lo tanto, podemos considerar que la PRL25a-r, podría ser un fragmento útil para formar parte de un multiantígeno capaz de inducir protección.

3.3. PROTEÍNA HELICASA

3.3.1. Obtención de las secuencias contiguas al gen que codifica a la proteína ribosomal L14 de *Leishmania braziliensis*.-

Debido al hecho de que los genes de las proteínas ribosomales se organizan en operones en la mayoría de los organismos, quisimos investigar si en el caso de *Leishmania braziliensis* ocurría de la misma manera, por lo que analizamos la secuencia de nucleótidos contiguos al gen que codifica la proteína ribosomal L14. Para ello se digirió el ADN del fago λ -L14 con diferentes enzimas de restricción, previamente purificado como se describe en el apartado 2.6.2 de materiales y métodos (González A.C., *et. al.* En prensa). Se eligió la enzima SacI por que con ella se obtuvieron fragmentos con tamaños adecuados para poder ser clonados en vectores procariotas. La figura 3.3.1 muestra los cuatro fragmentos de 6Kb, 4Kb, 2Kb y 1Kb, que se logran tras digerir con esta enzima SacI.

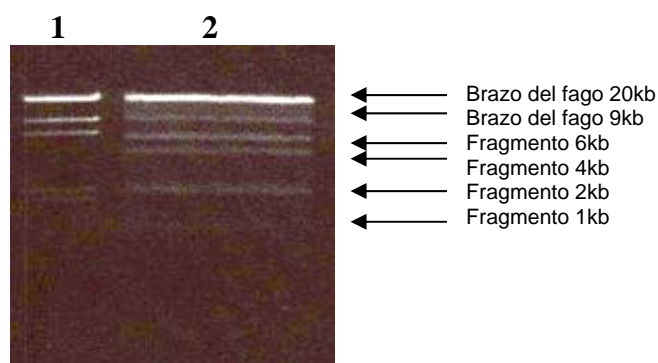


Figura 3.3.1: Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualiza la digestión del clon fago λ -L14 con la enzima de restricción SacI.

Columna 1: Marcador de peso molecular fago λ cortado con Hind III.

Columna 2: Fago λ -L14 digerido con SacI. Brazo mayor del fago de 20kb, brazo menor del fago de 9Kb, fragmentos de 6kb, 4kb, 2kb y 1kb.

Una vez purificado cada fragmento, se realizó el clonaje en el vector pUC18 digerido con la misma enzima y desfosforilado con fosfatasa alcalina. Se obtuvieron varios clones, para cada fragmento, que se confirmaron por la digestión con la enzima SacI, y se denominaron p18Sc1(a,b,c), p18Sc2 (a, b), p18Sc4 (a,b) y p18Sc6 (a, b), (figuras 3.3.2a y 3.3.2b).

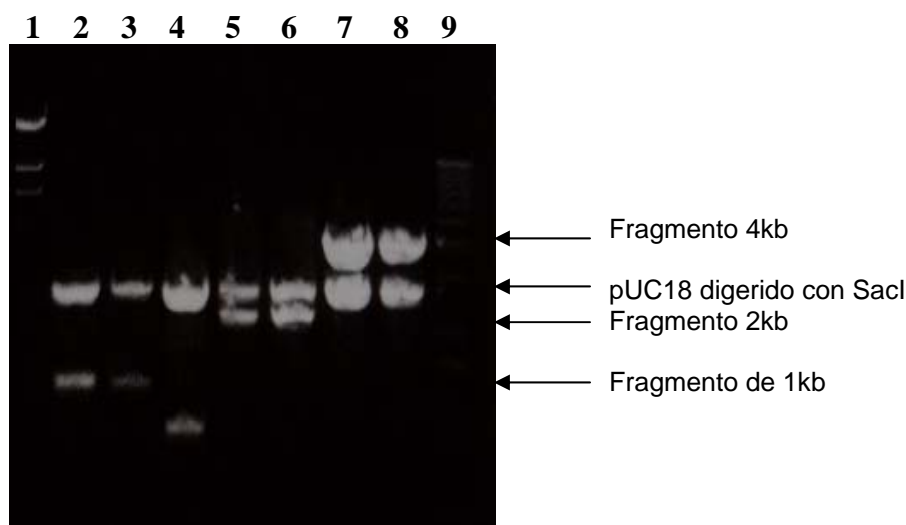


Figura 3.3.2a: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Columna 1: Marcador de peso molecular fago λ digerido con Hind III.
Columnas 2-4: Digestión de los clones p18Sc1a, b y c, respectivamente con SacI.
Columnas 5-6: Digestión de los clones p18Sc2a y b, respectivamente con Sac I.
Columnas 7-8: Digestión de los clones p18Sc4a y b, respectivamente con Sac I.
Columna 9: Marcador XI.

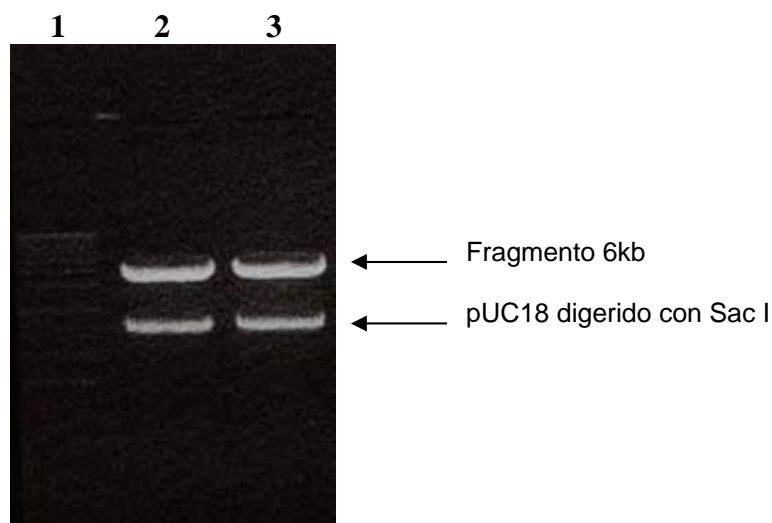


Figura 3.3.2b: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Columna 1: Marcador IX.
Columnas 2-3: Digestión de los clones p18Sc6a y b, respectivamente con SacI.

Las secuencias de los primeros 400 nucleótidos de los extremos de cada uno de los clones, empleando los cebadores pUC/M13 forward y pUC/M13 reverse, se analizaron por medio del programa FASTA y los datos proporcionados demostraron que los clones p18Sc1 y p18Sc6 contenían un inserto homólogo a los genes de la familia de proteínas DEAD/DEAH-box helicasas. Se observó que el inserto del clon p18Sc1 tiene

un 54% de identidad con la secuencia de nucleótidos del gen de *Mus musculus* que codifica la proteína HELG. De igual forma la secuencia obtenida del extremo amino del inserto del clon p18Sc6 presenta un 50% de identidad con la secuencia descrita para una DEIH-box ARN/ADN helicasa de *Arabidopsis thaliana*.

En las figuras 3.3.3a y 3.3.3b se muestran los FASTAS obtenidos con los clones p18Sc1 y p18Sc6, respectivamente.

Secuencias que producen un alineamiento significativo:	Puntuación (trozos)	Valor E
tr AB047557 Q99PU8 C6157413C98A1200 (DHX30..)HELG.[Mus musculus]	87	7e-17
tr BC004082 Q99KN7 78E44861183F49E8 (DHX30)Similar to KIAA0890 p...	87	7e-17
tr BC016202 Q91WA7 2DB769E729F6D469 (DHX30)Hypothetical protein....	87	7e-17
tr BC015029 AAH15029 D3417B4C609F6360 DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box...	87	7e-17
tr AP002541 Q94JI9 673D784AEC752A08 (P0494A10.16)Putative ATP-de...	76	1e-13
tr AF283512 Q8NG17 F00A43BAC474FA72 Putative DEAH-box RNA/DNA he...	75	2e-13
tr BC053623 AAH53623 8994FFE47F14D738 (DHX57)DHX57 protein (Frag...	75	2e-13
tr AC006200 Q9ZU53 99EA1884230744FE (AT2G01130)Putative RNA heli...	74	3e-13
pir A84420 A84421 9C10413C43A8DB69 probable ATP-dependent RNA he...	74	3e-13
tr AL023290 O60114 2D7E3942B2A7B310 (SPBC15C4.05)Putative ATP-de...	72	2e-12
tr AB040921 Q9P240 FB7B297BB7883D79 (KIAA1488)Hypothetical prote...	71	3e-12
tr AC073555 Q9C734 917600648F95A9C4 (F11I4_16)Hypothetical prote...	71	3e-12
tr AF217190 Q9H2U1 6368B27AB4040239 (MLE1)MLEL1 protein.[Homo sa...	71	3e-12
tr BC036035 Q8IYE5 18B2899CEFF61628 Similar to DEAD/H (Asp-Glu-A...	71	3e-12

Figura 3.3.3a: Fasta del extremo carboxilo del clon p18Sc1

Secuencias que producen un alineamiento significativo:	Puntuación (trozos)	Valor E
tr D84225 Q9SMG9 35E4092B358660C4 DEIH-box RNA/DNA helicase.[Ara...	96	8e-20
tr AP003377 Q8LIX3 DDD77EE237CD4327 (OSJNBB0053G03.15)Putative D...	94	3e-19
tr U10245 Q38800 26A2255F64D72163 Col-O putative RNA helicase A...	93	7e-19
tr AC002340 Q8RYE1 2087F706D4DD45A1 (AT2G30800)Putative RNA heli...	93	7e-19
tr AB047557 Q99PU8 C6157413C98A1200 (DHX30..)HELG.[Mus musculus]	90	6e-18
tr BC004082 Q99KN7 78E44861183F49E8 (DHX30)Similar to KIAA0890 p...	90	6e-18
tr BC016202 Q91WA7 2DB769E729F6D469 (DHX30)Hypothetical protein....	90	6e-18
tr BC015029 AAH15029 D3417B4C609F6360 DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box...	90	6e-18
tr AB005245 Q9FF84 0644650B136EB1A0 ATP-dependent RNA helicase A...	90	7e-18
tr BC036035 Q8IYE5 18B2899CEFF61628 Similar to DEAD/H (Asp-Glu-A...	84	4e-16
tr AB040921 Q9P240 FB7B297BB7883D79 (KIAA1488)Hypothetical prote...	84	5e-16
tr AE001228 O83538 B0209A1C981BCD92 (TP0526)ATP-dependent helica...	84	5e-16
tr AF217190 Q9H2U1 6368B27AB4040239 (MLE1)MLEL1 protein.[Homo sa...	84	5e-16
tr AC007017 Q9SJ58 E98950DBD25B70B4 (AT2G35920)Putative ATP-depe...	82	2e-15
tr AK013031 Q9CSE8 AF623AB64B44ED63 (DHX36..)2810407E23Rik prote...	81	3e-15
tr AF448804 Q8VHK9 4DD3298011B8155A (DHX36..)DEAD/H box polypept...	81	3e-15

Figura 3.3.3b: Fasta del extremo amino del clon p18Sc6

3.3.2. Secuenciación completa de los clones p18Sc1 y p18Sc6.-

Ante la imposibilidad de solapar las secuencias obtenidas empleando los cebadores universales pUC/M13 forward y pUC/M13 reverse, se diseñaron cebadores internos a partir de los fragmentos ya secuenciados (señaladas con fondo gris oscuro en la figura 3.3.4). Con las nuevas secuencias obtenidas, empleando como molde el fagoλ-

L14, se pudo enlazar los extremos amino y carboxilo, y se consiguió la secuencia nucleotídica completa del fragmento, (figura 3.3.4).

```
TCAGGTTTTTAATAAAGCTCCGGAACSTTCTAAAAAAAAAAAAAGAGATTCAACAAGAA
ACCTCGGTCTTTTACTCTTTATACATTTTTTGCATTTTCCCCTCCAAGTAATTTT
TTTTTTTACGATGCACCCCGSTCAAAATTACAGGGACGGTGGCGCTCCAACAACAACA
ATAACAACAACCCAAATACCAACCGACAGGGTTCAAGCTCCGCCAAACAATCCACCTCC
CGCAGAGCCCTTTGACGCACACGGGGTTCCCGGTTGAGCAAGGGCAAGGCAGAGGCCAA
CACCUCGGAAAGGACCGCCGGGAAGGAAATGGGGCAATTTTCTATGCAACAGGT
CCCTCTCCGGCCTCCACGCACTCCCCGTCACCGAGCTCCGGCAACGATAATCGTTC
TAATGTTGACAAACAGCAGCTCAGCACGTGGCGAGGAAAGACTTTCAGCAGCTGGTGA
AAGCCTTCGTCCAGAACCAAACCTCCAGCGAGCTCTCCTTTCCCTCCACGCTTACACCT
GCTCAGCGAACACCGTTCCACGCATCGCTATGGCTTTTAACCTGGACCACAGGTCAAG
TGGTGTAGGCACCGACCGCAGCTCAAACTGATCAAAATCGGCGCCGCCATCGATGCTC
TCAACCSCCAACGACATGCCCGCCGATGGTCTTCCGATCAAGTCTATCGACCGCTAC
CAAGGTGCACAAGAACTGCAGCACAATCACCTTTCTCCCGAGGATTTTTGTGGCGCTGCA
CCAGGCCTTCAASCCSCACAAAAGCAGCATGACCAAGGAGATTAAAGCTCATTGCAAGCS
GTCCGCCAGCGGAAACGAGGCGTTTCCGACTAGCACAGTCTGGCCTTCCCTCAGCTCCG
AAGCCGCTCAGAGCAACGCGCGCAACGAATTGCAAAAGTTCCGTGCTTCCCTTCCCTCC
GTATCGCCACGSCCCGGATATCATCGAGCCGTCAGACCAACGATGTCATCGTGGTGT
CCGGCACACGGGGTCCGGCAAAACAACGCAGATCCCACAGCTACTGTTGACTCTGGC
ATTTTCAACAAAAAGACGATATCATTTGCACCCASCCCGCGCTATCAGCGCCTTTT
GGTAGCCACCGTGTCCGACGGAGCGGGGCAATCCTCCGTCACAGCTCCGGCTACA
TTATCCGGTTCAGAACATGACAAACCCCAATACCGGATTGTCTACCAAGCCACCGGC
ATCCTGCTGCGCGTCTTCATACTGAGCCGGATCTSCAGGGCCTTGCCTSCATCATCGT
GGATCAASTGCATGAGCGCATGTGAGACGGACTTCTGCCTGCTGCTCCTCCGCGACC
GTCTGCGCGCAGGCTGAGCACCCCSAAAAGTTCAAACCTCAAGCTGAAAGCTTGTGGTCC
ATGTCGSCCACAATCCAAATTBACACCTCACTTCTACTTCCAGGGGTACAACAACCGG
CCGCTCCATCCCCCTCATCTCGAATTCCTGGAACTCTTTTTTCCGATAAAAGAGTTTTTCC
TCAAAGGGGTGCTCCATAAAAGTGGGGGCGCCGCTTCCGCGCGCCTCCGATGGGCTC
GTTGCAAGCAAGGAGCAGAAAGCAAGCGGGCCGCCAGCGCAAGCAGCGAGGGGAA
TCCGCGCTGTACGACAGTTGAAAGACTTCTGTCTTTGACACGTTCCAGCGTATGTTG
AGGCCCTTGTTCATACGACCTTCTGTCAAGCTGATCCTCAAGATCCACGAGGATTCG
CGCTCGCTCCGAGAGCATCTTAGTCTTCTGCGGGCTGGGCGGCTATCGCGAACAT
```

