

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Búsqueda de proteínas antigénicas  
de *Leishmania braziliensis*.  
Aislamiento, caracterización génica  
y utilidad serodiagnóstica de la proteína  
de choque térmico de 70 kDa (Hsp70)**

**Autor: Zurita Novaro, Ada Irene**

**Directores: Antonio del Castillo Remiro,  
Basilio Valladares Hernández  
y José María Fernández-Palacios Martínez**

**Departamento de Parasitología, Ecología y Genética**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Leishmaniasis.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 El parásito: <i>Leishmania</i> spp.....	12
1.1.2 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. ....	13
1.1.3 Patología de la leishmaniasis. ....	14
1.1.4 Epidemiología y distribución geográfica de la leishmaniasis.....	18
1.1.5 Diagnóstico de la leishmaniasis .....	20
1.1.6 Tratamiento de la leishmaniasis .....	22
<b>1.2 Biología molecular de los Tripanosomátidos .....</b>	<b>25</b>
1.2.1 El genoma de los tripanosomátidos.....	25
1.2.2 Transcripción en los tripanosomátidos.....	26
1.2.3 Procesamiento del ARN en los tripanosomátidos.....	27
<b>1.3 Proteínas de choque térmico .....</b>	<b>29</b>
1.3.1 Generalidades .....	29
1.3.2 Funciones.....	30
1.3.3 Respuesta de choque térmico en parásitos .....	31
1.3.4 Antigenicidad de las proteínas de choque térmico en parásitos .....	33
<b>1.4 Proteínas de choque térmico de 70 kDa: Hsp70 .....</b>	<b>34</b>
1.4.1 Generalidades y mecanismo de acción .....	34
1.4.2 Utilidad diagnóstica y propiedades inmuno-moduladoras de la Hsp70 .....	39
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Productos químicos.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Cepas de parásitos .....</b>	<b>45</b>
<b>2.3 Cepas bacterianas .....</b>	<b>45</b>
<b>2.4 Cultivo de parásitos .....</b>	<b>46</b>

2.4.1 Medio de cultivo de <i>Leishmania</i> .....	46
2.4.2 Medio de cultivo de <i>Trypanosoma</i> .....	47
2.4.3 Condiciones de cultivo de las cepas de parásitos .....	47
<b>2.5 Cultivo de las cepas bacterianas</b> .....	<b>48</b>
2.5.1 Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	48
2.5.2 Condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	48
<b>2.6 Aislamiento de ADN</b> .....	<b>49</b>
2.6.1 Aislamiento de ADN genómico de <i>Leishmania</i> de alto peso molecular.....	49
2.6.2 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> .....	49
2.6.3 Aislamiento de ADN de bacteriófago $\lambda$ .....	50
<b>2.7 Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas</b> .....	<b>51</b>
2.7.1 Digestión del ADN con Endonucleasas de Restricción .....	51
2.7.2 Tratamiento con fosfatasa alcalina .....	51
2.7.3 Ligación de fragmentos de ADN .....	52
<b>2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....	<b>52</b>
<b>2.9 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa</b> .....	<b>54</b>
<b>2.10 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa</b> .....	<b>55</b>
<b>2.11 Transformación de ADN en <i>E. coli</i></b> .....	<b>56</b>
2.11.1 Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes .....	56
2.11.2 Transformación de células bacterianas competentes .....	56
2.11.3 Selección de los clones transformantes de <i>E. coli</i> .....	57
<b>2.12 Secuenciación de ADN</b> .....	<b>57</b>
2.12.1 Reacción de secuenciación .....	57
2.12.2 Electroforesis .....	58
<b>2.13 Clones recombinantes cedidos</b> .....	<b>59</b>
<b>2.14 Detección de secuencias de ADN específicas</b> .....	<b>59</b>
2.14.1 Inmovilización de ácidos nucleicos: Transferencia del ADN .....	59
2.14.2 Marcaje de sondas con digoxigenina .....	60

2.14.3 Marcaje de sondas con isótopos radiactivos ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ).....	60
2.14.4 Hibridación ADN:ADN con sondas marcadas con digoxigenina .....	60
2.14.5 Hibridación ADN:ADN con sondas marcadas radiactivamente .....	61
<b>2.15 Screening en una genoteca de ADN genómico de <i>Leishmania braziliensis</i>.</b>	<b>61</b>
2.15.1 Titulación de la genoteca .....	62
2.15.2 <i>Screening</i> de la genoteca.....	62
<b>2.16 Obtención de extractos proteicos totales de <i>Leishmania braziliensis</i> y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>2.17 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....</b>	<b>64</b>
<b>2.18 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida .....</b>	<b>65</b>
<b>2.19 Inmunodetección de proteínas fijadas en membrana (<i>Western-blot</i>).....</b>	<b>65</b>
2.19.1 Electro-tranferencia de proteínas a membrana .....	66
2.19.2 Inmunodetección de proteínas inmovilizadas en membrana.....	66
<b>2.20 Muestras biológicas .....</b>	<b>67</b>
<b>2.21 Preabsorción de los sueros.....</b>	<b>68</b>
<b>2.22 Análisis densitométrico .....</b>	<b>69</b>
<b>2.23 Purificación de proteínas desde geles de SDS-poliacrilamida:</b>	
<b>Electroelución .....</b>	<b>69</b>
<b>2.24 Diálisis de disoluciones de proteínas .....</b>	<b>69</b>
<b>2.25 Obtención de anticuerpos policlonales en conejo .....</b>	<b>70</b>
<b>2.26 Inducción, solubilización y purificación de proteínas recombinantes .....</b>	<b>71</b>
2.26.1 Ensayo de inducción de las proteínas recombinantes .....	71
2.26.2 Solubilización de las proteínas recombinantes en condiciones desnaturalizantes .....	72
2.26.3 Solubilización de las proteínas recombinantes en condiciones no desnaturalizantes .....	73
2.26.4 Purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a $\text{Ni}^{2+}$ .....	74

2.27 ELISA .....	75
2.28 Determinación de auto-anticuerpos en suero .....	76
2.29 Análisis informático.....	76
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1 Identificación de proteínas antigénicas específicas de <i>Leishmania braziliensis</i>, útiles para el diagnóstico .....</b>	<b>77</b>
3.1.1 Establecimiento de los patrones proteicos de <i>L. braziliensis</i> y <i>T. cruzi</i> .....	77
3.1.2 Análisis de <i>Western-blot</i> frente a antígenos totales de <i>L. braziliensis</i> .....	79
3.1.3 Análisis de <i>Western-blot</i> frente a antígenos totales de <i>T. cruzi</i> .....	81
3.1.4 Análisis de inmunoblot con los sueros preabsorbidos frente a antígenos totales de <i>L. braziliensis</i> .....	82
3.1.5 Seroreactividad de antígenos de <i>L. braziliensis</i> y de <i>T. cruzi</i> frente a más sueros.....	84
<b>3.2 Purificación de las proteínas de <i>L. braziliensis</i> pLb70, pLb87 y pLb99. Obtención de anticuerpos policlonales.....</b>	<b>89</b>
3.2.1 Aislamiento y purificación de pLb70, pLb87 y pLb99 .....	89
3.2.2 Reactividad de sueros con LC, LMC y Chagas frente a las proteínas purificadas pLb70, pLb87 y pLb99.....	91
3.2.3 Obtención de anticuerpos anti-pLb70, anti-pLb87 y anti-pLb99.....	93
3.2.4 Microsecuenciación de pLb70, pLb87 y pLb99.....	95
<b>3.3 Aislamiento y caracterización del gen <i>HSP70</i> de <i>L. braziliensis</i>.....</b>	<b>99</b>
3.3.1 Aislamiento y subclonaje del ADN genómico que codifica la proteína Hsp70.....	99
3.3.2 Caracterización teórica y estudio de homología de secuencia de la proteína Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> .....	105
3.3.3 Organización genómica del gen <i>HSP70</i> de <i>L. braziliensis</i> .....	111

<b>3.4 Estudio de la respuesta inmune humoral frente a la Hsp70 de <i>L. braziliensis</i>.</b>	
<b>Mapeo antigénico</b> .....	115
3.4.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> .....	115
a) Subclonaje del gen <i>HSP70</i> en el vector de expresión pQE <sub>30</sub> .....	115
b) Inducción y solubilización de la proteína Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> en condiciones desnaturalizantes.....	117
c) Purificación de rLb70 mediante cromatografía de afinidad a Ni <sup>2+</sup> .....	118
3.4.2 Respuesta humoral frente a la proteína recombinante rLb70 de <i>L. braziliensis</i> .....	119
3.4.3 Expresión y purificación de cinco fragmentos recombinantes de la Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> .....	126
a) Clonaje de cinco fragmentos de la Hsp70 en vectores de expresión.....	126
b) Inducción de los fragmentos recombinantes de la Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> .....	128
c) Solubilización y purificación de los fragmentos recombinantes de la Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> en condiciones desnaturalizantes.....	129
3.4.4 Mapeo antigénico de la Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> . Respuesta humoral frente a los fragmentos recombinantes.....	131
3.4.5 Solubilización, purificación y respuesta humoral del fragmento recombinante rLb70(513-663) en condiciones no desnaturalizantes.....	139
3.4.6 Hsp70 y autoinmunidad .....	142
3.4.7 Discusión general: respuesta humoral frente a la Hsp70 de <i>L. braziliensis</i> ...	145
<b>4. ANEXO. SUEROS UTILIZADOS</b> .....	151
<b>4.1 Respuesta humoral de los sueros de pacientes con LMC y LC frente a antígenos totales de <i>L. braziliensis</i></b> .....	151
<b>4.2 Respuesta humoral de los sueros de pacientes con Chagas crónico y LV frente a antígenos totales de <i>L. braziliensis</i></b> .....	156

<b>4.3 Respuesta humoral de los sueros control negativos frente a antígenos totales de <i>L. braziliensis</i> .....</b>	<b>158</b>
<b>4.4 Sueros de pacientes con desórdenes de autoinmunidad.....</b>	<b>158</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>185</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**





## 1. INTRODUCCIÓN.

Con el nombre general de tripanosomátidos se conoce a los miembros de la familia *Trypanosomatidae*. Esta familia se enclava en el orden *Kinetoplastida*, el cual está constituido por protozoos ampliamente distribuidos en la naturaleza, y que se han descrito como parásitos de todo tipo de organismos superiores, desde plantas hasta vertebrados, incluyendo invertebrados.