TCGGGCTTCTGAAAGCCTCACCGCCGCGCGAGCTCTCCATTCTAATGTTGCATT
CCAGTCTGACGACGAGCAGCAAGAGTCTTTGTCAAGCCCGCGGACACTTCCGC
AAGGTTGTTCTTCCACCGGCATCCCGAGGCGACATCACCATCAATGACATTGTCTA
GTCATCGACAGCGGGCTTGTGAAAAGCACGTCTGTACGACCCGACCGGGAACACAAGCG
CCTCAAGGCGACGCTGATCCGAAAGCGAATGCCGTGCASCGCCSAGGACGCGCAGGG
GTTTTGACCCGGCGTGTCTACCACCTTCTACCCAAAGCGCCCTAGGATGCGCTGCC
GGACTTTCTCCACCAGAGATTGTGCGGTCCCTTTAGAAAGGTTGTCCCTACAGCTGA
AGGCCATCGAGTCCGAAAGACAAGTCTCCAAGGTCCTCGCGCGGCAATGAGTCTCCA
CCCGAGGACGCGATTGAGCACCCGTCAGTTTTTACGGATATGGGCGCCTTCACGGC
GGCGATGAGATATGACGAACCTTGGCCGAGCTCTGGCCSAGCTACCAACGCATCCTC
TGCTTGGCAAAGATGCTGTTACCGCCCGGTGCTTTGGTGTCTTTCACACTGTGGCGACA
ATTGCGCCCGGCTGTCCGTAAAGTGGCGTTTATTGTCGTCCGCAAATGTTTGAAGAAGAA
CGCATCACGGGAGAAATCTCATCCGCATCCATCAGGGCCTCCTCTCGGATCACTTCTCC
TCCTCACCTTGTTTACTGAAATGGGTGAAAAATGGGCGTAGCTTTTCAGTACCGCTCGTC
CACTTCGCGACGTACGACGCTGCGCTCATGGACGGACGAAAGCGGCASTTCAATCT
GGTCTCGGTCATTTTTGCAAGGCGTTGATGCCCGACACGCACTTGTCCGGTAC
GCGCCAACAAAGGGCTGGTGCCTTGTCTGTTCTGGTCTCTTACCCGCGCATTGCC
AGCATTGAGTACCGCGCAACCGAGACACTCAGAACCCCGAGCTCTTCTGCTGGACAA
CAAGTCCCGCGCTTCTCGGCGAACTGCGTCTTTCCTCTATAAGCGCCCGCACTTTG
GGGCAAATAGCTTTGTCACTACTACGACCSCATGAATCTCGAGGCCGTGCTGACGCTC
TTTGACGGAAACCSCGCTCTGCCCCATCGATGTCTGCTGTGCTTSCCTGCGCCACGTCACGGT
TCGCCCCCTTCCGGATGTTCCCGAGCTTTTCTCACCGACACCGAAAGCAAGCTGGCGC
CTCCCCTTACATGACGTTGATAACCTGCCGACAAGCAAACTACTCTGCCATGTTT
TTGAGGGGACAAAGATTGTACATCGCACCCAAAGAGCTCGCCTCGCTTCTCCACAC
CGCGCTGACCGCCTCGACTTCTTCTCGCCACATGCATTAAAAATGTGCGCTCGAACC
GCTTTCCGACCGCTGATCAAGCTGCTCGCGCAGATGTCGGGTACCGGCATGACCGCC
GTGAGCGACCAACGCAACCTGCACAGGAGGCACTCCACATGGACCCCGCCATCTTGCA
GGGATTCCGGCGGCTGGCTTCTTCCCGGCTTCCGCGCTCGCCCCGGGCCGGACGGAA
TAAGTCTGATGACGACTCCGACAGCGATGTCCGCTGCTCGATGAGGAGCTGACGAGC
CCTTGACCGGCTGACAGATGGCCAAGAGCAAACGTGACTGCCGCTTACGGAAATTTGG
CTGTCTTTGAAACGACGGCGCAGAAAGAAATGTTGACGCGCGCCAAATCCGCGGAGAAAT
CAAGCACCGCCCGCGACGCTGAGGTTGAACCTCASTGCAGGGAGGAGGGGGCGCTGC
TGCCGCTGCGCCGCAAGTTCCGGATTGGGGCAAAAGCTGACGCTGCAAAGAGACTGCGT
TGAGCCGCGTCTCCCGACAAGAGGGAGCGAGTAAGACAGGAAAGCGACGATCATGACG

AGGATGTTGATTGTAGGAAACCTCAACCTTCATACCATGTAGTCCCTCATTTCATGTTA
 TTGCTTATTATTTTTTTCTTTTTTTTAAATGTTGTTTCGAGAGTCGTGASACTCGTTGT
 CTTCCACGCTAGATGTGTATCTAATTGGTGGTCCCGAGATGCACCTCTTTTTTTTCTC
 TTCTCTGACGGAGTATGGCATGCTTATGTGAGTGCCTGTGTATGTGTATGAGCATGCGC
 CCSTGCATCTGTCTCCTGCTACGAGTSCAGATTGCACACATCACACTTCGACACCGCA
 TTGGGGGAAAAAAAAAAAAACACAGGGAAAAGGAGTGCATAAAAAATGCCACAGAAAA
 AAAATGTGATTGTCAAAGAAAAGCCGAGAAACGCACTTTTTTTTGGCTGTGTAAAGTGTATA
 GTGCCCSCTATCGCCAGCCTTGGGGCAGGCCAACCGGCATTACAAAGTCACCAACGCACA
 CACACAGCAAAAAGCGATTGCAACTGGCGTGTATCCCTTGCCTTTAAGCTGAAATACTCC
 TTACGAACTCTTGACGCTGCTCTCCTGCAATTGATCAGCGCTCCTTTTTGCTTTTCAGCC
 GCGGCAAGGGGACAACCTGTGCTCATCTACAGACCCTCCATGACACGGGCGATCCCTCTC
 TCCTGTTGCTCTTCTCTTTGGTGACTTCTTTGAAACAGTCTTTTTTTTTTCTTTTCCCAT
 TTCAATGTTGTAAGCCCTTGCCTTTTCCGCTAGATTATCCCCCTACAAAAAAAAAATCACT
 TTTAAGGCACAGTTTCTAAACAAGTCTCTCCTACAAAGAACCAGCATCTTGTGCGGGAC
 CTTTGAAGCAATATGCTGTGTCTGCAGAAAGATAACCTTTATCGACCGGGCAGAGCGGAA
 CCCTGTGGACCTACAACCTCAAGAAAGCAGTGGAGCTACGGCGACTTTTCATCGGCGCGGT
 GTGCACGAGCGCCAGTGCAGCG

Figura 3.3.4: Secuencia de nucleótidos obtenida a partir del clon fago λ -L14 con cebadores internos específicos. Las secuencias de los cebadores internos específicos están señaladas en gris.

Debido a que esta secuencia se obtuvo a partir de una genoteca genómica, se realizaron las tres posibles traducciones de la secuencia y se estableció el origen de transcripción a partir de la primera metionina que se encontraba en pauta con la región conservada de la secuencia y de la misma manera, se propuso el final de la transcripción, en el primer codón de parada posterior a la secuencia conservada. En la figura 3.3.5 se muestra la secuencia de aminoácidos propuesta.

SGF##GSGTF#KKKRRVQQERRCFHYSLYIFCIFI PCK#FFFLRCTPVKITGDGGAPTTT
 ITTTQIPADRVEAAPNNAPAAEPFDAHGVRREFEKGRQRPTPRKRTRRERKRWGQFSYAAG
 ASPASQQSPVQRAAGNDNRSNVDKHDVSTWRRKDFHELKAFVENQASSELSFPSTLTP
 AQRNTVHRIA^MAFNLDHRSSGVGSDRTLKLMKIGGAI DALNRQRDAAADGVRIKSIDGY
 QGAQELQHSHLSPEDFVALEQALKPHKSSMTKEIKLIASGPPAETRRFRLRQSGLPSAP
 KPAQSNARNELQKFRASLPAYRHGPDII EAVKTNDVIIVCGDTGCGKTTQIPQLLFDSDG
 IFNKKDDIICTQPRRISALSVAQRVATERGESCGDSCGYIIRFENMTSPSTRIVYQTTG
 ILLRRLHTEPDLQGVACIIVDEVHERDVETDFCLLLLRDLRAQA EHPERFKLKLKLVV
 MSATVQIETLTSYFEGYNSGRSIP LISIPGTLFPVKEFFLEGVLQKVGAPASAAPAMGL
 VAKQKEQKQAGRPAEAAEGNAALYEQLKTSVFDTFDRDVEALVPYDLVCKLILKIHEDS
 RSRAESILVFLPGWAAIANIAGLLKRSPAARELSILMLHSSLTTTEQQRVFRP RHRFR
 KVVLATGIAEASITINDIVYVIDSGLVKGTSYDPTANTSALKATLIAKANGVQRRGRAG
 RLQPGVCYHLLPKAAYDALPDFLPPEIVRSPLEEVCLQLKAI ESKEKCSKVLARAMSAP
 PEDIAEHAVQFLTDMGAFTAGDESMTNLGRALAE LPTHPLLGKMLFTAACFGVLDTVAT
 IAAGLSVKSPFIRPQMF EKNASRENLMRIDQGVLS DHFCLVTLFTEWVKSGRSFYASS
 HFADVTTLRSMERTKRQFNLVLGHLLRRALMPGAALVAVRANKGLVRLVLFWSLYPRIA
 SIEYRANRDTQNPQVFCWDNKSAAFSANCVLASYKRRDFGANSFVTTYDRMNLEAVLTL
 FDGTAVSPIDVLLCLRHVTVRPLPDVPELFLTDTESKLAPPAYMDVDSLDPKENYSAMF
 FDGDKKLYIAPKKLASVLHTARDRLDFFLATCIKNVRSNRF PDALIKVLAQIVGYPI TG
 VDAPTQPAQEALHMDPAILQGI PAGGFLPGFARRPGPDGISLMTTPTAMCRCSMRTLTT
 PCSG&QARRQT&LPPT EFGCLSKRRRRRIVARRQIRRE&STARRR&G&TSVQGGGGRC
 CRCAAGCGIGAKADAARDCEVPRAAEKREEVEEESDDDDDEDVIVGNLNLHTM@SLISML
 LLIIFFFFNVS RVRLVVFHARC VSNWWCRRCTSF FSLL&RSMACLCECLCMMSMR
 ACICLLLRVQIAHITLRHRSWGKKKHTGKRQC IKMPQKKNVIVKKA EKRTFFAV#RV@
 VPAIASLGAGQPALEVTNAHTQOKRLQLAWYPLL#AEILLTNS&RCSPAIDQRSFCFSA
 AARRQPVLIIYRPSMTRASLSPVALLFGDFE QCFFLLPFQCKALLFR@IIP LQKKIT
 FNAQFLNKSLLRQRTTILSGTVEQYAVSAKDNVYRPGRAEALWTYNLKKQWSYGEFDRAR
 VHERQ&A

Figura 3.3.5: Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura anterior. En verde se señala el primer codón de iniciación (ATG) de la posible proteína helicasa de *L. braziliensis* y en rojo se presentan los codones de parada.

Una vez establecida la pauta de lectura, se diseñó una pareja de cebadores denominados Hel-a y Hel-b, que nos permitió amplificar la región codificante completa, empleando como molde el fago λ -L14. El fragmento amplificado, mostrado en la figura 3.3.6, presentó un tamaño de 3000 pb, éste se purificó y se clonó en el vector pGEM-T, obteniéndose un gran número de colonias. Tras seleccionar 10 colonias al azar, se analizaron mediante PCR colonia, como se describe en el apartado 2.16.3 de materiales y métodos, dando como resultado el clonaje del fragmento completo en todas ellas, (figura 3.3.7). A continuación, se eligió uno de los plásmidos recombinantes y se confirmó por secuenciación que el inserto coincidía con la secuencia de nucleótidos esperada, y se le denominó pGHLb.

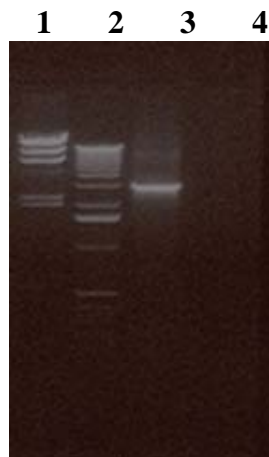


Figura 3.3.6: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto amplificado por PCR.

Columna 1: Marcador de peso molecular II (Roche).

Columna 2: Marcador de peso molecular X (Roche).

Columna 3: Fragmento obtenido por PCR a partir de 100 ng del ADN fago λ -L14, con los cebadores Hel-a y Hel-b.

Columna 4: Control negativo de PCR.

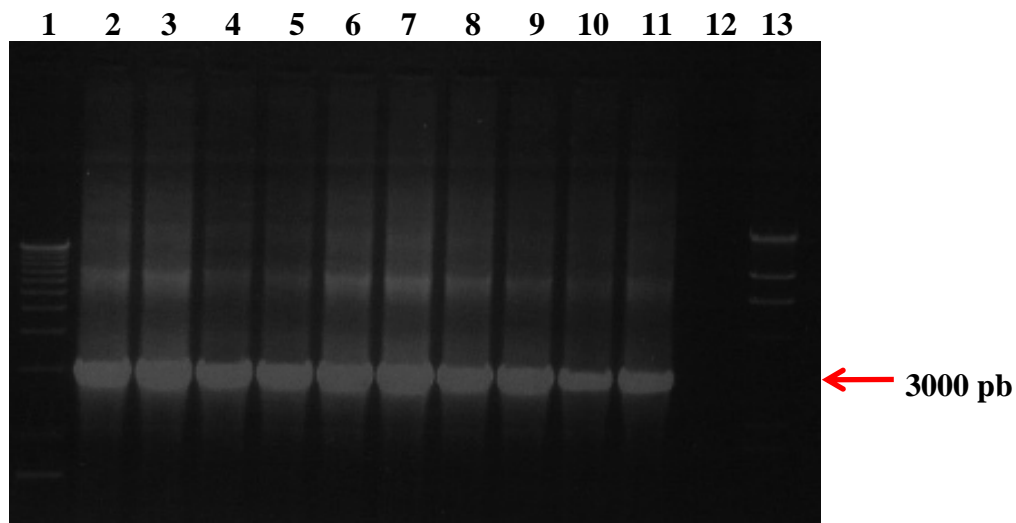


Figura 3.3.7: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de la PCR colonia con 10 colonia elegidas al azar.

Columna 1: Marcador de peso molecular X (Roche).

Columnas 2-11: Amplificados obtenidos de cada colonia con los cebadores pQE type III y Hel-b. Todos los clones dan el tamaño esperado.

Columna 12: Control negativo de PCR

Columna 13: Marcador II (Roche).

En la figura 3.3.8 se muestra la secuencia definitiva propuesta para este gen, donde el codón de iniciación se representa en azul y el de terminación en señala en rojo dando lugar a una región codificante de 3034 pb.

1	GCT	ATG	GCTT	TTAAC	CTGGA	CCACAG	GTC	AGTGG	TGTAG	GCAGC	GACCG	CACGCT	GAAA	CTGAT	GAAAA
61	TCGGC	GGCGC	CATCG	ATGCT	CTCAAC	CGCC	AACGAG	ATGC	CGCGG	CGGAT	GGTGT	TCGGA	TCAAG	TCTAT	
121	CGACG	GCTAC	CAAGG	TGCAC	AAGAAC	TGCA	GCACAG	TAC	CTTTCT	CCCG	AGGAT	TTTTGT	GGCCT	TGGAG	
181	CAGGC	GTTGA	AGCCG	CACAA	AAGCAG	CATG	ACCAAG	GAGA	TTAAG	CTCAT	TGCAAG	CGGT	CCGCC	CAGCG	
241	AAACG	AGGCG	TTTCC	ACTA	TTAAG	CTCAT	TGCAAG	CGGT	CCGCC	CAGCG	AAACG	AGGCG	TTTCC	ACTA	
301	CGACAG	TCTG	GCCTT	CCCTC	AGCTC	CGAAG	CCGGC	TGACA	GCAAC	CGCG	CAACG	AGTTG	CAAAA	AGTTCC	
421	GTGCT	TCCCT	TCCTG	CGTAT	CGCCAC	GGCC	CGGAT	ATCAT	CGAGG	CCGTG	AAGAC	CAACG	ATGTG	ATCGT	
481	GGTGT	GCGGC	GACAC	GGGGT	GCGGCA	AAAAC	AACGCA	GATC	CCACAG	CTAC	TGTCG	ACTC	TGGCA	TTTC	
541	AACAAA	AAG	ACGAT	ATCAT	TTGCAC	CCAG	CCGCG	GCGTA	TCAGC	CGCT	TTCGG	TAGCG	CAGCG	TGTCG	
601	CGACG	GAGCG	GGGCG	AATCC	TGCGG	TGACA	GCTGC	GCGTA	CATTAT	CCGG	TTCGAG	AACA	TGACA	AAGCCC	
661	CAGTAC	GCGG	ATTGT	CTACC	AGACC	ACCGG	CATCT	GCTG	CGGCG	TCTC	ATACT	GAGCC	GGATC	TGCAG	
721	GGCGT	TGCGT	GCATC	ATCGT	GGATG	AAGTG	CATGAG	CGCG	ATGTG	GAGAC	GGACT	TCTGC	CTGCT	TGCTC	
841	TCCGC	GACCG	TCTGC	GCGCG	CAGGT	GAGC	ACCCG	AAAAG	GTTCAA	ACTC	AAGCT	GAAAG	TTGTG	TGCAT	
901	GTCGG	CCACA	GTGCA	AATG	AGACG	CTCAC	TTCTA	CTTC	GAGGG	GATACA	ACAGC	GGCCG	CTCCAT	CCCC	
961	CTCAT	CTCGA	TTCCT	GGAAC	TCTTT	TCC	GTAAG	GAGT	TTTTC	CCTCGA	AGGGG	TGCTC	CAGAA	AAGTGG	
1021	GGGCG	CCGGC	TTCGG	GGCGC	CCTGC	GATGG	GGCTC	GTTG	GAAGC	AAG	GAGCA	GAAAG	AAGCG	GGCCG	
1081	GCCAG	CGGAA	GCAGC	GGAGG	GGAAT	GCCG	GCTGT	ACGAG	CAGTT	GAAAG	CTTCT	GCTTT	TGACAC	GTTT	
1141	GACCG	TGATG	TTGAG	GCGCT	TGTTCC	CATAC	GACCT	TGTGT	GCAAG	CTGAT	CCTCA	AAGATC	CACGAG	GATT	
1261	CGCGC	TCCG	TGCGG	GAGAG	ATCTT	AGTCT	TCCTG	CCGG	CTGGG	CGGCT	ATCGC	GAAACA	TTGCG	GGCTT	
1321	GCTGA	AAGCG	TCACC	GGCCG	CGCGG	AGCT	CTCCA	TTCTA	ATGTT	GCAAT	CCAGT	CTGAC	GACGAC	GAG	
1381	CAGCA	GAGAG	TCTTT	GTCAG	GCCGC	CCGA	CACTT	CCGCA	AGGTT	GTTCT	TGCCA	CCGGC	ATCGC	CGAGG	
1441	CGAGC	ATCAC	CATCA	ATGAC	ATTGT	GTAGC	TCATC	GACAG	CGGGC	TGTG	AAAGG	CACGT	CGTAC	GACCC	
1501	GACCG	CGAAC	ACAAG	CGCG	TGAAG	GCGAC	GCTGAT	CGCG	AAGGC	GAAAG	GCGTG	CAGCG	CCGAG	GACGC	
1561	GCAGG	CGGTT	TGCAG	CCGGG	CGTGT	GCTAC	CACCT	TCTAC	CCAAG	GGCG	CTACG	ATGCG	CTGCC	GGACT	
1681	TTCTC	CCACC	GGAGA	TTGTG	CGGTC	GCCTT	TAGA	AAGAGT	GTGCC	TACAG	CTGA	AAGCG	TCGAG	TCGAA	
1741	GGAGA	AAGTG	TCCA	AAGTG	TCGCG	CGGG	AATG	AGTGCT	CCACC	CGAG	ACGCG	ATTGA	GCACG	CCGTG	
1801	CAGT	TTTTGA	CGGAT	ATGGG	CGCCT	TCACG	GCGGG	CGATG	AGAGT	ATGAC	GAACT	TGGGC	CGAGC	TCTGG	
1861	CCGAG	CTACC	AACGC	ATCCT	CTGCT	TGGCA	AGATG	CTGTT	CACCG	CCGCG	TGCTT	TGGTG	TCCTT	TGACAC	
1921	TGTGG	CGACA	ATTGC	GGCCG	GGCTC	TCCGT	AAAGT	CGCCG	TTTAT	TCTG	CGCAA	ATGTT	TGAAA	AAGAAC	
1981	GCATC	ACGGG	AGAAT	CTGAT	GCGCA	TGAT	CAGGG	CGTCC	TCTCG	GATCA	CTTCT	GCCTC	GTCAC	TCTGT	
2101	TACTG	AATG	GGTGA	AAAAGT	GGGCG	TAGCT	TTCAG	TACGC	GTCGT	TCGCAC	TTCGC	CCAGC	TCACG	ACGCT	
2161	GCGCT	CGATG	GAGCG	GACGA	AGCGG	CAGTT	CAATC	TGGTG	CTCGG	TATC	TTTTG	CGAAG	GGCGT	TGATG	
2221	CCCGG	AGCAG	CACTT	GTCG	GGTAC	GCGCC	AACA	AGGGG	TGGT	GCGTCT	TGTC	TGTTT	TGGT	CTCTCT	
2281	ACCCG	CGCAT	TGCCA	GCATT	GAGTA	CCGCG	CGAAC	CGAGA	CACTC	AAGAAC	CCCCA	GGTCT	TCTGT	TGGGA	
2341	CAACA	AGTCC	GCCGC	GTTTCT	CGGCA	AATG	CGTGC	TGCG	TCCTA	TAAAG	GCCGC	GACTT	TGGGG	CAAAT	
2401	AGCTT	TGTCA	CGTAC	TACGA	CCGCAT	GAAAT	CTCGA	GGCCG	TGCTG	ACGCT	CTTTG	ACGGA	ACCGC	CTCT	
2521	CGCCG	ATCGA	TGTG	CTGCTG	TGCCT	GCGCC	ACGT	CACGGT	TCGCC	CTTG	CCGAT	GTTT	CCGAG	CTTTT	
2581	CCTCA	CCGAC	ACCGA	AAGCA	AGCTG	GCGCC	TCCCG	CCTAC	ATGG	ACGTG	ATAGC	CTGCC	CGACA	AAGGAA	
2641	AACTA	CTCTG	CCATG	TTTTT	CGACG	GGGAC	AAGA	AGTTGT	ACATC	GCACC	CAAGA	AGCTC	GCCTC	CGTTC	
2701	TCCAC	ACCCG	GCGT	GACCG	CTCGA	CTTCT	TCCTC	GCCAC	ATGC	ATTAAA	AATGT	GCGCT	CGAAC	CGCTT	
2761	TCCGG	ACGCG	CTGAT	CAAGG	TGCTC	GCGCA	GATCG	TGCG	TACCC	CATCA	CCGGC	GTCGA	CGACCA	ACG	
2821	CAAC	CTGCAC	AGGAG	GCAC	CCAC	ATGGAC	CCCGC	CATCC	TGCAG	GGGAT	TCCGG	CGGGT	GGCTT	TCTGC	
2941	CCGGC	TTCGC	GCTG	CCCC	GGGCC	GACG	GAATA	AGTCT	GATG	ACGACT	CCGAC	AGCGA	TGTCC	CGCTG	
3001	CTCGA	TGAGG	ACGCT	GACGA	CGCCT	TGCAG	CGGC	TGA							

Figura 3.3.8: Secuencia de nucleótidos del clon pGHLb de *L. braziliensis*.

A partir de dicha secuencia de nucleótidos se realizó la traducción teórica del gen obteniéndose una proteína de 998 aminoácidos cuya secuencia se observa en la figura 3.3.9.