El orden *Kinetoplastida* recibe su nombre de una estructura denominada kinetoplasto, que es una organela localizada adyacente al cuerpo basal del flagelo. Representa la única mitocondria del organismo y está compuesta por una forma diferente de ADN (kADN) que consiste en miles de copias de minicírculos ( $10^4$ ) y algunas copias de maxicírculos (25-30), concatenadas en patrones muy complejos formando una red, característicos de cada especie (Chen y col., 1995).

Dentro de la familia *Trypanosomatidae* destacan por su importancia sanitaria los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. Estos son organismos parásitos que presentan un ciclo de vida diheteroxeno, es decir, necesitan para su desarrollo dos hospedadores diferentes: un insecto vector y un hospedador vertebrado.

Los *Trypanosomatidae* han divergido de la línea principal eucariótica antes que las plantas, animales y hongos, según se infiere de los árboles filogenéticos construidos con secuencias ribosomales (Sogin y col., 1986) y presentan ciertas características que no se encuentran en organismos superiores. Evolutivamente, representan un estadio intermedio entre los eucariotas verdaderos y los procariotas. Esto se debe a que, aunque presentan un núcleo bien definido, mitocondria y cromosomas empaquetados con histonas análogas a las de los eucariotas más desarrollados, también poseen características de las eubacterias, como la carencia de intrones y la transcripción policistrónica.

### 1.1 Leishmaniasis.

La Organización Mundial de la Salud da el nombre de leishmaniasis a las infecciones producidas por protozoos intracelulares obligados del género *Leishmania*. Es una enfermedad caracterizada por su diversidad y su complejidad, tanto en el número de especies causantes de la misma, unas 21, como en la variedad de los síndromes asociados a ellas. Diferentes formas clínicas se agrupan bajo el término leishmaniasis: mucosa (LMC),

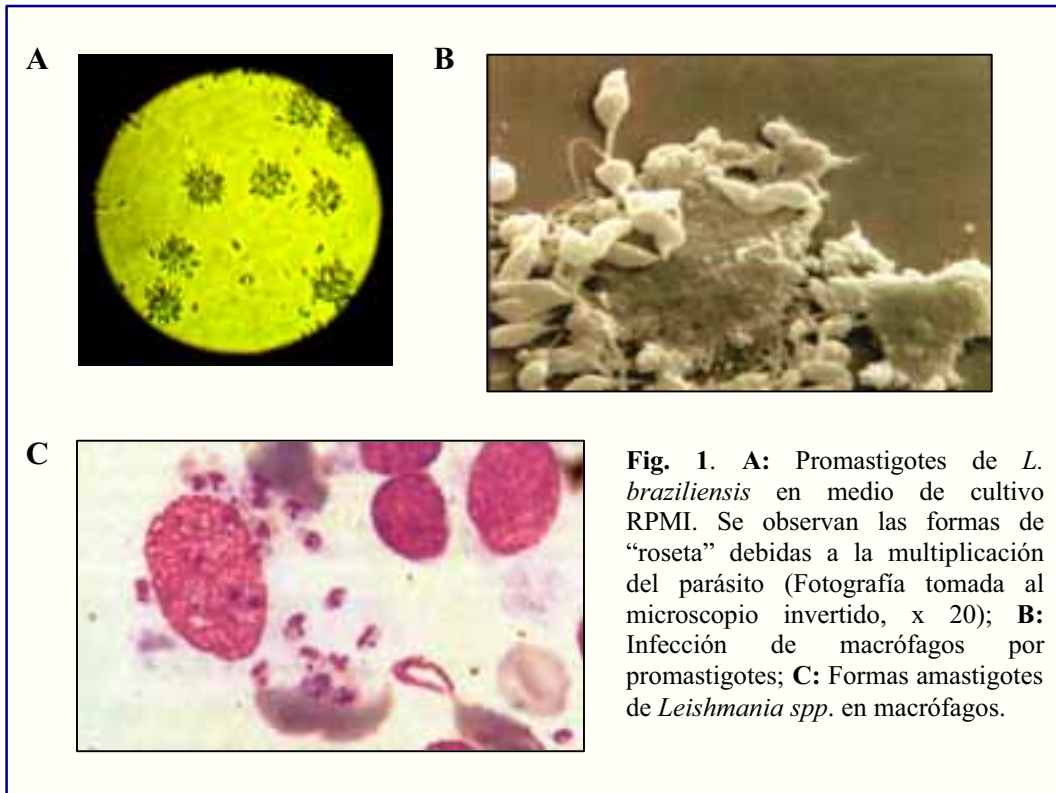
cutánea (LC) y visceral (LV), que resultan de la replicación del parásito en macrófagos de la mucosa naso-orofaríngea, de la dermis o del sistema fagocítico mononuclear, respectivamente.

La leishmaniasis es endémica en zonas rurales y periurbanas de 88 países de áreas tropicales y subtropicales. Las zonas afectadas comprenden desde el norte de Argentina al sur de Tejas, en Estados Unidos, el sur de Europa, Asia (excepto el Sudeste Asiático), Oriente Medio y todo el noreste africano. Se estima que el número de personas en el mundo que actualmente están en riesgo de padecer la enfermedad es de 350 millones. La transmisión de la leishmaniasis es debida a la picadura de la hembra infectada de mosquito de los géneros *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo), de los que más de 30 especies actúan como vectores. Se encuentran en las regiones inter-tropicales y templadas de todo el mundo.

### **1.1.1 El parásito: *Leishmania spp.***

Los parásitos de todas las especies de *Leishmania* son morfológicamente similares, por lo que cuando es necesaria una identificación a nivel de especie hay que recurrir a la caracterización genética o bioquímica.

Es un parásito diheteroxeno y polimórfico, en cuyo ciclo biológico hay dos estadios principales: amastigota y promastigota. Los amastigotas son intracelulares, redondeados o fusiformes, con un diámetro de unos 5  $\mu\text{m}$ . Tienen un único núcleo, un kinetoplasto y un reservorio flagelar donde se encuentran los rudimentos de un flagelo. Es la forma en que se encuentran en los monocitos y macrófagos del hospedador vertebrado, donde se dividen activamente hasta que rompen las células e invaden otras células vecinas. Los promastigotes se encuentran en el intestino del mosquito vector. Son alargados, con un núcleo central y un kinetoplasto terminal, con un flagelo bien desarrollado que usan tanto para la propulsión como para fijarse a las microvellosidades del intestino del mosquito. Tanto los amastigotes como los promastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria longitudinal (Fig. 1).

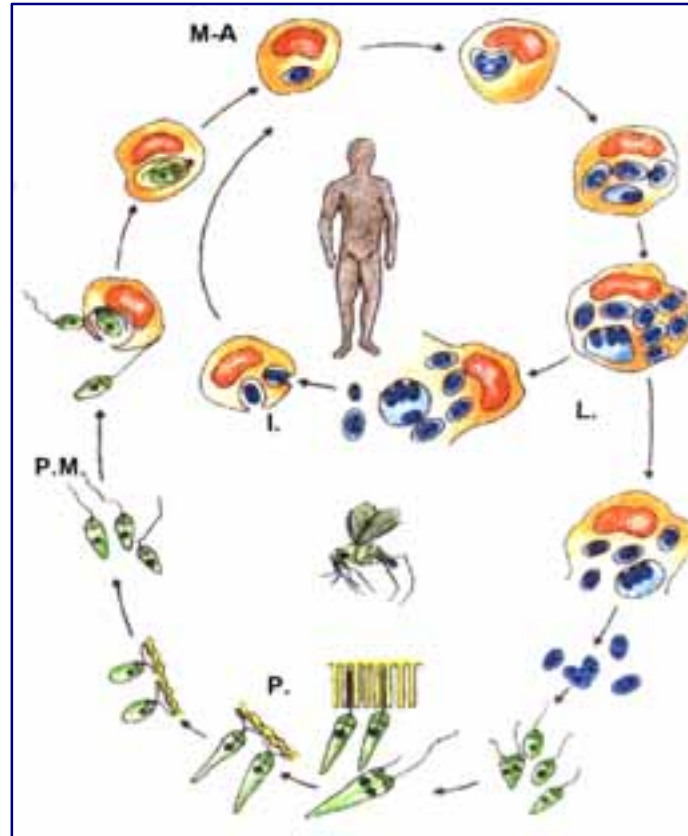


### 1.1.2 Ciclo biológico de *Leishmania spp.*

El ciclo biológico comienza cuando la hembra del mosquito portadora del parásito pica a un hospedador vertebrado, inyectándole la forma infectiva que es el estadio de promastigote. Éstos son rápidamente fagocitados por los macrófagos del hospedador y se desarrollan hasta amastigotes en el interior de los fagolisosomas (Fig. 2, M-A), donde se han adaptado para sobrevivir y multiplicarse en medio ácido. La multiplicación de los parásitos lisa los macrófagos liberando los amastigotes que infectan nuevas células (Fig. 2, L). En el caso de la leishmaniasis visceral, los primeros macrófagos infectados abandonan la piel y se distribuyen por órganos internos como bazo, hígado, nódulos linfáticos y médula ósea, donde establecen la infección (Fig. 2, I). En cambio, si los amastigotes son liberados en la piel, la infección de nuevos macrófagos causará leishmaniasis cutánea o mucocutánea.

El mosquito, al ingerir sangre del hospedador infectado, toma amastigotes libres o bien macrófagos infectados, que evolucionan a promastigotes en el tracto digestivo del vector en un proceso que lleva alrededor de 3 días (Fig. 2, P). Tras días o semanas, como resultado de la fisión binaria, los promastigotes obstruyen parcialmente el tracto digestivo

del mosquito. Algunos de estos promastigotes evolucionan a promastigotes metacíclicos, muy móviles, que son los responsables de iniciar la infección cuando el mosquito pica a un nuevo hospedador vertebrado (Fig. 2, P. M.).



**Fig. 2.** Ciclo biológico de *Leishmania* spp. **P:** formas promastigotes de *Leishmania*; **P.M.:** formas promastigotes metacíclicos; **M-A:** amastigotes en el interior de los macrófagos; **L.:** lisis de los macrófagos y liberación de amastigotes; **I.:** establecimiento de la infección. (Modificado de Chang, 1985).