1	MAFNLDHRSS	GVGSDRTLKL	MKIGGAIDAL	NRQRDAAADG	VRIKSIDGYQ
51	GAQELQHSHL	SPEDFVALEQ	ALKPHKSSMT	KEIKLIASGP	PAETRRFRLR
101	QSGLPAPKP	AQSNARNELQ	KFRASLPAYR	HGPDIEAVK	TNDVIVVCGD
151	TGCGKTTQIP	QLLFDSGIFN	KKDDIICTQP	RRISALSVAQ	RVATERGESC
201	GDSCGYIIRF	ENMTSPSTRI	VYQTTGILLR	RLHTEPDLQ	VACIIVDEVH
251	ERDVETDFCL	LLLDRDLRAQ	AEHPERFKLK	LKLVVMSATV	QIETLTSYFE
301	GYNSGRSIP	ISIPGTLFPV	KEFFLEGVLQ	KVGAPASAAP	AMGLVAKQKE
351	QKQAGRPAEA	AEGNAALYEQ	LKTSVFDTFD	RDVEALVPYD	LVCKLILKIH
401	EDSRRAESI	LVFLPGWAAI	ANIAGLLKRS	PAARELSILM	LHSSLTTTEQ
451	QRVFRPPRH	FRKVVLATGI	AEASITINDI	VYVIDSGLVK	GTSYDPTANT
501	SALKATLIAK	ANGVQRRGRA	GRLQPGVCYH	LLPKAAYDAL	PDFLPPEIVR
551	SPLLEEVCLQ	KAIESKEKCS	KVLARAMSAP	PEDAIEHAVQ	FLTDMGAFTA
601	GDESMTNLGR	ALAEPLTHPL	LGKMLFTAAC	FGVLDTVATI	AAGLSVKSPF
651	IRPQMF EKNA	SRENLMRIDQ	GVLSDFHCLV	TLFTEWVKS	RSFQYASSHF
701	ADVTTLSRME	RTKRQFNVLV	GHLLRRALMP	GAALVAVRAN	KGLVRLVLFW
751	SLYPRIASIE	YRANRDTQNP	QVFCWDNKSA	AFSANCVLAS	YKRRDFGANS
801	FVTTYDRMNL	EAVLTLFDGT	AVSPIDVLLC	LRHVTVRPLP	DVPELFLTDT
851	ESKLAPPAYM	DVDSLDPKEN	YSAMFFDGDK	KLYIAPKKLA	SVLHTARDRL
901	DFFLATCIKN	VRSNRFDPAL	IKVLAQIVGY	PITGVDAPTQ	PAQEALHMDF
951	AILQGI PAGG	FLPGFARRPG	PDGISLMTTP	TAMCRCSMRT	LTTPCSG&

Figura 3.3.9: Secuencia de aminoácidos del clon pGHLb de *L. braziliensis*. En rojo se señalan los siete dominios conservados que caracterizan a la familia de proteínas DE(A/D)H-box ARN helicasa.

El análisis BLASTA de la secuencia aminoacídica propuesta, muestra que esta proteína tiene una identidad del 56% con la proteína descrita como putativa helicasa de *Oryza sativa* (AC091811), presenta un 54%, 55%, 48% y un 49% de identidad con la putativa ATP-dependiente RNA helicasa A de *Oryza sativa* (AP002541), de *Arabidopsis thaliana* (AB005245), de *Homo sapiens* (NDH II) (Q08211) y de *Mus musculus* (NDH II) (O70133), respectivamente. Un 54% de identidad con la proteína DNA helicasa II de *Mus musculus* (U92080), un 51% de identidad con la proteína MLE1 de *Homo sapiens* (AF217190) y de *D. melanogaster* MLE (AE003784) y por último, con la proteína DEAH-box ARN/ADN helicasa de *Homo sapiens* (AF283512) muestra un 52% de identidad.

3.3.3. Estudio de la secuencia de aminoácidos obtenida del clon pGHLb de *L. braziliensis*.

Cuando analizamos la secuencia de aminoácidos propuesta podemos observar la presencia en las posiciones 247-250 del motivo tipo DExH-box o motivo II, con la secuencia DEVH.

Entre los aminoácidos 149-156 se aprecia la secuencia GDTGCGKTT que corresponde con el motivo de unión a ATP o motivo I de esta familia de proteínas.

Estos dos motivos están presentes en todas las proteínas de la familia de las helicasas, así como en las proteínas que son capaces de unirse e hidrolizar NTPs.

En las posiciones 178-185 y 413-416 se muestran las secuencias TQPRRISA y FLPG que corresponden con los motivos Ia y IV, respectivamente. Estos son motivos de unión a ácidos nucleicos.

También podemos comprobar la presencia del motivo III en la posición 287-289 con la secuencia SAT, y del motivo VI localizado entre los aminoácidos 515-522. Este motivo VI, que presenta la secuencia QRRGRAGR, caracteriza a las helicasas que pertenecen a la superfamilia 2, y es de destacar la presencia del residuo de glutamina que es fundamental para la interacción con el aminoácido histidina del motivo DEVH antes descrito (Caruthers J.M., *et. al.* 2002).

A diferencia de otras helicasas la secuencia del motivo V localizado en la posición 468-479, no coincide completamente con el descrito por otros autores, ya que difiere en el segundo y último aminoácido. La asparagina está sustituida por una glicina y la glicina del último aminoácido está reemplazada por un ácido aspártico, sin embargo, en otros casos como puede ser la ARN helicasa A de humano o en la proteína MLE de *D. melanogaster* también se observa un ácido aspártico. Por lo tanto la secuencia en este caso es TGxAExSxTxxD y la considerada consenso es TNxAExSxTxxG. También a diferencia de otras helicasas, esta proteína carece del dominio de unión a ARN de cadena doble (dsRBD) localizado en el extremo amino, cuya función es aumentar la afinidad de la proteína por los ácidos nucleicos, y del dominio RGG-box que se localiza en el extremo carboxilo terminal, estas secuencias ricas en glicina, se ha postulado que permiten la retención de la proteína en el núcleo, lo que conlleva una localización nuclear específica de la proteína (Zhang S. *et. al.*, 1999). Este dominio también interviene en la unión a ácidos nucleicos de cadena simple.

De acuerdo con todo lo descrito podemos clasificar a esta proteína de *L. braziliensis* como una helicasa por presentar los 7 motivos característicos de estas proteínas localizados entre los aminoácidos 149 al 522, además pertenece a la superfamilia 2 por las secuencias que poseen estos motivos y dentro de esta superfamilia la incluimos con las DExH-box helicasas ya que presenta la secuencia DEVH como motivo II.

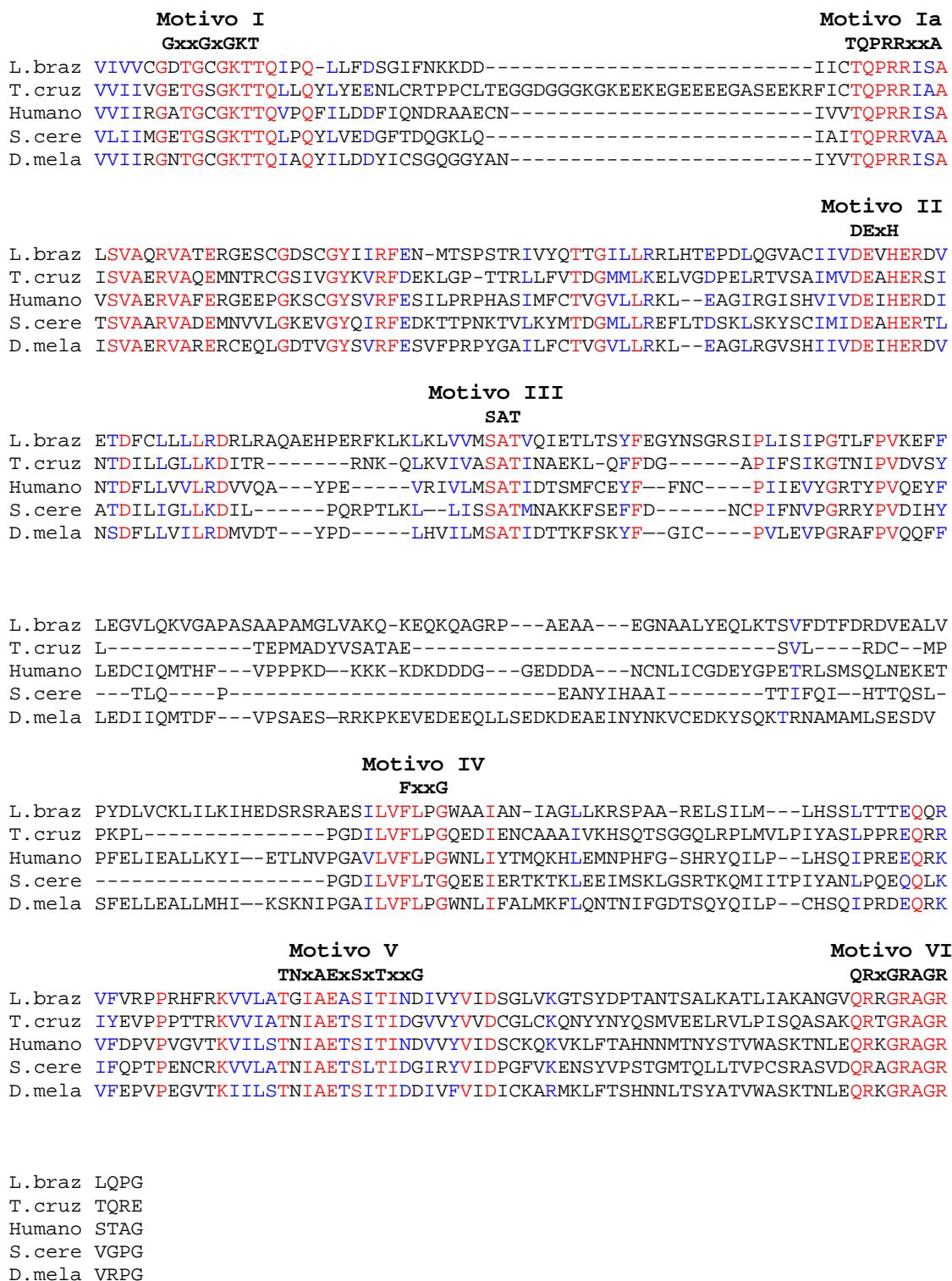


Figura 3.3.10: Multialineamiento de la región central de las DExH-box descritas con la helicasa de *L. braziliensis*. L.braz (DEVH-box helicasa de *L. braziliensis*), T.cruz (DEAH-box RNA helicasa de *Tripanosoma cruzi*), Humano (la ARN helicasa A de humano), S.cere (la proteína Prp2p de *Saccharomyces cerevisiae*) y D.mela (la proteína MLE de *Drosophila melanogaster*).

Como se puede observa en la figura 3.3.10, los motivos de la proteína propuesta de *L. braziliensis* se alinean perfectamente con los motivos presentes en otras helicasas que pertenecen a la superfamilia 2 y en concreto, con las DExH-box ARN/ADN helicasas dependientes de ATP. Comparando la región central de la DEVH-box helicasa de *L. braziliensis* con la misma parte central de su homóloga TcRH1 de *T. cruzi*, observamos que existe un 46 % de identidad.

Por todo lo anteriormente expuesto podemos concluir que el clon pGHLb codifica la primera proteína DExH-box RNA/DNA helicasa dependiente de ATP descrita en *L. braziliensis*. Esta proteína debe estar involucrada en el procesamiento de ácidos nucleicos ya que presenta los 7 dominios conservados al igual que ocurre con la DEAH-box RNA helicasa de *Trypanosoma cruzi*, cuya actividad no se ha demostrado (Lorenzi H. A., *et. al.* 2000).

3.3.4. Subclonaje de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína DEVH-box helicasa de *L. braziliensis* en el vector de expresión pQE.-

El gen que codificaba la proteína DEVH-box helicasa de *L. braziliensis*, se subclonó en el vector de expresión pQE. Para ello se utilizó el clon pGHLb como molde y se procedió del mismo modo que en el clonaje del clon pGHLb. El producto amplificado por PCR se purificó desde un gel de agarosa al 1% y se transformó en un fragmento romo, empleando el *kit* comercial *SureClone Ligation Kit* (Pharmacia Biotech). A continuación, el fragmento se insertó en el vector pQE32 (Qiagen) previamente purificado, linealizado con Sma I y desfosforilado (figura 3.3.11).

Por PCR colonia se seleccionaron los posibles clones, que portaban el inserto en la orientación adecuada. De las 10 colonias elegidas al azar, sólo 2 poseían el inserto bien orientado, como se muestra en la figura 3.3.12, y se las denominó pQE-HLb1 y pQE-HLb2. Tras confirmar mediante secuenciación que el clon pQE-HLb1 portaba el inserto con la secuencia correcta, bien orientado y en pauta, se realizaron los ensayos de inducción y solubilización.



Figura 3.3.11

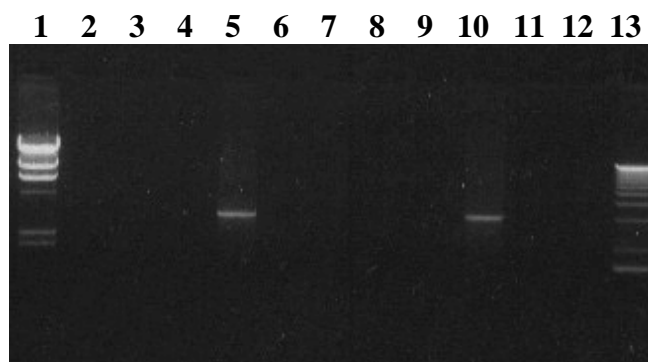


Figura 3.3.12

Figura 3.3.11: Electroforesis en gel de agarosa al 1% del vector pQE (Qiagen).

Columna 1: Marcador de peso molecular X (Roche).
Columna 2: ADN del vector pQE32 purificado.
Columna 3: 1µg del vector pQE32 digerido con 1U de la enzima SmaI.
Columna 4: 1µg del vector pQE32/SmaI desfosforilado con 1U de fosfatasa alcalina.
Columna 5: Marcador de peso molecular II (Roche).

Figura 3.3.12: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de la PCR colonia con las 10 colonia elegidas al azar.

Columna 1: Marcador de peso molecular II (Roche).
Columnas 2-11: Amplificados obtenidos de cada colonia con los cebadores pQE type III y Hel-b. Los clones 4 y 9 dan el tamaño esperado.
Columna 12: Control negativo de PCR
Columna 13: Marcador X (Roche).

3.3.5. Expresión y solubilización en condiciones nativas de la proteína recombinante DEVH-box helicasa de *L. braziliensis*.-

Una vez obtenido el clon recombinante, el ensayo de inducción se realizó empleando concentraciones de IPTG de 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM durante 2 horas a 37°C en medio LB con Ampicilina (100µg/ml). Como se puede observar en la figura 3.3.13, se induce la expresión de una proteína de 112 KDa, y las condiciones óptimas de expresión se consiguen cuando se induce durante 2 horas a 37°C con 0.1 mM de IPTG.

Los ensayos de solubilización se realizaron empleando tampón fosfato 9 mM, NaCl 50 mM y concentraciones crecientes de SDS (detergente aniónico) como se describe en el apartado 2.17.1 de materiales y métodos. En la figura 3.3.14 se muestran

los diferentes precipitados y sobrenadantes obtenidos durante los tres ciclos de sonicación.

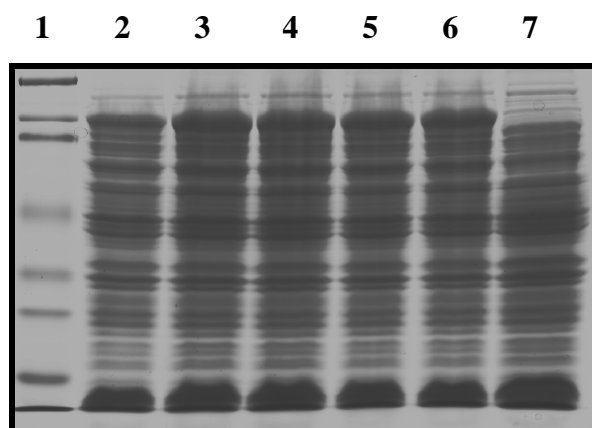


Figura 3.3.13: Ensayo de inducción de la proteína DEVH-box helicasa recombinante de *L. braziliensis* en *E. coli*.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2-6: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-HLb inducidas durante 2h con 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2mM de IPTG, respectivamente.

Columna 7: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-HLb crecidas durante 2h sin inducir .

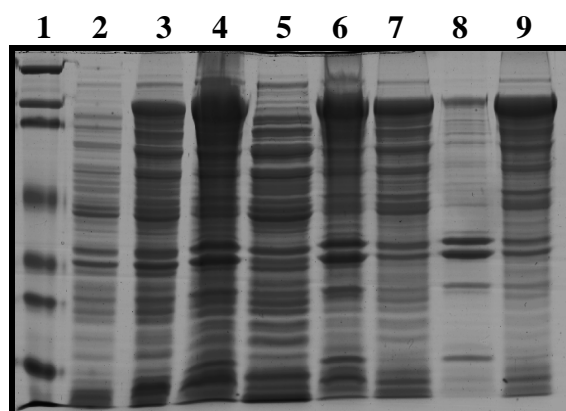


Figura 3.3.14: Solubilización de la proteína DEVH-box helicasa recombinante mediante el uso de SDS, 10 µl de cada muestra se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 15%.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-HLb crecidas durante 2h sin inducir.

Columna 3: bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido pQE-HLb inducidas durante 2h con 0.1 mM de IPTG.

Columna 4: Precipitado obtenido tras el primer ciclo de solubilización empleando 0.025% de SDS.

Columna 5: Sobrenadante obtenido tras el primer ciclo de solubilización empleando 0.025% de SDS.

Columna 6: Precipitado obtenido tras el segundo ciclo de solubilización empleando SDS al 0.05%.

Columna 7: Sobrenadante obtenido tras el segundo ciclo de solubilización empleando SDS al 0.05%.

Columna 8: Precipitado obtenido tras el tercer ciclo de solubilización empleando SDS al 0.05%.

Columna 9: Sobrenadante obtenido tras el tercer ciclo de solubilización empleando SDS al 0.05%.

Como se puede observar, la proteína comienza a solubilizarse a partir del segundo paso de solubilización, cuando se empleó 0.05% de SDS, pero permanecía, en su mayor parte, en forma insoluble, sin embargo tras el tercer ciclo de solubilización con 0.05% de SDS, se consigue la solubilización completa de la proteína DEVH-box helicasa.

3.3.6. Purificación en condiciones nativas de la proteína recombinante DEVH-box helicasa de *L. braziliensis*.-

El extracto obtenido tras la tercera solubilización fue el empleado para llevar a cabo la purificación de la proteína, realizando el protocolo descrito en el apartado 2.17.2 de materiales y métodos. En la figura 3.3.15 se observan las diferentes fracciones proteicas purificadas obtenidas mediante concentraciones crecientes de imidazol (0, 5, 10, 15, 20, 50, 100 y 150 mM).

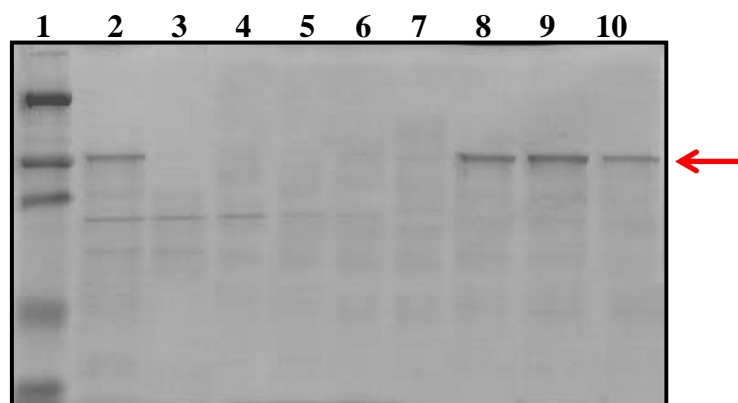


Figura 3.3.15: Purificación de la proteína DEVH-box helicasa recombinante de *L. braziliensis* mediante cromatografía de afinidad en resina de NTA-Ni²⁺.

Columna 1: Marcador de peso molecular “Prestained proteína. MWM broad range” (Bio-Rad).

Columna 2: Sobrenadante obtenido tras la tercera solubilización.

Columna 3: Eluido de la resina.

Columna 4: Lavado a pH 8 con 5 mM de imidazol.

Columna 5: Lavado a pH 8 con 10 mM de imidazol.

Columna 6: Lavado a pH 8 con 15 mM de imidazol.

Columna 7: Lavado a pH 8 con 20 mM de imidazol.

Columna 8: Lavado a pH 8 con 50 mM de imidazol.

Columna 9: Lavado a pH 8 con 100 mM de imidazol.

Columna 10: Lavado a pH 8 con 150 mM de imidazol.

La unión de la proteína recombinante DEVH-box helicasa a la resina es total ya que no se observan trazas en el eluyente, sino las proteínas de *E. coli* que no tienen

afinidad por la resina de Ni²⁺. Durante los pasos de lavado se aprecian restos de proteínas de la bacteria hospedadora que permanecían unidas a la resina pero con escasa afinidad. Además, a diferencia de lo que ocurre con las proteínas ribosomales descritas anteriormente, ésta se une con gran afinidad, comenzando a eluir cuando se emplea 50 mM de imidazol, siendo a 100 mM de imidazol la concentración óptima.

Después de dializar las fracciones que contenían la proteína purificada frente a PBS 0.1X, se liofilizaron, se resuspendieron en agua destilada y se determinó su concentración, la cual oscilaba entre 2-4 mg por litro de cultivo. No se detectaron endotoxinas.

3.3.7. Respuesta humoral inducida por la proteína DEVH-box helicasa de *L. braziliensis* en ratones BALB/c.-

Con el fin de conocer si la proteína DEVH-box helicasa de *L. braziliensis* era capaz de desencadenar una respuesta humoral anti-helicasa, se inocularon ratones BALB/c con dicha proteína recombinante por vía subcutánea. Se realizaron tres inmunizaciones los días 0, 14 y 28 inoculando 20 µg de proteína por dosis. Cada dos semanas, tras la primera inoculación, se tomaron muestras de sangre del plexo retro-orbital de los ratones, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.28.1 de materiales y métodos y mediante ELISA se analizó la evolución de los valores de IgG anti-DEVH-box helicasa.

Como se puede observar en la figura 3.3.16, los ratones inmunizados con la proteína DEVH-box helicasa sin adyuvante presentan entre la semana 4 y 10 post-primera inmunización, un aumento progresivo en los niveles de anticuerpo anti-helicasa, observándose en la semana 6 una respuesta apreciable con valores de 0,68 (+/-0,08) de D.O., alcanzando en la semana 10 valores de 0,98 (+/- 0,07) de D.O., lo que supone un aumento de 15 veces frente al nivel de IgG de los ratones control negativo a los que se les había inoculado solución salina (D.O. 0,065 +/-0,01). Los ratones inmunizados con la proteína emulsionada con adyuvante, muestran entre la semana 4 y 6, post-primera inmunización, un aumento brusco de los valores de IgG anti-helicasa, pasado de 0,448 de D.O. en la semana 4 a 1,299 (+/-0,085) en la semana 6, manteniéndose valores similares 10 semanas después de la primera inmunización, lo que supone un aumento de 29 veces frente al valor de IgG obtenido de los ratones control salino con adyuvante.

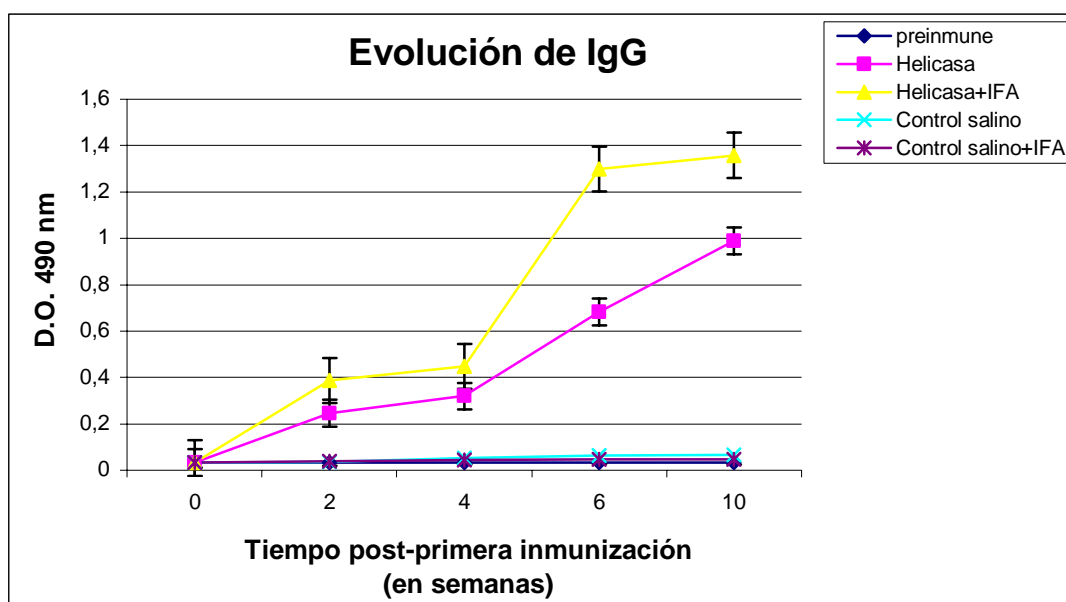


Figura 3.3.16: Análisis de la respuesta humoral inducida por la proteína DEVH-box helicasa recombinante en ratones BALB/c. A partir de la primera dosis se realizaron sangrías cada dos semanas de todos los grupos establecidos, (apartado 2.32 materiales y métodos). Niveles de IgG anti-helicasa detectados mediante ELISA en los sueros de los ratones inmunizados sólo con dicha proteína (■), con la proteína emulsionado con IFA (▲), con solución salina (×), con solución salina emulsionada con IFA (*). La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

Ante estos resultados se decidió analizar qué isotipo de inmunoglobulina G (IgG1 o IgG2a) era responsable de la elevación de la IgG generada contra la proteína DEVH-box helicasa.

El estudio de los isotipos reveló que, 10 semanas después de la primera inoculación, los sueros procedentes de los ratones inmunizados con la proteína DEVH-box helicasa sin adyuvante presentan un aumento de los valores de IgG1 de 16 veces (D.O. 1,034 +/- 0,058) frente al nivel de IgG1 de los ratones inmunizados con solución salina (D.O. 0,065 +/- 0,01). Un aumento similar se observa cuando se analizan los niveles de IgG2a, en este caso los valores aumentan 15 veces (D.O. 0,908 +/- 0,063) frente a los ratones control (figura 3.3.17). Por lo tanto la inoculación de la proteína DEVH-box helicasa sin adyuvante genera una respuesta humoral mixta IgG1-IgG2a, lo que indicaría una respuesta celular mixta Th1-Th2 (Coffman R.L., *et. al.* 1988).