El ciclo epidemiológico de la leishmaniasis se ve complicado por la abundancia de reservorios que puede presentar. En la mayoría de las especies, son animales que garantizan la existencia del parásito en una determinada zona y actúan como fuente de transmisión para los humanos. El principal animal reservorio implicado en la transmisión de la leishmaniasis visceral y cutánea es el perro, aunque también participan roedores, zorros, monos, marsupiales, asnos y otros mamíferos (Ashford, 2000).

### 1.1.3 Patología de la leishmaniasis.

La patología de la leishmaniasis está determinada principalmente por el establecimiento de la infección en los macrófagos y otras células del sistema mononuclear fagocítico. Puesto que son células del sistema inmune, la enfermedad va a causar

alteraciones inmunitarias (Carvalho y col., 1987). La presencia de células infectadas en los diferentes órganos o tejidos y su destrucción, da lugar a procesos necróticos, inflamatorios y degenerativos de los tejidos afectados. Estos mecanismos actúan con intensidad y efectividad muy variable dependiendo de las características del parásito y del hospedador, lo que da lugar a diferentes cuadros clínicos y a diversos grados de reactividad, que oscilan desde formas anérgicas, con gran proliferación del parásito sin apenas reacción orgánica, hasta formas hiper-reativas con escasa parasitación pero con una elevada alteración orgánica (Ridley, 1987).

La leishmaniasis, según las manifestaciones clínicas que puede presentar, se clasifica en:

#### **A) Leishmaniasis visceral.**

Es producida por *L. chagasi*, *L. infantum* y *L. donovani*, en cuyo caso se denomina Kala azar. Mientras que *L. donovani* afecta a personas de todas las edades, está principalmente restringida a niños en aquellos casos causados por *L. infantum*, aunque también afecta a personas adultas, sobre todo las que sufren enfermedades inmunosupresoras. A veces está precedida por una lesión seca o ulcerativa en el sitio de la picadura infectiva. Los síntomas incluyen fiebre intermitente, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia y caquexia progresiva. Estos síntomas se pueden presentar en un período que varía desde semanas hasta años después de la infección. Otros síntomas menos comunes son linfadenopatía y diarrea persistente. El desenlace de la leishmaniasis visceral suele ser la muerte, debida generalmente a una infección concomitante, dado el débil estado inmunológico del paciente. Sin embargo, hay evidencias de que muchas personas infectadas nunca llegan a desarrollar la enfermedad, y se curan espontáneamente (Ali y Ashford, 1994). La proporción de estos casos subclínicos varía entre casi un 100% en infecciones en adultos por *L. infantum*, a menos del 25% durante las epidemias de Kala azar en África.

La coinfección *Leishmania*/VIH se ha revelado en los últimos años como un importante problema de salud en el sudoeste de Europa y de África (WHO,1998). Por una parte, individuos que presentan inmunodepresión desarrollan rápidamente una LV tras la picadura del mosquito portador; por otra parte, el cuadro de LV acelera la evolución desde VIH hasta SIDA en las personas que lo padecen. Esto se refuerza ya que ambos patógenos atacan células del sistema inmune y estimulan la misma respuesta Th2, que causa

exacerbación de la enfermedad (Alvar y col., 1997, Mosier y Sieburg, 1994). *L. infantum* es el tercer parásito más frecuentemente encontrado en pacientes VIH positivos, detrás de *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium parvum* (WHO, 1995).

### **B) Leishmaniasis cutánea.**

En el Viejo Mundo se la conoce como Botón de Oriente y es causada por *L. trópica*, *L. major* y *L. aethiopica*, aunque se han encontrado casos de LC por *L. infantum*. En América, o Nuevo Mundo, los agentes causales son las especies del complejo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*) y las del subgénero *Viannia*, también denominado complejo *L. braziliensis* (*L.[V] braziliensis*, *L.[V] panamensis*, *L.[V] guyanensis* y *L.[V] peruviana*). Recibe diferentes denominaciones según la zona geográfica y las manifestaciones clínicas que presente, como pueden ser Úlcera del chiclero, por ser una enfermedad común entre los recolectores de caucho, o Uta, que es como se denomina en los valles del altiplano peruano.

La lesión comienza en el sitio de la picadura, como una roncha que se agranda y enrojece gradualmente, pero sin causar dolor. A continuación, la afluencia de leucocitos a la zona infectada produce la necrosis de los tejidos y la formación de un granuloma (Fig. 3). El proceso necrótico puede ser muy rápido, causando una herida amplia, abierta y húmeda (especialmente las causadas por *L. major*, *L. panamensis* y *L. braziliensis*) o una lesión menos grave, sin una ulceración tan marcada (*L. trópica*, *L. aethiopica* y *L. peruviana*). Estas lesiones se suelen curar sin tratamiento, en un período de tiempo que varía enormemente dependiendo del parásito y del sitio de la lesión. Del mismo modo, el tamaño de la lesión puede variar desde pocos milímetros hasta varios centímetros de diámetro, y aunque no es usual, pueden encontrarse numerosas lesiones simultáneamente en un mismo paciente.



**Fig. 3.** Lesión típica de leishmaniasis cutánea: Botón de Oriente.

La LC no suele producir síntomas sistémicos, pero en la causada por *L. guyanensis* se puede producir inflamación de los ganglios linfáticos y las lesiones se pueden diseminar por los conductos linfáticos. El Botón de Oriente causado por *L. tropica* o *L. major* no suele producir una respuesta serológica apreciable (Ashford, 2000).

### C) Leishmaniasis mucocutánea.

La leishmaniasis mucocutánea es conocida como Espundia en las zonas endémicas y está restringida a la infección con *L. braziliensis*. Tras la aparente resolución de la lesión cutánea inicial, se producen lesiones metastásicas, muchas veces hasta varios años después, por la diseminación a través del sistema linfático o sanguíneo de amastigotes del parásito desde la piel hasta la mucosa naso-orofaríngea. Hay una progresiva destrucción de la mucosa nasal, así como del paladar blando y duro, destruyéndose incluso el septo nasal (Fig. 4). Los parásitos son difíciles de encontrar en estas lesiones, pero un historial de LC junto con una serología positiva son evidencias importantes.

La LMC está asociada a la migración intermitente o colonización de áreas poco exploradas de la selva asociada a actividades como la explotación de oro, madera, petróleo, el trazo de nuevas vías de penetración, agricultura, cacería, etc. La desfiguración del rostro, por las lesiones mutilantes producidas, hace que el paciente sea socialmente discriminado en el trabajo y en su comunidad, convirtiéndose esta enfermedad en un problema laboral.



Fig. 4. Lesiones típicas de leishmaniasis mucocutánea o Espundia.

Aunque no se conocen bien los factores de riesgo asociados con el padecimiento de la LMC, se la ha relacionado con la posesión de determinados alelos de los genes codificantes de los Factores de Necrosis Tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (Cabrera y col., 1995).



#### **D) Leishmaniasis dérmica post-Kala azar.**

La leishmaniasis dérmica post-Kala azar (LDPK) es normalmente una secuela del Kala azar que suele aparecer en los dos años después de haber sido curada con un tratamiento farmacológico, y comienza con la aparición de un moteado característico en la piel, con aspecto pecoso.

#### **E) Leishmaniasis cutánea difusa.**

La leishmaniasis cutánea difusa (LCD) es una manifestación de la infección con parásitos que normalmente causan una simple LC, generalmente *L. aethiopica*, asociada con una anergia específica o una pérdida de respuesta inmunológica. Se caracteriza por un engrosamiento muy diseminado de la piel en placas, pápulas o nódulos múltiples, especialmente en la cara y en la superficie exterior de los miembros, que hace que recuerde a la lepra lepromatosa. En este caso no hay ulceración y los parásitos son muy numerosos en las lesiones. (Fig. 5).



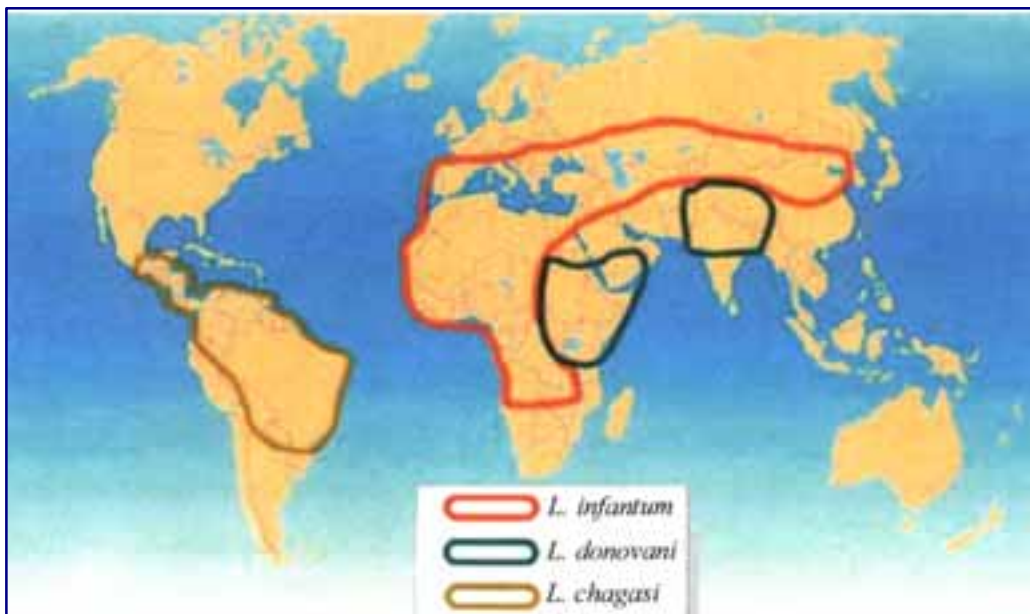
**Fig. 5.** Leishmaniasis cutánea difusa causada por *L. aethiopica*.

#### **1.1.4 Epidemiología y distribución geográfica de la leishmaniasis.**

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 88 países de todo el mundo, de los que 72 están en vías de desarrollo, con unos 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad; sólo el Sudeste Asiático y Australasia están libres de la enfermedad. Se cree que hay en el mundo unos 12 millones de personas afectadas de leishmaniasis, incluyendo aquellos que no presentan la enfermedad de forma aparente. De los 2 millones de nuevos casos que se estima que se producen anualmente, sólo se declaran

oficialmente unos 600.000, ya que esta enfermedad es de declaración obligatoria sólo en 32 de los 88 países endémicos (WHO, 2000).