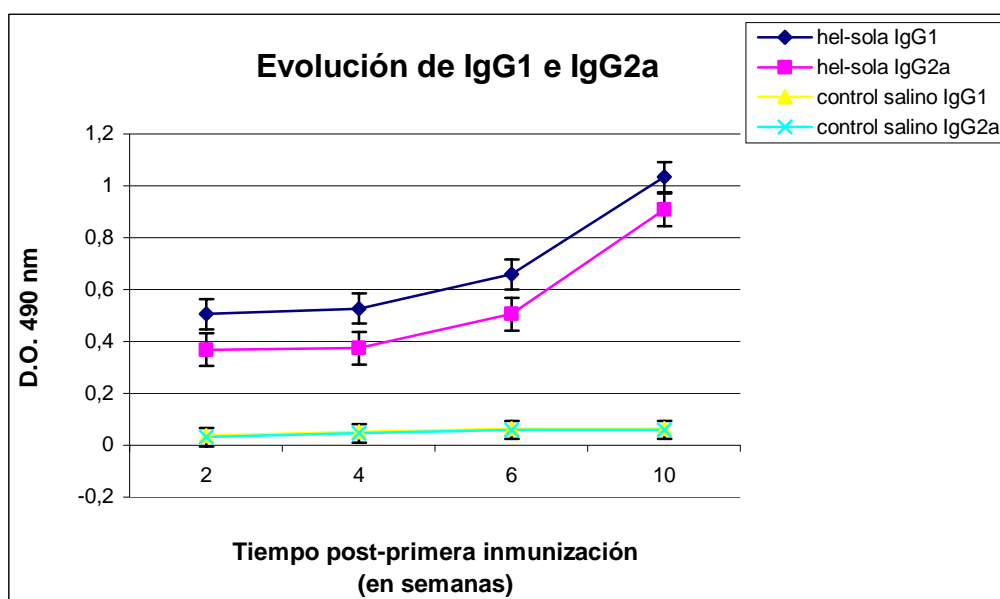


Figura 3.3.17: Análisis de los isotipos IgG1 e IgG2a inducido por la proteína DEVH-box helicasa. Niveles de IgG1 (♦) e IgG2a (■) anti-helicasa detectados en los sueros de los ratones inmunizados sólo con la proteína DEVH-box helicasa. Niveles de IgG1 (▲) e IgG2a (×) anti-helicasa detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina. La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

Con respecto a los ratones inmunizados con la proteína emulsionada con adyuvante no se observa un aumento brusco de los niveles de los isotipos. Sin embargo, en este caso, 10 semanas post-primera inoculación, los valores del isotipo IgG1 anti-helicasa aumentan 24 veces (D.O. 1,110 +/-0,08) frente a los valores de IgG1 (D.O. 0,047) de los ratones control inmunizados con solución salina emulsionada con adyuvante. Cuando analizamos los niveles de IgG2a observamos que sólo aumentan 12 veces (D.O. 0,490 +/-0,1) frente a los ratones control (figura 3.3.18). De lo que se deduce que el efecto del adyuvante desvía la respuesta humoral hacia el isotipo IgG1, lo que indicaría que la inoculación de la proteína DEVH-box helicasa emulsionada con adyuvante polariza la respuesta celular hacia el tipo Th2.

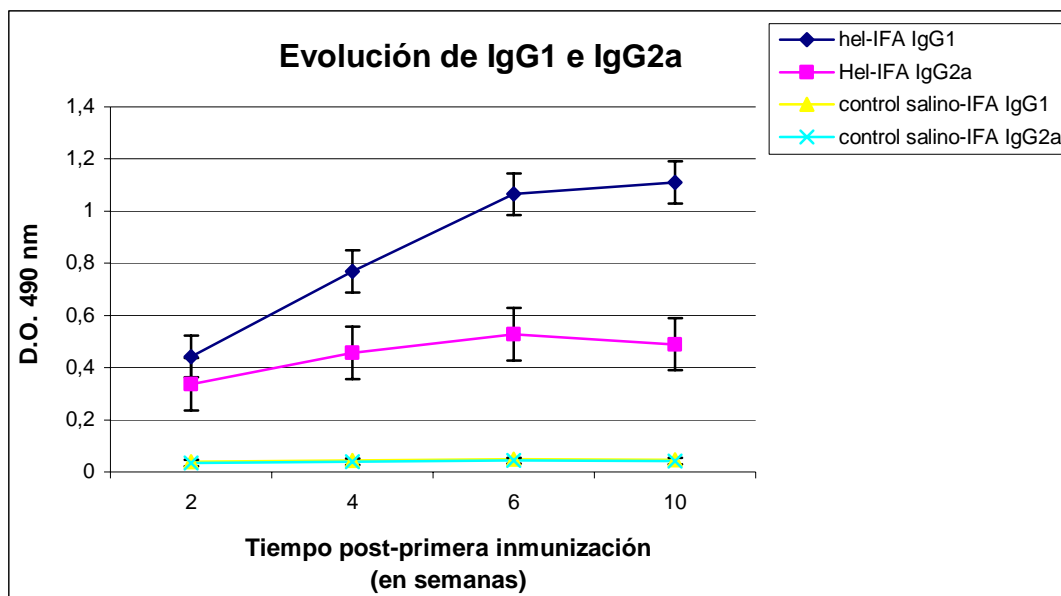


Figura 3.3.18: Análisis de los isotipos IgG1 e IgG2a inducido por la proteína DEVH-box helicasa. Niveles de IgG1 (♦) e IgG2a (■) anti-helicasa detectados en los sueros de los ratones inmunizados con la proteína DEVH-box helicasa emulsionada con IFA. Niveles de IgG1 (▲) e IgG2a (×) anti-helicasa detectados en los sueros de los ratones inmunizados con solución salina emulsionada con IFA. La absorbancia se determina como la diferencia entre la media aritmética de la absorbancia de cada suero a la dilución 1:100 y la media aritmética obtenida del suero preinmune.

3.3.8. Localización de la DEVH-box helicasa *Leishmania braziliensis* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).-

Debido a que la DEVH-box helicasa de *L. braziliensis* es una ARN/ADN helicasa dependiente ATP por homología de secuencia de aminoácidos, el estudio de su localización en la célula es de interés para poder delimitar su función. Para realizar este estudio, se emplearon los sueros procedentes de los ratones inmunizados con la proteína DEVH-box helicasa emulsionada con IFA obtenidos 6 semanas después de la primera inmunización ya que fueron los que presentaban un valor de D. O. mayor y se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.34 de materiales y métodos,

Para detectar la presencia de la proteína DEVH-box helicasa en el parásito, se fijan promastigotes de *L. braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento con PLP y se permeabilizan con Tritón X-100 al 0,5%. Como primer anticuerpo se emplea el suero anteriormente descrito a la dilución 1:20 y 1:100 y como control negativo se utiliza el suero procedente de los ratones inmunizados con solución salina emulsionada con IFA. Como segundo anticuerpo, se emplea un anti-mouse IgG conjugado con fluoresceína a la dilución 1:50. La figura 3.3.19 corresponde a la inmunofluorescencia obtenida tras

emplear el suero salino control. El empleo del suero procedente de los ratones inmunizados con la proteína emulsionada con adyuvante reveló una fluorescencia citoplasmática, con una mayor intensidad en la región apical, contraria al polo flagelar (figura 3.3.20 y 3.3.21), lo cual coincide con la carencia del dominio RGG-box presente en el extremo carboxilo terminal de las helicasa nucleares descritas. Según Zhang S., *et. al.* en 1999, indicaron que la presencia de este motivo permite la retención de la proteína en el núcleo. Otras proteínas incluidas en esta superfamilia 2, como es la Dbp5 humana o la Hel64 de *T. brucei* que tampoco poseen este dominio RGG-box, presentan una distribución similar, no observándose esta proteína en el interior nuclear.

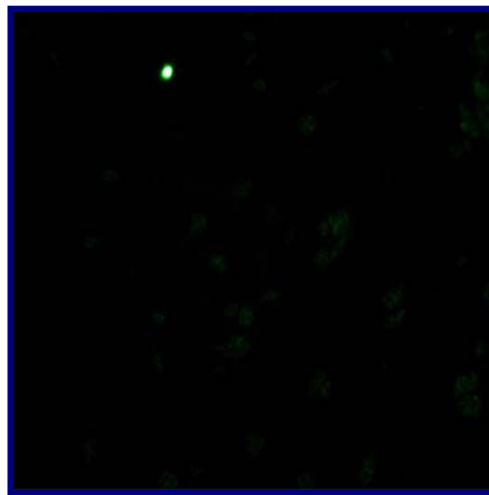


Figura 3.3.19

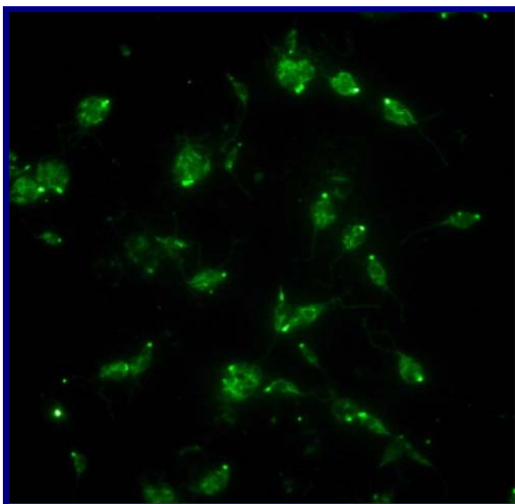


Figura 3.3.20

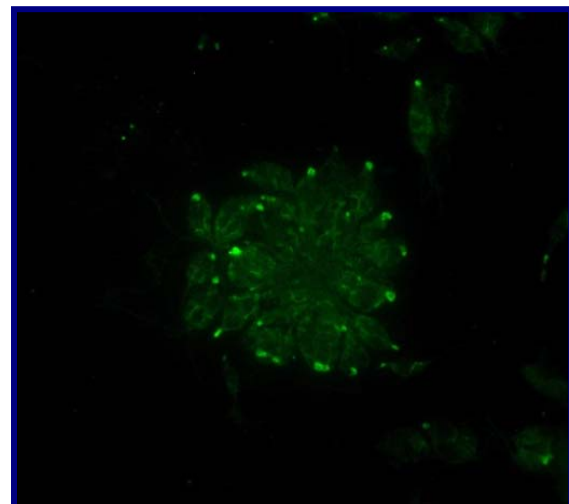


Figura 3.3.21

Figura 3.3.19: Control negativo de inmunofluorescencia indirecta.

Figura 3.3.20 y 3.3.21: Inmunofluorescencia indirecta empleando suero anti-DEVH-box helicasa policlonal.

CONCLUSIONES:

1°.- La proteína ribosomal L14 en su forma recombinante, no es reconocida ni por el sistema inmune de los pacientes enfermos de leishmaniasis, ni por el de los ratones Balb/c inoculados con dicha proteína sola.

2°.- La inmunización de ratones Balb/c con la forma recombinante de la proteína ribosomal L14 con inmunomoduladores, induce una respuesta inmune en los ratones de tipo Th1 o Th2 dependiendo del adyuvante que la acompañe.

3°.- A la vista de las conclusiones anteriores, la proteína ribosomal L14 es una buena candidata a ser utilizada como control para el estudio de moléculas moduladoras de la respuesta inmunológica.

4°.- El hecho de que la forma recombinante de la proteína ribosomal L14 de *Leishmania braziliensis* emulsionada con la Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, sugiera inducir respuesta tipo Th1 en ratones Balb/c, hace que la proponamos como molécula útil para la protección contra el parásito, y pueda ser incluida en un multiantígeno para dicho fin.

5°.- La proteína ribosomal L25 no presenta especificidad para ser utilizada en el diagnóstico de la Leishmaniasis, siendo el extremo carboxilo terminal de la misma, el responsable de dicha inespecificidad.

6°.- Los isotipos de IgG generados por ratones Balb/c cuando son inoculados con la proteína ribosomal L25 completa, son diferentes a los generados cuando se inoculan con su extremo amino terminal.

7°.- Dada la capacidad para reducir el volumen de la lesión generada por *L. amazonensis* en ratones Balb/c, proponemos al extremo amino terminal de la proteína ribosomal L25, para su uso en un multiantígeno vacunal frente a *Leishmania sp.*

8°.- Se aísla por primera vez en protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, un gen que codifica una Helicasa, concretamente, la proteína DEVH-box RNA/DNA Helicasa.

9°.- La secuencia de la proteína DEVH-box RNA/DNA Helicasa y el estudio de inmunolocalización realizado, nos permite afirmar que esta proteína, en la forma promastigote de *Leishmania braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento, presenta localización citoplasmática.

BIBLIOGRAFÍA:

Alexander J., Russell D. G. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31: 175-254. Review.

Alonso L. C. C., Scharon L. Q., Vieira M., Wysocka M., Trinchieri G., Scott P. 1994. IL-12 functions as an effective adjuvant in a vaccine against *Leishmania major* by directing the development of leishmanial specific CD4⁺ TH1 cell. *Science.* 263: 235

Alvar J. 1994. Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitol. Today.* 10: 160-163.

Alvar J., Cañavate C., Gutiérrez-Solar B., Jiménez M., Laguna F., López-Vélez R., Molina R., Moreno J. 1997. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 298-319.

Ang D., Liberek K., Skowrya D., Zylicz M., Georgopoulos C. 1991. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 24233-24236.

Angel S. O., Requena J. M., Soto M., Criado D., Alonso C. 1996. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-KDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop.* 62: 45-56.

Ashford D. A., Bozza M., Freire M., Miranda J. C., Sherlock I., Eulalio C., Lopes U., Fernandes O., Degraeve W., Barker R. H. 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 251-255.

Ashford R. W., Bates P. A. 1998. Leishmaniasis in the Old World. En F. Cox, J. P. Kreier, D. Walile (Eds), *Microbiology and Microbial Infections* (pp. 215-240). New York: Oxford University Press.

Aslund L., Carlsson L., Henriksson J., Rydoiker M., Toro G. C., Galanti N., Petterson U. 1994. A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65:317-330

Avilés H., Belli A., Armijos R., Monroy F. P., Harris E. 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J. Parasitol.* 85: 181-187.

Badaro R., Reed S. G., Barral A., Orge G., Jones T. C. 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 72-78.

Belli A., Rodríguez B., Avilés H., Harris E. 1998. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 102-109.

Berman J. D. 1997. Human Leishmaniasis: clinical diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Inf. Dis.* 24: 684-703.

Birnboim H. C., Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.

Birnboim H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100: 243-255

Bogdan C., Rollinghoff M. 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages?. *Parasitol. Today.* 15: 22-28. Review.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bray R. S. 1974. *Leishmania*. *Annu. Rev. Immunology.* 28:189-217.