De los 2 millones anuales de nuevos casos, 500.000 son de LV, y se concentran principalmente en África Oriental (Sudán y Kenia) y en el subcontinente indio: Bangladesh, noreste de la India y Nepal. La LV infantil se localiza en la cuenca mediterránea y su incidencia ha aumentado enormemente entre adultos infectados con el VIH. Finalmente, un buen número de casos se detecta también en el noreste de Brasil (Fig. 6).



**Fig. 6.** Distribución mundial de la LV y de las especies de *Leishmania* causantes de la misma.

El número de nuevos casos de leishmaniasis cutánea se estima entre 1-1,5 millones, el 90% de los cuales se localizan en Afganistán, Brasil, Perú, Arabia Saudí y Siria (Fig. 7). La LC en el Viejo Mundo es una enfermedad tanto zoonótica como antroponótica, y se da fundamentalmente en zonas áridas, en forma de epidemias en ciudades densamente pobladas del centro-oeste de Asia (desde Siria a Afganistán), como en zonas semi-áridas, principalmente rurales, del norte de África y Asia, donde se han encontrado colonias de los hospedadores reservorios. Los casos de LC por *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* se distribuyen por la mayor parte de América Central y del Sur. Tiene una distribución focal, que depende de la presencia de los vectores adecuados y de los reservorios. También se han encontrado casos de LC por *L. infantum* en España y la cuenca mediterránea.

La LMC es causada por *L. braziliensis*, y tiene una amplia distribución, desde el sur de Méjico hasta el norte de Argentina, y desde el nivel del mar hasta los 2.000 metros de altitud; esta distribución se relaciona con la presencia de un amplio rango de vectores y presumiblemente de reservorios.

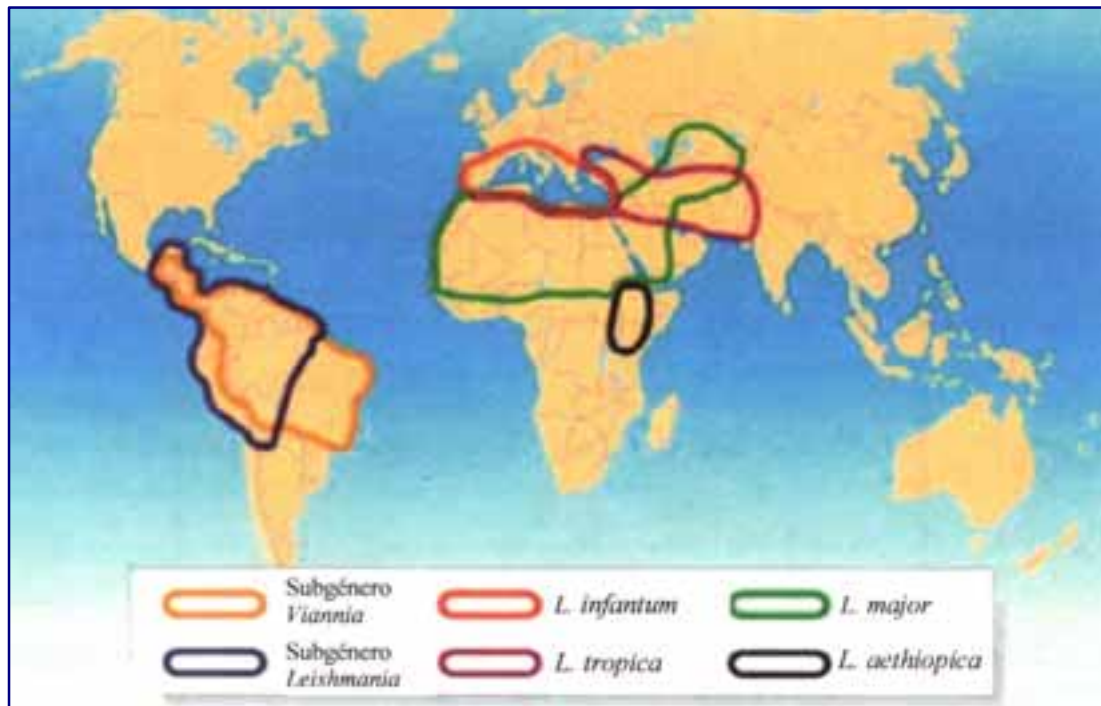


Fig. 7. Distribución de la LC y LMC, así como de las especies de *Leishmania* causantes de la misma.

En general, la leishmaniasis está sometida a cambios medioambientales, como la deforestación, construcción de presas, nuevas canalizaciones de agua, urbanización, y todo aquello que suponga la migración de población no inmunizada hacia zonas endémicas (WHO, 2000). Este hecho ha retrasado significativamente la implantación de numerosos programas de desarrollo en zonas como Arabia Saudí, Marruecos, la cuenca Amazónica y las regiones tropicales de los países andinos.

### 1.1.5 Diagnóstico de la leishmaniasis.

Los síntomas que produce la enfermedad no permiten por si solos realizar un diagnóstico, por lo que lo adecuado es la observación del parásito en el tejido presuntamente infectado. Esto es factible si los parásitos están en gran número, como ocurre en el Kala azar, pero muy complicado en los casos de LC o LMC en los que el número de parásitos es reducido. Esto supone la realización de punciones de bazo o de

médula ósea, en el caso de la LV, o biopsias del borde de las lesiones en la piel o en las mucosas, en el caso de la LC y LMC. El diagnóstico de la leishmaniasis se realiza entonces por procedimientos parasitológicos convencionales como es el examen directo microscópico del frotis de la lesión teñida con Giemsa para observar los parásitos como amastigotes, o bien el cultivo in vitro de parásitos en medio Schneider's o NNN (Novi-Nicolle-McNeal) a partir de aspirados y biopsias de las lesiones, para observar el crecimiento de promastigotes. Otro método muy utilizado es la prueba de la Leishmanina o reacción de Montenegro (Montenegro, 1926). Una vez aislado el parásito, la identificación de la especie requiere análisis isoenzimáticos, análisis de ADN o identificación mediante anticuerpos monoclonales.

Sin embargo, el examen directo del frotis tiene como limitante la experiencia del observador y la posibilidad de que el parásito no se encuentre en la muestra obtenida. El cultivo del parásito requiere de condiciones especiales y es dependiente de los componentes del medio de cultivo, que tiene un alto riesgo de contaminación. Además, la toma de la muestra es muy traumática para el paciente. Por otro lado, la prueba de la Leishmanina, aunque es una prueba cutánea de gran sensibilidad, presenta falsos positivos.

También se han desarrollado métodos de diagnóstico inmunológico, donde los más utilizados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzimo-inmunoensayo (ELISA), pero éstos presentan varios inconvenientes:

- a) debido a los antígenos utilizados pueden presentar reacciones cruzadas con infecciones causadas por otros tripanosomátidos, como la enfermedad de Chagas;
- b) no se establece si el nivel de anticuerpos es debido a una infección presente o pasada;
- c) en la LC y LMC los niveles de anticuerpos son mucho menores que en la LV;
- d) en la coinfección VIH-*Leishmania*, los pacientes no desarrollan una respuesta humoral significativa contra el parásito, por lo que ni la IFI ni la ELISA van a ser de gran utilidad (Alvar, 1994, Montalbán y col., 1990, WHO, 1998).

Jensen y col. (1996) desarrollaron una ELISA en la que utilizaba como antígeno un péptido de la proteína Gene B (GBP) de *L. major* (Flinn y col., 1994), que es una proteína hidrofílica que se encuentra en la superficie tanto de promastigotes como de amastigotes del parásito. Esta técnica presenta un 82% de sensibilidad para el diagnóstico de la LC causada por *L. major*. Para el diagnóstico de la LV humana se han desarrollado varios

sistemas como el rK-39 (Burns y col., 1993), utilizado por la OMS en las epidemias de Sudán, Eritrea y Etiopía (WHO, CSR 1998), o la ELISA utilizando péptidos derivados de un clon de *L. donovani*, que presenta una sensibilidad de hasta el 97% en la detección de anticuerpos en pacientes de LV y LDPK (Fargeas y col., 1996).

Por último también se han desarrollado técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular, que utilizan el ADN del parásito, como son la hibridación con sondas específicas de ADN o la amplificación de ADN del parásito por PCR con cebadores específicos (Ashford y col., 1995, Belli y col., 1998). Las técnicas basadas en la PCR son altamente sensibles y específicas en el diagnóstico de *Leishmania*, especialmente cuando el número de parásitos es reducido, como ocurre en la LDPK o en las infecciones mucocutáneas por *L. braziliensis* (Piñero y col., 1999).

En regiones endémicas de leishmaniasis es necesario disponer de un método de diagnóstico que sea altamente sensible, específico, rápido, que no sea invasivo para el paciente y que tenga un bajo coste económico. Por este motivo, las técnicas de biología molecular, aunque son muy sensibles y específicas, tienen el problema de no ser fácilmente aplicables en estas zonas (selvas, valles aislados y en general zonas rurales del tercer mundo). Puesto que además, en muchas regiones de América Central y del Sur hay áreas endémicas solapadas de *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma cruzi* (Ashford y Bettini, 1987, Chiaramonte y col., 1996), un diagnóstico específico por métodos parasitológicos convencionales es difícil. *T. cruzi* causa la enfermedad de Chagas, que afecta a 18 millones de personas, encontrándose unos 100 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2000). Un paciente con Chagas falsamente diagnosticado con leishmaniasis tendría el problema por añadidura de que las drogas antimoniales usadas en el tratamiento de la leishmaniasis tienen efectos cardiotóxicos.

Por este motivo se tiende a desarrollar métodos de diagnóstico inmunológicos, mucho más inmediatos y económicos, pero que posean la especificidad de los moleculares, basados en antígenos específicos del parásito, o fragmentos de los mismos.

### **1.1.6 Tratamiento de la leishmaniasis.**

Aunque la leishmaniasis es tratable, la terapia anti-*Leishmania* es un asunto desconcertante debido en gran medida a la complejidad de la enfermedad. Muy pocos compuestos han sido testados adecuadamente en ensayos clínicos; hay muchas

combinaciones de síntomas, especies y regiones geográficas y las sustancias más efectivas son generalmente las que más efectos tóxicos tienen y las que son más difíciles de administrar. Los ensayos en el tratamiento de la LC se complican por el hecho de que muchas veces los pacientes curan rápidamente de una forma espontánea. En muchos casos de leishmaniasis, la decisión de dar o no un tratamiento y cómo darlo implica extrapolar y adecuar los estudios realizados en diferentes ambientes a un determinado paciente.

Desde los años 40, los compuestos antimoniales pentavalentes de estibogluconato sódico (Pentostam, Glaxo Wellcome, Reino Unido) y antimoniales de meglumina (Glucantime, Rhône-Poulenc Rorer, Francia) han sido los principales en la terapia anti-*Leishmania* (Herwaldt y Berman, 1992, Berman, 1997). Aunque estas drogas son normalmente altamente efectivas, también tienen desventajas:

- a) administración por vía parenteral;
- b) la terapia es de larga duración (varias semanas);
- c) poca efectividad en algunos casos;
- d) efectos tóxicos molestos y frecuentes, la mayoría reversibles, como fatiga, malestar, alteración del electrocardiograma, elevación del nivel de transaminasas o pancreatitis.

La anfotericina B y la pentamidina, las alternativas parenterales del antimonio, fueron relegadas a un segundo lugar debido, en parte, a que se consideraba que causaban efectos tóxicos irreversibles, como fallo renal. Sin embargo, han vuelto a retomarse en algunos casos con nuevas formulaciones y dosis (Berman, 1999).

En algunos casos, también ha sido efectivo el uso de otros agentes como aminosidina, o la terapia tópica usando plantas a las que se les atribuye propiedades medicinales. Desafortunadamente, la mayoría de las sustancias empleadas de un modo no parenteral que se han ensayado hasta la fecha tienen actividades modestas contra un limitado rango de especies y cepas (las más altas con una curación de un 70-80%).

El tratamiento de cada paciente debe ser individualizado, y se deben valorar cuestiones como si el tratamiento está indicado o no, si el paciente sufre otros desórdenes médicos que puedan afectar el curso de la infección o incrementar el riesgo de los efectos tóxicos de ciertas drogas, qué agente terapéutico hay disponible y si es eficaz para la especie de parásito que hay en la región, si hay casos de resistencia clínica, etc.

Una infección persistente o reincidente debe ser monitorizada clínicamente, bien con un retratamiento con la misma droga (si ha dado resultado anteriormente) con la adición de algún adyuvante y durante el mismo o mayor período de tiempo, o con un tratamiento con otras drogas.

Debido a que la muerte puede ser inminente en casos con síntomas clínicos de LV, el uso de una terapia rápida y efectiva es importante. Los antimoniales pentavalentes se usan comúnmente en la India, con una respuesta del 90% (Berman, 1997). En aquellos casos en los hay coinfección con VIH, muchos pacientes reciben uno de los tratamientos establecidos para la LV que normalmente se modifican para disminuir los efectos tóxicos o para incrementar la efectividad. Un estudio al azar realizado en España con pacientes con coinfección (Laguna, 1999) mostró que no había diferencia en el uso de antimoniato de meglumina o de anfotericina B convencional, con una cura del 66% y 62%, respectivamente.

El tratamiento de la LC, en aquellos casos de leishmaniasis del Nuevo Mundo, se realiza en primer lugar teniendo en cuenta si el paciente tiene riesgo de desarrollar LMC. Se tienen en cuenta el grado de las lesiones de la piel y las molestias a causa de su localización (si están en la cara), el número, el tamaño, la evolución y la persistencia. No hay una terapia ideal para la LC, pero las drogas antimoniales pentavalentes intravenosas o intramusculares es todavía la mejor opción. Estudios realizados en Colombia (predominantemente con el subgénero *Viannia*) mostraron una efectividad del 96% (Berman, 1997). La LMC es más difícil de tratar que la LC. Las mejores opciones de tratamiento son también las drogas antimoniales pentavalentes, con un 75% de cura en aquellos casos de enfermedad no muy avanzada, y entre un 10-63% en los casos avanzados.

La inmunoterapia sigue siendo experimental. El principio de la inmunoregulación de la leishmaniasis indica que el parásito, que se multiplica en el interior de los macrófagos inactivos, es destruido por los macrófagos activados. La curación depende de la activación de los macrófagos al comienzo de la enfermedad, con la respuesta de las células T y citoquinas (Jones y col., 1998). El uso de citoquinas y otros tipos de inmunoterapia combinadas con la quimioterapia, todavía es experimental. Se están investigando varios tipos de vacunas con parásitos completos, muertos o atenuados, péptidos sintéticos o recombinantes, o vacunas de ADN, combinadas o no con citoquinas u otros adyuvantes, pero todavía no hay ninguna vacuna lista para la prevención de la leishmaniasis.

El modelo murino de la LC por *L. major* muestra que la resistencia viene mediada por la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por las células T CD4<sup>+</sup>, con fenotipo *helper1* (Th1), y por las células *natural killer* (NK), y por la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados (Liew y col., 1997). Por el contrario, la susceptibilidad a la infección se asocia con el desarrollo de un fenotipo CD4<sup>+</sup> Th2, que produce interleuquina-4 (IL-4) promoviendo la fabricación de numerosos anticuerpos contra el patógeno y una ineficaz activación de los macrófagos, lo que permite la supervivencia del parásito (Reiner y col., 1998). Otra citoquina importante en la resistencia es la IL-12. Su capacidad inmunomoduladora ha hecho que sea utilizada como adyuvante en los ensayos de vacunas contra *Leishmania* (Afonso y col., 1994, Scharton-Kersten y col., 1995). La IL-12 tiene un papel clave en el desarrollo de la inmunidad celular ya que induce a las células T vírgenes a diferenciarse a células Th1, y la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) y por las NK.

Campos-Neto y col. (2001) han obtenido protección contra la LC en ratones y en monos utilizando los antígenos recombinantes de *L. major* LmSTI1 (proteína inducible por el estrés STI1, o Hop) y TSA (proteína antioxidante específica de tiol) que podrían ser utilizados en una vacuna contra la leishmaniasis humana. Por otro lado, también se ha visto que en la inmunización con proteínas de fusión a la Hsp70, ésta actúa como adyuvante induciendo una respuesta Th1 y confiriendo protección frente al parásito (Rico y col., 1998, Planelles y col., 2001).

## **1.2 Biología molecular de los Tripanosomátidos.**

La biología molecular de los tripanosomátidos presenta una serie de características que no se encuentran o son muy raras en otros eucariotas. Entre éstas se encuentra la transcripción policistronica (Muhich y Boothroyd, 1988), el procesamiento del ARN mediante *trans-splicing* (Murphy y col., 1986) y el proceso de *RNA-editing* llevado a cabo en la mitocondria (Simpson, 1987).

### **1.2.1 El genoma de los tripanosomátidos.**

Se considera que los tripanosomátidos tienen dos genomas: el nuclear y el mitocondrial o kinetoplasto. Ambos son relativamente pequeños ( de 4 a 6 veces el genoma de *Escherichia coli*), diploides y contienen una población abundante, aunque variable entre



las distintas especies, de secuencias repetidas (Swindle y Tait, 1996). Así, se considera que el genoma de *Leishmania* tiene una complejidad de  $10^7$ - $10^8$  pb, dependiendo de la especie, de las que alrededor de un 25% está formado por secuencias repetidas.

Dado que los cromosomas de los tripanosomátidos no condensan durante la división celular, ha sido difícil asignar un número de cromosomas a cada especie hasta el desarrollo de las técnicas PFGE (electroforesis en campo pulsante). De este modo se han encontrado importantes variaciones en el cariotipo, existiendo polimorfismo, no sólo entre las especies, sino también entre las distintas cepas de la misma especie (Comeau y col., 1986, Scholler y col., 1986, Samaras y Spithill, 1987). En *Leishmania* se han detectado entre 19 y 29 bandas dependiendo de la especie y de la cepa, con un tamaño de 250 kb hasta las 2 Mb, pero se cree que algunas de estas bandas pueden contener entre 2 y 7 cromosomas que coemigran (Lighthall y Gianni, 1992).

El ADN del kinetoplasto de los tripanosomátidos se caracteriza por formar una estructura altamente compleja que consta de círculos de diferente tamaño concatenados en cadenas entrelazadas (Chen y col., 1995), y que puede suponer entre el 10 y el 20% del contenido total de ADN del organismo (Simpson, 1987). Los componentes de esta estructura se denominan maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos son el homólogo funcional del ADN mitocondrial de otros eucariotas. Poseen un tamaño que varía entre 20 y 40 kb en las distintas especies y están bastante conservados (Englund y col., 1996). En ellos se encuentran los genes que codifican los ARN ribosómicos mitocondriales y las proteínas que participan en los procesos energéticos que ocurren en la mitocondria, como la citocromo-oxidasa y NADH-deshidrogenasa, entre otras (Stuart y Feaging, 1992). Los minicírculos tienen un tamaño que oscila entre 0,5 y 2,9 kb, y su número varía entre 6.000 y 30.000. Presentan un alto grado de variabilidad de secuencia, alrededor del 80%, con pequeñas regiones conservadas. Los minicírculos codifican los ARN-guía necesarios para la edición de los ARN mitocondriales (*RNA-editing*), uno de los procesos que distinguen la expresión génica en los tripanosomátidos (Sturm y Simpson, 1990).

### **1.2.2 Transcripción en los tripanosomátidos.**

En los tripanosomátidos es muy frecuente la organización en tándem de los genes, es decir, repeticiones directas del mismo gen separados por regiones intergénicas cortas. La presencia de genes en multicopia puede deberse, por un lado, a prevenir la pérdida de genes esenciales, y por otro, es una manera de regular los niveles de ARNm específicos

(Swilde y Tait, 1996). Algunos ejemplos de esta característica son los genes de las  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulinas (Huang y col., 1984), los genes de la KMP-11 de *L. panamensis* (Ramírez y col., 1998) y *L. braziliensis* (Carmelo y col., 2001), o los genes de la Hsp70 (Requena y col., 1988, MacFarlane y col., 1990, Quijada y col., 1997).

En tripanosomátidos la transcripción es policistrónica, es decir, el ARN se sintetiza en precursores que incluyen más de una pauta abierta de lectura e incluye regiones intergénicas (Muhich y Boothroyd, 1988). Esta característica recuerda a los procariotas, pero a diferencia de éstos, los mensajeros maduros son monocistrónicos, es decir, cada uno codifica una proteína y es el resultado del procesamiento de los precursores policistrónicos.