Brittingham A., Morrison C. J., McMaster W. R., McGwire B. S., Chang K. P., Mosser D. M. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 155: 3102-3111.

Burns J. M., Shreffler W. J., Benson D. R., Ghalib H. W., Badaro R., Reed G. 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibodies in african and american visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 775-779.

Burri M., Schlimme W., Betschart B., Kampfer U., Schaller J., Hecker H. 1993. Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Res.* 79:649-659

Buxbaum L. U., Uzonna J. E., Goldschmidt M. H., Scott P. 2002. Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent. *Eur. J. Immunol.* 32: 3206-3215.

Cáceres-Dittmar G., Tapia F. J., Sanchez M., Yamamura K., Uyemura R. L., Modlin R. L. 1993. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 91: 500-505.

Campos-Neto A., Porrozzzi R., Greeson K., Coler R. N., Webb J. R., Seiky Y. A. W., Reed S., Grimaldi G. 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect. Immun.* 69: 4103-4108.

Carmelo E., Martínez E., González A. C., Piñero J. E., Patarroyo M. E., Del Castillo A., Valladares B. 2002a. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. *Clinical and Diag Labor Immunol.* 9: 808-811.

Carmelo E., Martínez E., Zurita A. I., Piñero J. E., Pacheco R., Del Castillo A., Valladares B. 2002. Molecular characterisation, expresión and antigenicity analysis of *Leishmania braziliensis* KMP-11. *Revista Ibérica de Parasitología*. 62: 21-27.

Carrera L., Gazzinelli R. T., Badolato R., Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks D. L. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit IL-12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* 183: 515-526.

Caruthers J. M., Johnson E. R., McKay D. B. 2000. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 13080-13085.

Caruthers J. M., McKay D. B. 2002. Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 123-133.

Carvalho E. M., Johnson W. R., Barreto E., Marsden P. D., Costa J. L. M., Reed S. 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 135: 4144-4148.

Carvalho E. M., Barral A., Pedral-Sampaio D., Barral-Neto M., Badaro R., Rocha H. 1992. Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *L. chagasi*. *J. Infect. Dis.* 165: 536-544.

Carvalho E. M., Bacellar O., Brownell C., Regis T., Coffman R. L., Reed S. G. 1994. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 152: 5949-5956.

Castés M., Trujillo D., Calcagno M., Cacrera M., Convit J. 1993. Response Th1/Th2 in human american cutaneous leishmaniasis: its possible relevance for the design of a vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88: 42-43.

Castés M., Trujillo D., Rojas M. E., Fernandez C. T., Araya L., Cabrera M. 1993b. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.* 26: 233-238.

Chang K. P., Fong D., Bray R. S. 1985. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En K. P. Chang y R. S. Bray (Eds.), *Leishmaniasis* (pp. 2-27). Amsterdam: Elsevier.

Chomczynsky P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.

Coffman R. L., Seymour B. W. P., Lebman D. A., Hiraki D. D., Christiansen J. A., Shrader B. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102: 5-28.

Coffman R. L., Lebman D. A., Rothman P. 1993. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Imm.* 54: 229.

Coler R. N., Skeiky Y. A., Bernards K., Greeson K., Carter D., Cornellison C. D., Modabber F., Campos-Neto A., Reed S. G. 2002. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect. Immun.* 70: 4215-4225.

Comes, A. N., Humbert J. F., Laurent F. 1997. Rapid cloning of PCR-Derived RAPD probes. *Biotech.* 23: 210-212.

Cordeiro da Silva A., Borges M. C., Guilvard E., Ouaisi A. 2001. Dual role of the *Leishmania major* ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infect. Immun.* 69: 6588-6596.

Croft S. L., Yardley V. 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.* 8: 319-342.

Cunha F. Q., Moncada S., Liew F. Y. 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 182: 1155-1159.

Cunningham A. C. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.* 72: 132-141. Review.

Da Costa C. A., De Toledo V. P., Enaro O., William P., Mayrink W. 1996. Montenegro skin test-evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 9: 193-194.

Dedet J. P., Pratlong F., Pradinaud R., Moreau B. 1999. Delayed culture of *Leishmania* in skin biopsies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 673-674.

Descoteaux A., Turco S. J. 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455:341-352. Review.

Desjeux P. 1992. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. *World Health Stat. Q.* 45: 267-272.

Díaz A. M., Rossi M. S., Espinosa J. M., Güida C., Freitas F. A., Kornblihtt A. R., Zingales B., Flawiá M. M., Torres H. N. 2000. mRNA encoding a putative RNA helicase of the DEAD-box gene family is up-regulated in Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47: 555-560.

Dwyer D. M. 1976. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *J. Immunol.* 117: 2081-2091.

El-Baradi T. T. A. L., Raue H. A., De Regt C. H., Planta R. J. 1984. Stepwise dissociation of yeast 60S ribosomal subunits by LiCl and identification of L25 as a primary 26S rRNA binding protein. *Eur. J. Biochem.* 144: 393-400.

Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* 10: 2606-2617.

Fasel N. J., Robyr D. C., Mauel J., Glaser T. A. 1994. Identification of a histone H1-like gene expressed in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:321-324.

Galanti N. 1998. Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol. Today.* 14: 64–70.

Galvao-Castro B., Saferreira J. A., Marzochi K. F., Marzochi M. C., Coutinho S. G., Lambert P. H. 1984. Polyclonal B-cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human visceral leishmaniasis. *Clinic. Exp. Immunol.* 56: 58-66.

Ghosh A., Zhang W. W., Matlashewski G. 2001. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine.* 20: 59-66.

Gibson T. J., Thompson J. D. 1994. Detection of dsRNA-binding domains in RNA helicase A and *Drosophila* maleless : implications for monomeric RNA helicases. *Nucleic Acids Res.* 22: 2552-2556.

Gicheru M. M., Olobo J. O. 1994. Evaluation of recombinant gp63, the major *Leishmania* surface glycoprotein, as a diagnostic molecule for leishmaniasis in vervet monkeys. *Acta Trop.* 58: 345-348.

Gonçalves A. M., Nehme N. S., Morel C. M. 1984. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd edition, C.M. Morel editor. UNDP/World Bank/WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases-Finep, CNPq, FIOCRUZ, cap. 2.1, p. 95-109.

González A. C., Martínez E., Carmelo E., Piñero J. E, Alonso V., Del Castillo A., Valladares B. 2002. Análisis of NLS and rRNA binding motifs in the L25 ribosomal protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* of its diagnostic capabilities. *Parasitol.* 125: 51-57.

González A. C., Thomas M. C., Martínez E., Carmelo E., López M. C., Valladares B. 2003. Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*. *Parasitol.* En prensa.

González-Asequinolaza G., Taladriz S., Marquet A., Larraga V. 1999. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.* 259: 909-916.

Goodwin L. G. 1995. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89: 339-341.

Gorbalenya A. E., Koonin E. V. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 419-429.

Graves-Woodward K. L., Weller S. K. 1996. Replacement of gly⁸¹⁵ in helicase motif V alters the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of the Herpes simplex virus type 1 helicase-primase. *J. Biol. Chem.* 271: 13629-13635.

Grimaldi G., Tesh R. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 230-250.

Gross C. H., Shuman S. 1995. Mutational analysis of Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase II, a DEXH box RNA helicase. *J. Virol.* 69: 4727-4736.

Gururajan R., Mathews L., Longo F. J., Weeks D. L. 1994. An3 mRNA encodes an RNA helicase that colocalizes with nucleoli in *Xenopus* oocytes in a stage-specific manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2056-2060.

Gutierrez Y., Salinas G., Palma G., Valderrama L., Santrich C., Saravia N. G. 1991. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 281-289.

Handman E. 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* 44: 1-39.
Review.

Handman E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 229-243.

Haynes S R. 1997. Primary structure of *Drosophila* ribosomal protein L14 and identification of conserved protein motifs. *DNA sequence-The Journal of Sequencing and Mapping.* 8: 105-108.

Heinzel F. P., Sadick M. D., Mutha S. S., Locksley R. M. 1991. Production of interferon γ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7011-7015.

Heinzel F. P., Schoenhaut D. S., Rerko R. M., Rosser L. E., Gately M. K. 1993. Recombinant IL-12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 177: 1505-1509.

Herman R. 1980. Cytophilic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice. *Infect. Immun.* 28: 585-593.

Hermoso T., Fishelson Z., Becker S. I., Hirschberg K., Jaffe C. L. 1991. *Leishmania* protein-kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J.* 10: 4061-4067.

Herwaldt B. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354:1191-1199.

Himmelrich H., Launois P., Maillard I., Biedermann T., Tacchini-Cottier F., Locksley R. M., Rocken M., Louis J. A. 2000. In BALB/C mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J. Immunol.* 164: 4819-4825.

Hirling H., Scheffner M., Restle T., Stahl H. 1989. RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature*. 339: 562-564.

Holaday B. J., Pompem M. L., Geronimo S., Teixeira M. J., Souza A. Q., Vasconcelos A. W. 1993. Potencial role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala-azar. *J. Clin. Invest.* 92: 2626-2632.

Hommel M. 1999. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J. Infect.* 39: 101-111. Review.

Houghten R. A. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 5131-5135.

Irwin M. J., Heath W. R., Sherman L. A. 1989. Species-restricted interactions between CD8 and the $\alpha 3$ domain of class I influence the magnitude of the xenogenic response. *J. Exp. Med.* 170: 1091-1101.

Jaffe C. L., Zalis M. 1988. Use of purified proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 157: 1212-1220.

Jankovic D., Sher A., Yap G. 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 403-409. Review.

Julia V., Rassoulzadegan M., Glaichenhaus N. 1996. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*. 274: 421-423.

Kar K. 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 123-152.

Killick-Kendrick R. 1990. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1: 37-42. Review.

Killick-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17: 279-289.

Kim J. L., Morgenstern K. A., Griffith J. P., Dwyer M. D., Thomson J. A., Murcko M. A., Lin C., Caron P. R. 1998. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure.* 6: 89-100.

Konecny P., Stagg A. J., Jebbari H., English N., Davidson R. N., Knight S. C. 1999. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produced IL-12p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 29: 1803-1811.

Korolev S., Hsieh J., Gauss G. H., Lohman T. M., Waksman G. 1997. Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell.* 90: 635-647.

Kuroda M. I., Kernan M. J., Kreber R., Ganetzky B., Baker B. S. 1991. The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in *Drosophila*. *Cell.* 66: 935-947.

Laemmli U. K. 1975. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 277: 680-685.

Launois P., Maillard I., Pingel S., Swihart K. G., Xenarios I., Acha-Orbea H., Diggelmann H., Locksley R. M., MacDonald H. R., Louis J. A. 1997. IL-4 rapidly produced by V β 4-V β 8 CD4⁺ T cell instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity.* 6: 541-549.

Lee C. G., Hurwitz J. 1993. Human RNA helicase A is homologous to the maleless protein of *Drosophila*. *J Biol Chem.* 268: 16822-16830.

Lee C. G., Chang K. A., Kuroda M. I., Hurwitz J. 1997. The NTPase/helicase activities of *Drosophila* maleless, an essential factor in dosage compensation. *EMBO J.* 16: 2671-2681.

Lee C. G., Eki T., Okumura K., da Costa Soares V., Hurwitz J. 1998. Molecular analysis of the cDNA and genomic DNA encoding mouse RNA helicase A. *Genomics.* 47: 365-371.

Liang L., Diehl-Jones W., Lasko P. 1994. Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development.* 120: 1201-1211.

Liew F. Y., Li Y., Millott S. 1990. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* 145: 4306-4310.

Liew F. Y., Yang D. M., Severn A., Cox F. E. G. 1991. TNF- α reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunology.* 74: 304-309.

Liew F. Y., O'Donnell C. A. 1993. Immunology of Leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 32: 161-259.

Linder P., Lasko P. F., Ashburner M., Leroy P., Nielsen P. J., Nishi K., Schnier J., Slonimski P. P. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature.* 337: 121-122.

Lorenzi H. A., Vázquez M. P., Levin M. J. 2000. The genes for a DEAH RNA helicase, a NifU like protein and the translation factor eIF6 constitute the SZ5 locus of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111: 207-211.

MacFarlane J., Blaxter M. L., Bishop R. P., Miles M. A., Kelly J. M. 1990. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-KDa heat-shock protein family. *Eur. J. Biochem.* 190: 377-384.

Marañón C., Planelles L., Alonso C., López M. C. 2000. The heat shock protein 70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int. Immunol.* 12: 1685–1693.

Marañón C., Thomas M. C., Planelles L. López M. C. 2001. The immunization of A2/k(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T. cruzi* KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes. *Mol. Immunol.* 38: 279-287.

Martínez E., Thomas M. C., Alonso V., Carmelo E., González A. C., Del Castillo A., Valladares B. 2002. Cloning and molecular characterization of the DNA encoding histone H1 from *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.* 88:199-203

McMahon-Pratt D., Jaffe C. L., Grimaldi G. 1984. Application of monoclonal antibodies to the classification of *Leishmania* species. In: *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd edition, C.M. Morel editor. UNDP/World Bank/WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases-Finep, CNPq, FIOCRUZ, cap. 2.3, p. 121-135.

Medina-Acosta E., Cross G. A. M. 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 327-330.

Missel A., Nörskau G., Shu H. H., Göringer H. U. 1995. A putative RNA helicase of the DEAD box family from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75: 123-126.

Missel A., Souza A. E., Nörskau G., Göringer H. U. 1997. Disruption of a gene encoding a novel mitochondrial DEAD-box protein in *Trypanosoma brucei* affects edited mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4895-4903.

Missel A., Lambert L., Nörskau G., Göringer H. U. 1998. DEAD-box protein HEL64 from *Trypanosoma brucei*: subcellular localization and gene knockout analysis. *Parasitol Res.* 85: 324-330.