### 1.2.3 Procesamiento del ARN en los tripanosomátidos.

Los largos ARN precursores policistrónicos de los tripanosomátidos no son traducibles directamente. El procesamiento del ARN implica la producción de un ARNm quimérico mediante la transcripción de dos segmentos de ADN que se encuentran separados en el genoma.

El *trans-splicing* es una reacción intermolecular en la cual un ARN intermediario (medRNA) es cortado y su extremo 5' es ligado a un aceptor de *splicing* (un dinucleótido AG) situado corriente arriba desde el codón de iniciación del pre-ARNm. Este fragmento, consistente en una secuencia de 39 nucleótidos con una estructura de "cap" altamente modificada en su extremo, recibe el nombre de mini-exón o *splice-leader* y es imprescindible para la traducción. El motivo de secuencia del pre-ARNm incluye una región rica en pirimidinas que precede al dinucleótido aceptor AG (Huang y Van der Ploeg, 1991, Curotto de Lafaille, 1992). La secuencia del miniexón está muy conservada entre las diferentes especies de tripanosomátidos (Boothroyd y Cross, 1982).

Se cree que el proceso de *cis-splicing*, que se da en los eucariotas superiores, y el de *trans-splicing* provienen de un ancestro común, e incluso comparten gran parte de la maquinaria bioquímica necesaria para llevarse a cabo; sin embargo, en tripanosomátidos no se ha detectado el proceso de *cis-splicing*, probablemente por el hecho de que sus genes no poseen intrones (Laird, 1989).

El otro proceso necesario para la generación de mensajeros maduros a partir de transcritos primarios es la adición de una cola de longitud variable a su extremo 3' no codificante, de adenosín-monofosfato o poli(A). En tripanosomátidos no se han encontrado

secuencias del tipo AAUAAA/GU, que dirigen el proceso de poliadenilación en eucariotas superiores. En cambio, se ha propuesto que la poliadenilación es posterior al fenómeno de *trans-splicing* y que la posición de inserción de la secuencia líder (*splice-leader*) condiciona la adición de la cola poli(A) en el gen situado en la posición inmediatamente anterior (LeBowitz y col., 1993, Ullu y col., 1993). Esto hace suponer que la adición del miniexón y la poliadenilación es realizada por el mismo complejo catalítico.

Otro fenómeno característico de los tripanosomátidos es el proceso de edición de los ARN mensajeros mitocondriales o *RNA-editing*. En este proceso, la expresión de los maxicírculos implica un proceso de modificación de los transcritos primarios, en el que son eliminados o añadidos residuos de uridina hasta crear mensajeros funcionales (Stuart, 1991). Los ARN-guías son los encargados de determinar la especificidad de este proceso, que hasta el momento sólo se ha descrito para transcritos de genes mitocondriales (Piller y col., 1995).

### **1.3 Proteínas de choque térmico.**

#### **1.3.1 Generalidades.**

La respuesta fisiológica de células u organismos completos frente a los efectos perjudiciales del estrés ambiental, como incrementos bruscos de la temperatura, se denomina respuesta de choque térmico. Se caracteriza por una rápida inducción del producto de unos genes específicos, normalmente por activación transcripcional. Esta respuesta es universal, y se ha observado tanto en bacterias, como en eucariotas inferiores, plantas y humanos. Aparte del incremento de temperatura, son muchos los estímulos estresantes que inducen una respuesta similar a nivel celular, como el etanol, metales pesados, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, inhibición del transporte de electrones, hormonas esteroideas o prostaglandinas (Lindquist, 1992).

Las proteínas de choque térmico están ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde se han observado en las células de todos los organismos, desde procariotas a eucariotas, y están entre las moléculas más altamente conservadas que se conocen, tanto en estructura primaria, como en el modo de regulación y en las funciones bioquímicas (Minowada y Welch, 1995). En las células eucarióticas se han encontrado en diferentes compartimentos celulares y organelas, como el citoplasma, mitocondria, cloroplasto y retículo endoplasmático. Las proteínas de choque térmico (Hsps) se clasifican en función de su peso molecular. La mejor estudiada y la más representativa de la familia es la Hsp70; la familia Hsp90 incluye Hsps con pesos moleculares entre 80 y 110 kDa; la Hsp60 incluye el grupo de Hsps entre 58 y 65 kDa; las Hsps de bajo peso molecular varían entre 15 y 45 kDa, y se incluyen en la familia Hsp10; por último, está la ubiquitina que es un péptido de tan solo 76 aminoácidos.

La síntesis de las proteínas de choque térmico lleva a la adquisición de tolerancia a situaciones de estrés que en otras condiciones conducirían a la apoptosis celular (Mosser y col., 2000, Beere y Green, 2001), sin embargo, algunas Hsps se producen constitutivamente a nivel basal. En *E. coli*, el homólogo de la Hsp60 GroEL, representa del 1 al 2% del contenido proteico total bajo condiciones normales, mientras que su concentración se incrementa de 4 a 5 veces bajo condiciones de estrés (Shinnick, 1991). También hay proteínas próximas a las Hsps que tienen la misma secuencia de aminoácidos,

pero que sin embargo no son inducibles por el estrés y se producen sólo a temperaturas normales. Están codificadas por genes distintos y se denominan proteínas *cognate* (Hsc).

Todo esto ha mostrado que las Hsps tienen un papel fundamental en muchas actividades vitales para la célula aún en condiciones que no pueden considerarse de estrés. Además, se las ha encontrado en niveles anormalmente elevados en determinadas condiciones patológicas, como enfermedades neurodegenerativas (Chopp, 1993) o cáncer (Welch, 1992). También han sido identificadas como las principales inmunógenas en diversas enfermedades infecciosas y en síndromes de autoinmunidad (Young, 1992, Minowada y Welch, 1995, Oka y col., 2001). Por otro lado, la actividad inmunomoduladora de las Hsps las convierten en candidatas a ser utilizadas como adyuvantes de vacunas (Rico y col., 1999, Planelles y col., 2001). Estos motivos apoyan el hecho de que en la actualidad las estructuras y funciones de las proteínas de choque térmico sean blanco de investigación en muchas áreas de la biología celular, como el tráfico a través de membranas, el metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas, enfermedades crónicas degenerativas, inmunología y enfermedades infecciosas.

### **1.3.2 Funciones.**

Las proteínas de choque térmico llevan a cabo múltiples funciones importantes tanto bajo condiciones de estrés como de no-estrés. Por ejemplo, en el plegamiento y translocación de proteínas recién sintetizadas, regulación del grado de glicosilación, activación de proteínas reguladoras específicas como factores de transcripción o kinasas, degradación proteica, señalización proteica, activación de hormonas esteroideas, inmunogenicidad tumoral o presentación antigénica (Helmbrecht y col., 2000). Debido a este amplio espectro de funciones colaboradoras, las Hsps también han sido denominadas “chaperonas moleculares”. Sin embargo, no todas las Hsps son chaperonas moleculares, ni todas las chaperonas son Hsps (Ellis y Hartl, 1999).

Las Hsps previenen la desnaturalización de proteínas en células de mamífero y bacterianas, estabilizando proteínas mal o parcialmente plegadas y promoviendo la generación de la estructura terciaria correcta (Becker y Craig, 1994, Hartl, 1996). Las proteínas Hsc70 se asocian en el citosol con polipéptidos en formación durante la traducción ribosomal (Frydman y col., 1994) y están implicadas directamente en los procesos de transporte proteico a través de

los diferentes compartimentos intracelulares. La Hsp70 mitocondrial (en levaduras Ssc) promueve tanto la translocación de los polipéptidos como su re-naturalización en la matriz mitocondrial (Hartl y col., 1994). En *E. coli*, el homólogo de la Hsp70, DnaK, estabiliza las proteínas recién sintetizadas y promueve la formación de complejos proteicos multiméricos así como su desensamblaje. En eucariotas, una Hsp70 (Hsc73) participa en la degradación lisosomal de las proteínas citosólicas y en la eliminación de la clatrina de las vesículas cubiertas (Welch, 1992). Aparte, otra Hsc juega un papel fundamental en la translocación proteica hacia el retículo endoplasmático (Hartl y col., 1994).

En el retículo endoplasmático, BiP, también conocida como grp78, tiene un amplio papel en el ensamblaje de proteínas importadas. Une intermediarios de complejos polipeptídicos multiméricos y controla su ensamble adecuado. Se ha demostrado su implicación directa en la formación de complejos multiméricos de muchas proteínas, incluyendo inmunoglobulinas, receptores de linfocitos T, y moléculas del MHC (DeNagel y Pierce, 1992, Melnick y Argon, 1995). Además de BiP, un miembro de la familia Hsp90, gp96 ó grp94, participa en el ensamblaje de las moléculas de anticuerpo. Después de ser transportadas al lumen del retículo endoplasmático, las cadenas pesadas y ligeras de las moléculas de inmunoglobulina se unen secuencialmente a la Hsp70 y a la gp96 (Melnick y col., 1994). Srivastava y colaboradores (1994) han mostrado que el transporte de péptidos desde el proteasoma hacia el retículo endoplasmático y la posterior carga del péptido al MHC tipo I, depende de una batería de Hsps incluyendo miembros de las familias de las Hsp70 y Hsp90. Esto muestra que las Hsps están involucradas tanto en el procesamiento como en la presentación de antígenos (Williams y Watts, 1995).

Las proteínas de la familia de las Hsp90 están implicadas en la unión e inactivación de los receptores de hormonas esteroideas y en el ensamblaje de los elementos del citoesqueleto. Del mismo modo, miembros de la familia de las Hsp60, también median el plegamiento y la translocación de proteínas, y se han encontrado principalmente en el citoplasma y en la mitocondria. En *E. coli*, la proteína de 60 kDa GroEL y la de 15 kDa GroES actúan juntas en el plegamiento y ensamblaje. La Hsp60 de la matriz mitocondrial de eucariotas coopera junto con la Hsp70 en el mecanismo de plegamiento proteico (Hartl, 1996). Por otro lado, la ubiquitina, une covalentemente, ya sea a su extremo amino-terminal o a lisinas internas, proteínas extrañas o desnaturalizadas para su degradación proteolítica en los lisosomas.

### 1.3.3 Respuesta de choque térmico en parásitos.

La respuesta de choque térmico juega un papel fundamental en los parásitos durante la invasión al hospedador, donde el aumento en la producción de Hsps se correlaciona con un incremento en la infectividad y patogenicidad. Se han encontrado Hsps en el curso de varias infecciones parasitarias, como las producidas por *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Schistosoma*, y por hongos patógenos, como *Candida* o *Histoplasma*. Durante la invasión, los parásitos experimentan un cambio de temperatura desde los 22-28°C de los vectores hasta los 37°C del hospedador mamífero. No sólo deben adaptarse al aumento de temperatura sino también a las diferentes condiciones del medio, como son el potencial redox y la presencia o ausencia de nutrientes y hormonas. El parásito también se enfrenta a mecanismos de resistencia natural como la fagocitosis, y dentro del fagocito a los productos oxidativos y las enzimas lisosomales. Puesto que los parásitos sufren un repentino y drástico cambio de la temperatura ambiental tras la infección, donde no hay tiempo de desarrollar la termotolerancia, probablemente ésta no sea la respuesta de choque térmico más relevante. Todo el aparato celular, incluyendo la maquinaria de maduración de los ARNm y las estructuras de membrana, deben permanecer funcionales para permitir la supervivencia del parásito y que tengan lugar los cambios morfológicos que suelen acompañar a la entrada en el hospedador mamífero (Shapira y col., 1988). Esto podría llevarse a cabo por la evolución de estructuras termo-resistentes, o bien, por la existencia de un estado constitutivo de termotolerancia previo a la infección (Maresca y Carratu, 1992). La expresión constitutiva de las Hsps pre-adapta al parásito a las condiciones del hospedador mamífero, pero durante la respuesta de choque térmico, el parásito induce rápidamente los genes *HSPs*, incrementando la síntesis de las Hsps e inhibiendo la de la mayoría de las proteínas. En tripanosomátidos estos genes están implicados en la diferenciación de promastigotes a amastigotes (Van der Ploeg y col., 1985). La Hsp70 es una de las Hsps que participa en la protección de los eventos de *splicing* de los precursores policistrónicos de ARNm, así como en la prevención de la desnaturalización proteica debida a las altas temperaturas. Se ha mostrado que a altas temperaturas la Hsp70 migra al núcleo donde se asocia con polipéptidos parcialmente desnaturalizados y que se han agregado formando complejos insolubles, para promover su disgregación (Pelham, 1990).

El proceso de infección está determinado tanto por el hospedador como por el parásito, y durante el mismo, ambos incrementan la producción de Hsps. La inducción de la síntesis de Hsps por parte del hospedador tiene al menos dos causas principales. Primero, los macrófagos infectados se enfrentan a mecanismos de protección que ellos mismos han activado, como radicales reactivos. Segundo, una vez dentro del fagocito, los parásitos interfieren en el metabolismo intracelular del hospedador. Por tanto, no sorprende que muchos de estos parásitos sean potentes inductores de la síntesis de proteínas de choque térmico por parte de las células de mamífero (Zügel y Kauffman, 1999).

#### **1.3.4 Antigenicidad de las proteínas de choque térmico en parásitos.**

Las Hsps, generalmente la Hsp70, están entre los antígenos inmunodominantes reconocidos por el sistema inmune en un amplio espectro de parásitos (Young y col., 1991). Aparte de su implicación en las interacciones parásito-hospedador, también asumen una importancia inmunológica, aún cuando las Hsps están entre las proteínas más conservadas evolutivamente. Muestran índices de identidad en todos los casos superiores al 50%. Las proteínas de choque térmico de *Leishmania* han sido denominadas “panantígenos”. Son proteínas muy conservadas, que se encuentran en la célula como multímeros proteicos, con un alto porcentaje de reconocimiento por sueros de pacientes con leishmaniasis y que han sido descritas como antígenos durante otros procesos infecciosos y enfermedades autoinmunes (Requena y col., 2000). Durante la infección con *Leishmania*, muchas células infectadas son destruidas, liberando estos panantígenos que son entonces fagocitados y procesados por células presentadoras de antígenos profesionales (APCs). La fuerte respuesta inmune tanto celular como humoral frente a las Hsps que se observa en humanos y animales con leishmaniasis puede deberse a su alta abundancia en los parásitos, especialmente bajo condiciones de estrés, a su estabilidad, a su capacidad de ser procesadas por APCs, y a la memoria inmunológica que genera la frecuente re-estimulación con los determinantes antigénicos conservados de las Hsps de otros patógenos. Así, se ha sugerido que la ubicua distribución de las Hsps y su conservación de secuencia ha sido aprovechada por el sistema inmune para desarrollar una respuesta universal y rápida contra la infección (Kaufmann y Schoel, 1994).

La Hsp70 es altamente reconocida por el sistema inmune en muchas infecciones parasitarias, como la leishmaniasis (MacFarlane y col., 1990, Quijada y col., 1996<sup>a, b</sup>, Amorim y col., 1996), tripanosomiasis (Engman y col., 1990, Krautz y col., 1998), malaria



(Ardeshir y col., 1987), esquistosomiasis (Hedstrom y col., 1987), o filariasis (Rothstein y col., 1989, Selkirk y col., 1989). Los miembros de la familia Hsp83/90 también han sido descritos como antígenos inmunodominantes durante las infecciones causadas por *L. donovani* (De Andrade y col., 1992), *L. infantum* (Angel y col., 1996) y *L. braziliensis* (Skeiky y col., 1995). En la candidiasis se ha descrito un antígeno inmunodominante de 47 kDa, procedente de la proteólisis de la Hsp90 de *Candida albicans* (Matthews y Bournie, 1992). En pacientes tuberculosos se han encontrado fuertes reactividades humorales y celulares frente a las proteínas Hsp60, Hsp65 y Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* (Havlir y col., 1991). La Hsp60 de *L. major* también se ha descrito como un antígeno inmunodominante (Rey-Ladino y col., 1997).

Por otra parte, varios estudios han implicado a las Hsps en diversas enfermedades autoinmunes y condiciones patológicas, como enfermedades crónicas inflamatorias, neurodegenerativas o cáncer, en las que se han encontrado niveles elevados de auto-anticuerpos o de Hsps (Zügel y Kaufmann, 1999).

#### **1.4 Proteínas de choque térmico de 70 kDa: Hsp70.**

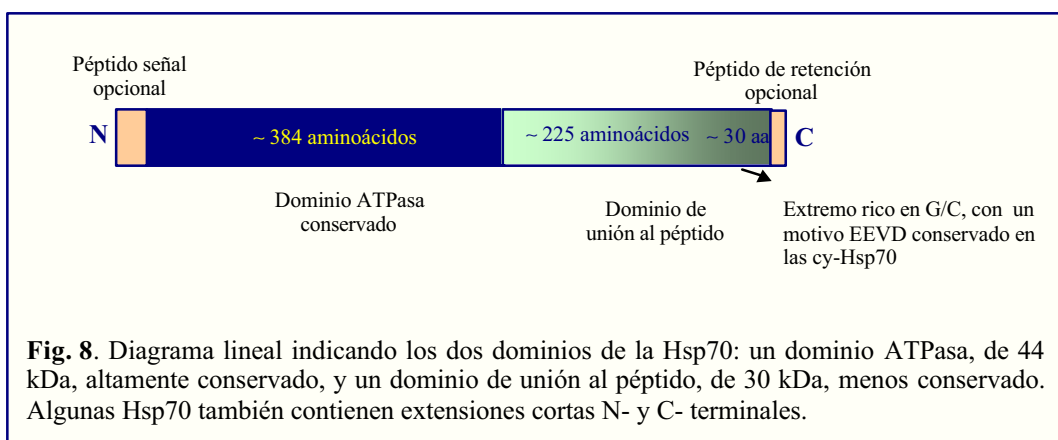
##### **1.4.1 Generalidades y mecanismo de acción.**

Entre las Hsps, los miembros de la familia de las Hsp70 son los de mayor importancia como “chaperonas moleculares”. Se identificaron por primera vez en células de *Drosophila* sometidas a un rápido incremento de temperatura (Tissières y col., 1974). Los genes que codifican las Hsp70 muestran una expresión tanto constitutiva como inducible. Al igual que en levaduras y mamíferos, en tripanosomátidos también se ha identificado la proteína Hsp70 citosólica (cy-Hsp70), que se distribuye por todo el citoplasma, la mitocondrial (mt-Hsp70) y la del retículo endoplasmático (grp78), donde facilitan la translocación de las proteínas a dichas organelas. La mt-Hsp70 está concentrada en el kinetoplasto, donde puede tener algún papel en el metabolismo de los ácidos nucleicos de los tripanosomátidos (Engman y col., 1992).

Los miembros de la familia de las Hsp70 son los más conservados evolutivamente, tanto en estructura como en función. DnaK, la única Hsp70 de *E. coli*, tiene aproximadamente un 50% de identidad de secuencia con las Hsps de eucariotas (Georgopoulou y col., 1990), las cuales están codificadas por múltiples genes *HSP70* que

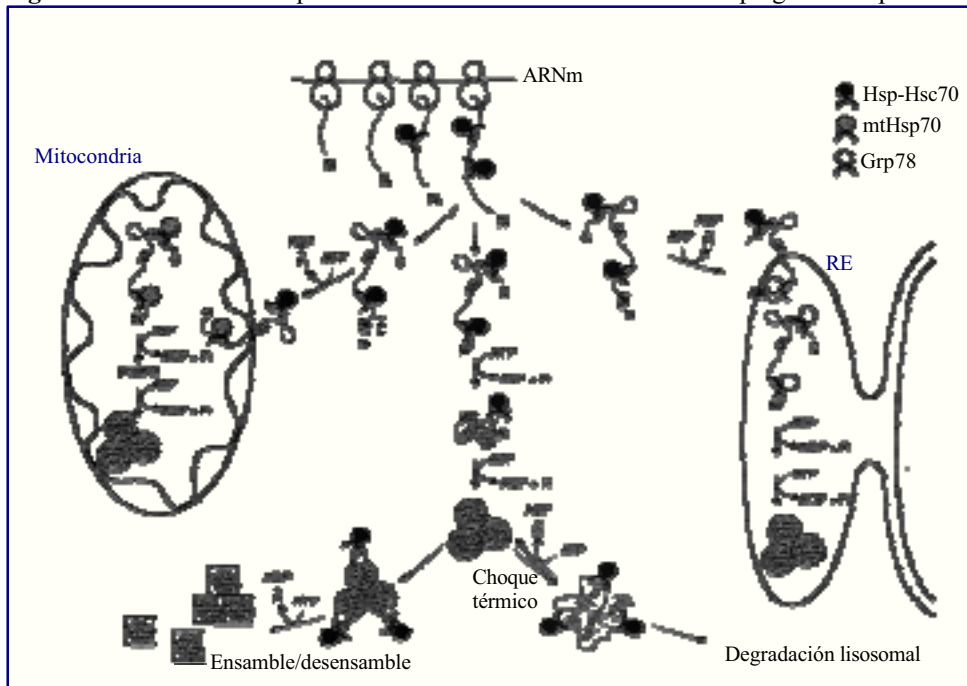
muestran entre un 50 y 95% de identidad a nivel de nucleótidos. Algunas Hsp70 contienen extensiones cortas amino o carboxi-terminales requeridas para la entrada o la retención en el compartimento celular apropiado. BiP contiene una secuencia señal hidrofóbica específica para su importe al retículo endoplasmático y un tetrapéptido carboxi-terminal (KDEL en mamíferos, o HDEL en levaduras) responsable de la retención de la proteína en el lumen del retículo. Así mismo, las Hsp70 localizadas en la mitocondria, como la mtHsp70 de *L. major* (Searle y col., 1993) o de *T. cruzi* (Engman y col., 1989) contienen extensiones hidrofílicas amino-terminales requeridas para su importe a dicha organela.