Momen H. 1984. Parasite characterization by zymodeme analysis. In: *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd edition, C.M. Morel editor. UNDP/World Bank/WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases-Finep, CNPq, FIOCRUZ, cap. 2.2, p. 111-120.

Montalban C., Calleja J. L., Erice A., Laguna F., Clotet B., Podzamczar D., Cobo J., Mallotas J., Yebra M., Gallego A. 1990. Visceral leishmaniasis in patients infeted with human immunodeficiency virus. Co-operative group for the study of leishmaniasis in AIDS. *J. Infect.* 21: 261-270.

Montenegro J. 1926. *Ann. Fac. Med. Univ. Sao Paulo.* 1: 323-330.

Montoya Y., Leon C., Talledo M., Nolasco O., Padilla C., Munoz-Najar U., Barker D. C. 1997. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91: 674–676.

Morris L., Troutt A. B., Handman E., Kelso A. 1992. changes in the precursor frequencies of IL-4 and INF- γ secreting CD4⁺ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 149: 2715-2721.

Morris L., Troutt A. B., McLeod K. S., Kelso A., Handman E., Aebischer T. 1993. Interleukin-4 but not interferon- γ production correlates with the severity of disease in murine cutaneous leishmaniasis. *Infec. Immun.* 61: 3459-3465.

Mosser D. M., Edelson P. J. 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.* 132: 1501-1505.

Niedenzu T., Röleke D., Bains G., Scherzinger E., Saenger W. 2001. Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *J. Mol. Biol.* 306: 479-487.

Noben-Trauth N., Kropf P., Muller I. 1996. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*. 271: 987-990.

Noben-Trauth N., Paul W. E., Sacks D. L. 1999. IL-4 and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J. Immunol.* 162: 6132-6140.

Organización Mundial de la Salud. 2000. Leishmaniasis and Leishmaniasis/HIV co-infection. En: WHO report on global surveillance of Epidemic-prone infectious diseases(WHO/CDS/CRS/ISR/2000.1).<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>.

Organización Mundial de la Salud. 2001. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://www.who.int/emc/diseases/leish>.

Ozbel Y., Turgay N., Ozensoy S., Ozbilgin A., Alkan M. Z., Ozcel M. A., Jaffe C. L., Schnnur L., Oskam L., Abranches P. 1995. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89: 89-93.

Paraguay de Souza E., Bernardo R. R., Palatnik M., Palatnik de Sousa C. B. 2001. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*. 19: 3104-3115.

Park A. Y., Hondowicz B. D., Scott P. 2000. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 165: 896-902.

Pause A., Methot N., Sonenberg N. 1993. The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol.* 13: 6789-6798.

Pearson R. D., Steigbigel R. T. 1980. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* 125: 2195-2201.

Pearson R., De Queiroz Sousa A. 1995. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 22:1-13.

Piñero J., Martínez E., Pacheco R., Aragón Z., de Armas F., Del Castillo A., Valladares B. 1999. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Tropic.* 73: 21-29.

Pirmez C., Yamamura M., Uyemura K., Paes-Oliveira M., Conceicao-Silva F., Modlin R. L. 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 91: 1390-1395

Pisa P., Gennene M., Soder O., Otthenhoff M., Hansson M., Kiessling R. 1990. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 161: 988-991.

Planelles L., Thomas M. C., Alonso C., Lopez M. C. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect. Immun.* 69: 6558-6563.

Probst P., Skeiky Y. A. W., Steeves M., Gervassi A., Grabstein K. H., Reed S. G. 1997. A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 27: 2634

Puentes S. M., Da Silva R. P., Sacks D. L., Hammer C. H., Joiner K. A. 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 145: 4311-4316.

Quijada L., Requena J. M., Soto M., Alonso C. 1996. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitol.* 112: 277-284.

Reed S. G., Shreffler W. G., Burns J. M., Scott J. M., Orge M. G., Ghalib H. W., Siddig M., Badaro R. 1990. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43: 632-639.

Reiner S. L., Zheng S., Wang Z. E., Stowring L., Locksley R. M. 1994. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* 179: 447-456.

Reiner S. L., Locksley R. M. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 151-177.

Rey-Ladino J. A., Joshi P. B., Singh B., Gupta R., Reiner N. E. 1997. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp. Parasitol.* 85: 249-263.

Rezai H. R., Ardekali S. M., Amirhakimi G., Kharazmi A. 1978. Immunological features of kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1079-1083.

Rico A. I., Angel S. O., Alonso C., Requena J. M. 1999. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol. Immunol.* 36: 1131-1139.

Riera C., Valladares J. E., Gallego M., Aisa M. J., Castillejo S., Fisa R., Ribas N., Carrio J., Alberola J., Arboix M. 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84: 33-47.

Romagnani S. 1997. Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today.* 18: 263-266.

Rutgers C. A., Schaap P. J., Van't Riet J., Woldringh C. L., Raue H. A. 1990. In vivo and in vitro analysis of structure-function relationships in ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta.* 1050:74-79.

Rutgers C. A., Rientjes J. M., Van't Riet J., Raue H. A. 1991. rRNA binding domain of yeast ribosomal protein L25. Identification of its borders and a key leucine residue. *J. Mol. Biol.* 218: 375-385.

Rychlik W., Spencer W. J., Rhoad R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* 18: 6409-6412.

Sacks D. L., Lata Lal S., Shrivastava S. N., Blackwell J., Neva F. A. 1987. An analysis of T cell responsiveness in Indian Kala-azar. *J Immunol.* 138: 908-913.

Sacks D., Noben-Trauth N. 2002a. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 845-858. Review.

Sacks D., Sher A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3: 1041-1047. Review.

Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. F. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.

Schaap P. J., Van't Riet J., Woldringh C. L., Raue H. A. 1991. Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 221: 225-237.

Scharton-Kersten T., Alonso L. C. C., Wysocka M., Trinchieri G., Scott P. 1995. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 154: 5320.

Scott P., Natovitz P., Coffman R. L., Pearce E., Sher A. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* 168: 1675-1684.

Scott P., Hunter C. A. 2002. Dendritic cell and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 466-470. Review.

Shreffler W. G., Burns J. M., Badaro R., Ghalib H. W., Button L. L., McMaster R. W., Reed S. G. 1993. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J. Infect. Dis.* 167: 426-430.

Singh-Jasuja H., Hilf N., Arnold-Schild D., Schild H. 2001. The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol. Chem.* 382: 629-636.

Sjölander A., Baldwin T. M., Curtis J. M., Handman E. 1998. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response is required for generation of immunity to leishmaniasis. *J. Immunol.* 160: 3949-3957.

Skeiky Y. A., Benson D. R., Guderian J. A., Whittle J. A., Bacelar O., Carvalho E. M., Reed S. G. 1995. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect. Immun.* 63: 4105-4114.

Skeiky, Y. A. W., Guderian J. A., Benson D. R., Bacelar O., Carvalho E. M., Kubin M., Badaro R., Trinchieri G., Reed S. G. 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cell to express a Th1-type cytokine proliferate and to produce interleukin 12. *J. Exp. Med.* 181: 1527-1537.

Skeiky Y. A. W., Kennedy M., Kaufman D., Borges M. M., Guderian J. A., Scholler J. K., Owendale P. J., Picha K. S., Morrissey P. J., Grabstein K. H., Campos-Neto A., Reed S. G. 1998. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine proliferate. *J. Immunol.* 161: 6171-6179.

Slappendel R. J., Teske E. 1997. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonite (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet. Q.* 19: 10-13.

Solbach W., Laskay T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* 74: 275-317. Review.

Soloz N., Blum-Tirouvanziam U., Jacquet R., Rafati S., Corradin G., Mauël J., Fasel N. 1999. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 18: 850-859.

Soto M., Requena J. M., Gomez L. C., Navarrete I., Alonso C. 1992. Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigen identified as histone H2A. *Eur. J. Biochem.* 205: 211–216.

Soto M., Requena J. M., García M., Gómez L. C., Navarrete I., Alonso C. 1993. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal protein of *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 268: 21835-21843.

Soto M., Requena J.,M., Alonso C. 1993b. Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal P0 protein genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 265-274.

Soto M., Requena J. M., Morales G., Alonso C. 1994. The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1219: 533–535.

Soto M., Requena J. M., Quijada L., Angel S. O., Gómez L. C., Guzman F., Patarroyo M. E., Alonso C. 1995. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin. Exp. Immunol.* 100: 246-252.

Soto M., Requena J. M., Quijada L., Guzman F., Patarroyo M. E., Alonso C. 1995b. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 48: 23-28.

Soto M, Requena J. M., Quijada L., Garcia M., Guzman F., Patarroyo M. E., Alonso C. 1995c. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania*

infantum histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 48: 209–214.

Soto M., Requena J. M., Quijada L., Alonso C. 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3: 387-391.

Soto M., Requena J. M., Quijada L., Gomez L. C., Guzman F., Patarroyo M. E., Alonso C. 1996b. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 106: 454–461.

Soto M., Requena J. M., Quijada L., Perez M. J., Nieto C. G., Guzman F., Patarroyo M. E., Alonso C. 1999. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 115: 342–349.

Soto M., Alonso C., Requena J. M. 2000. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein LiP2a induces a prominent humoral response in vivo and stimulates cell proliferation in vitro and interferon-gamma (INF-gamma) production by murine splenocytes. *Clin Exp Immunol.* 122: 212-218.

Soultanas P., Dillingham M. S., Velankar S. S., Wigley D. B. 1999. DNA binding mediates conformational changes and metal ion coordination in the active site of PcrA helicase. *J. Mol. Biol.* 290: 137-148.

Southern E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 98: 503-517.

Stamm L. M., Satoskar A. A., Ghosh S. K., David J. R., Satoskar A. R. 1999. STAT-4 mediated IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 29: 2524-2529.

Stevens T. L., Bossie A., Sander V. M., Fernández-Botran R., Coffman R. L., Mosmann T. R. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*. 334: 255-258.

Stobie L., Gurunathan S., Prussin C., Sack D. L., Glaichenhaus N., Wu C. Y., Seder R. A. 2000. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 8427-8432.

Story R. M., Li H., Abelson J. N. 2001. Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 1465-1470.

Subramanya H. S., Bird L. E., Brannigan J. A., Wigley D. B. 1996. Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature*. 384: 379-383.

Suzue K., Richard A. 1996. Adjuvant-free Hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J. Immunol*. 156, 873-879.

Swihart K., Fruth U., Messmer N., Hug K., Behin R., Huang S. 1995. Mice from genetically resistant background lacking the interferon- γ receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response. *J. Exp. Med*. 181: 961-971.

Sypek J. P., Chung C. L., Mayor S. E., Subramanyam J. M., Goldman S. J., Sieburth D. S., Wolf S. F., Schaub R. G. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: IL-12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med*. 177: 1797-1802.

Tabor S., Richardson C. 1995. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 6339-6343.

Tanner N. K., Linder P. 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell.* 8: 251-262.

Theis K., Chen P. J., Skorvaga M., Van Houten B., Kisker C. 1999. Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *EMBO J.* 18: 6899-6907.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.

Ulrick M., Rodriguez V., Centeno M. 1996. The humoral response in leishmaniasis: In: Tapia F. J., Cáceres Dittmar G., Sánchez M., eds. Molecular and immune mechanism in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. New York: Chapman and Hall. 189-202.

Voller A., Savigny D. 1981. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. *J. Immunol. Methods.* 46: 1-29.

Von Stebut E., Belkaid Y., Nguyen B. V., Cushing M., Sacks D. L., Udey M. C. 2000. *Leishmania major*-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 30: 3498-3506.

Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinase and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.

Weitzmann C. J., Cooperman B. S. 1990. Reconstitution of *Escherichia coli* 50S ribosomal subunits containing puromycin-modified L23: functional consequences. *Biochemistry.* 29: 3458-3465.

WHO. 2000. Leishmaniasis Fact Sheet.

Yao N., Hesson T., Cable M., Hong Z., Kwong A. D., Le H. V., Weber P. C. 1997. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat. Struct. Biol.* 4: 463-467.

Young D. B. 1992. Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 396-400.

Zambrano-Villa S., Rosales-Borjas D., Carrero J. C., Ortiz-Ortíz L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18: 272-278. Review.

Zemzoumi K., Guilvard E., Sereno D., Preto A., Benlemlih M., Cordeiro da Silva A., Lemesre J., Ouaisi A. 1999. Cloning of a *Leishmania major* gene encoding for an antigen with extensive homology to ribosomal protein S3a. *Gene.* 240: 57-65.

Zhang S., Maacke H., Grosse F. 1995. Molecular cloning of the gene encoding nuclear DNA helicase II. A bovine homologue of human RNA helicase A and *Drosophila* Mle protein. *J Biol Chem.* 270: 16422-16427.

Zhang S., Grosse F. 1997. Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J. Biol. Chem.* 272: 11487-11494.

Zhang S., Herrmann C., Grosse F. 1999. Nucleolar localization of murine nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J. Cell Sci.* 112: 2693-2703.

Zhang S., Buder K., Burkhardt C., Schlott B., Gorchach M., Grosse F. 2002. Nuclear DNA helicase II/RNA helicase A binds to filamentous actin. *J. Biol. Chem.* 277: 843-853.

Zurita A. I., Rodríguez J., Piñero J. E., Pacheco R., Carmelo E., Del Castillo A., Valladares B. 2003. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* HSP70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J. Parasitol.* 89: 372-378.

Zwingenberger K., Harms G., Pedrosa C., Omena S., Sandkramp B., Neifer S. 1990. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis. Evidence for predominance of endogeneous IL4 over IFN-gamma production. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57: 242- 249.