Las Hsp70 constan de dos dominios: un dominio amino-terminal de 44 kDa (residuos 1-384) que une e hidroliza ATP, y un dominio carboxi-terminal, de aproximadamente 30 kDa, que contiene el sitio de unión al péptido (Fig. 8) (Benaroudj y col., 1997). La comparación de todas las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de las Hsp70 muestra que los dos tercios amino-terminales de estas proteínas están mucho más conservados que la región carboxi-terminal, lo que sugiere un dominio ATPasa conservado seguido de una región de unión al péptido variable. La estructura tridimensional muestra que el dominio ATPasa consiste en dos lóbulos donde la unión del nucleótido de adenina se produce en la base que queda entre ambos (Flaherty y col., 1990). El dominio carboxi-terminal une péptidos a través de residuos hidrofóbicos de un modo poco específico, al contrario que los sitios de unión específicos de las enzimas. BiP tiene un único sitio de unión a péptidos que recuerda al bolsillo de unión al péptido del MHC tipo I, y reconoce preferencialmente péptidos de 7 a 8 aminoácidos (Roman y col., 1994).



Las Hsp70 interactúan a través de su dominio carboxi-terminal con dominios no-nativos expuestos durante la traducción proteica, la translocación a través de membrana, la oligomerización, o la degradación. Determinadas condiciones pueden alterar la estructura proteica, haciendo que se expongan regiones hidrofóbicas que normalmente están en el interior de la molécula y llevando a su agregación y pérdida de función. La capacidad de la Hsp70 de unirse a estas regiones hidrofóbicas viene dada por un mecanismo ATPasa de relajación que previene la agregación proteica y ayuda en el establecimiento de la conformación nativa (Hartl, 1996). Sin embargo, las alteraciones de secuencia, como la sustitución, deleción o inserción de aminoácidos, modificaciones post-traduccionales aberrantes, como una glicosilación incorrecta, o condiciones de estrés ambiental, no permiten un correcto plegamiento, y las Hsp70 actuarían llevando a estas estructuras a las vías de degradación lisosomal (Fig. 9).

**Fig. 9.** Funciones de las Hsp70 en las células eucarióticas durante el plegamiento proteico,



el ensamblaje y desensamblaje de los complejos proteicos, la translocación hacia el lumen de la mitocondria o del RE de los polipéptidos recién sintetizados, y en la protección frente al estrés. (RE: retículo endoplasmático). Tomado de Gething y Sambrook (1992).

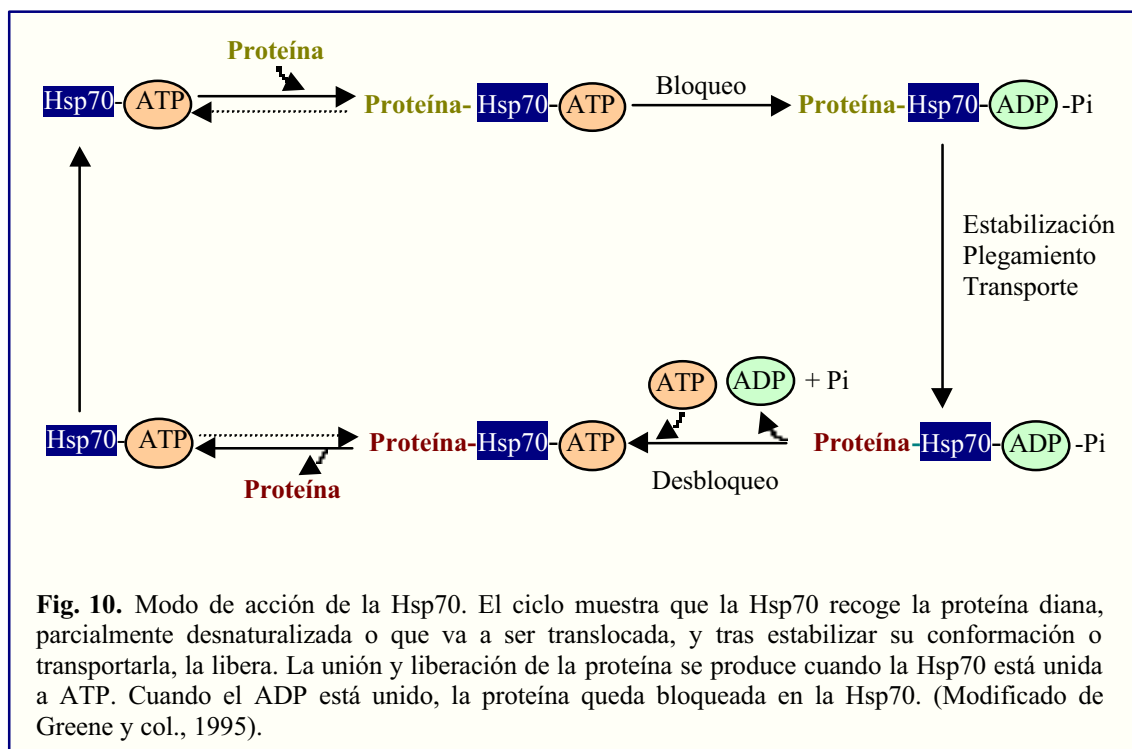
El sitio de unión al péptido se localiza en una región de 15 kDa próxima al extremo carboxi-terminal. Su unión y liberación están reguladas por la unión del ATP y su hidrólisis, que ocurre en el dominio ATPasa. La hidrólisis del ATP promueve un cambio conformacional en la Hsp70 que es transmitido al péptido unido. El *turnover* del ATP está

regulado por una familia de cochaperonas que se unen tanto al dominio ATPasa como a la región de 10 kDa carboxi-terminal (Brehmer y col., 2001).

Diversas características comunes apuntan a un mecanismo conservado de acción en estas proteínas. Estas características incluyen:

- reconocimiento diferencial de polipéptidos diana y modulación de su conformación o estado de ensamble;
- implicación de la unión del ATP y/o hidrólisis;
- requerimiento de otras cochaperonas, como Hsp40, Bag-1, Hip y Hop, o factores celulares en la modulación de la actividad; y
- la inducción de la síntesis de miembros individuales de la familia de las Hsp70 por la acumulación de proteínas desnaturalizadas en los compartimentos celulares respectivos.

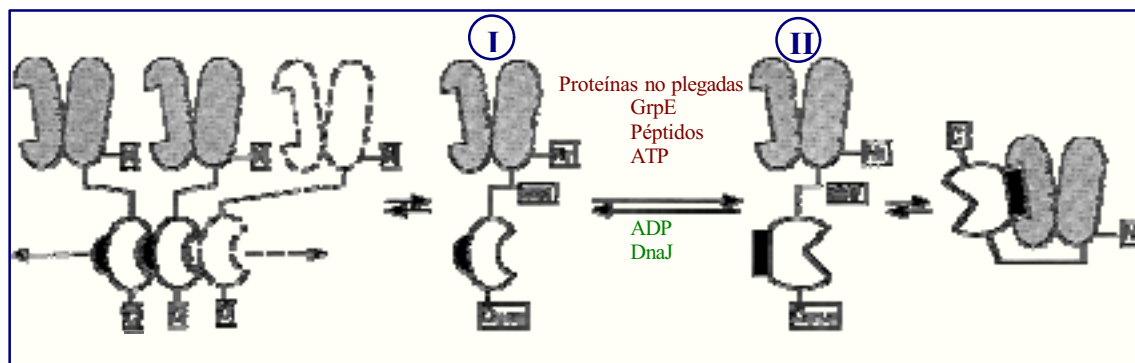
El modelo de acción de las Hsp70 propuesto por Greene y col., (1995) se esquematiza en la Fig. 10:



Este modelo propone que la proteína existe en dos estados conformacionales principales, uno que une ATP, y otro que une ADP al sitio activo. La unión y disociación del péptido ocurre en la forma de unión al ATP, mientras que en la forma de unión al ADP

el péptido es incapaz de disociarse. Parece que la hidrólisis del ATP causa un cambio conformacional en la Hsp70 que es transmitido al sustrato, bloqueándolo para ser transportado a la organela adecuada, para permitir su plegamiento correcto, o bien para intervenir debilitando o favoreciendo sus interacciones con otros polipéptidos. Por otro lado, la liberación de ADP y unión de otra molécula de ATP causa la disociación del mismo. Diversos cofactores que controlen la hidrólisis del ATP podrían estar implicados en la unión inicial de las proteínas a la Hsp70, mientras que otros cofactores podrían prevenir la liberación prematura del ADP antes de que el complejo Hsp70-proteína haya alcanzado su destino o conformación.

Benaroudj y col. (1997) han encontrado que la auto-asociación de la Hsc70 podría ser un mecanismo de regulación de su actividad (Fig. 11). La Hsc70 existe en equilibrio lento entre dos estados monoméricos, I y II, que difieren en la conformación del dominio carboxi-terminal, y concretamente en el sitio de unión al péptido. En el estado I, esta conformación es tal que una región limitada adoptaría una estructura extendida que posibilitaría la interacción con el sitio de unión al péptido de otra molécula, y por tanto, su auto-asociación. Estas interacciones podrían mimetizar las que tienen lugar entre la Hsc70 y los péptidos o proteínas diana. La auto-asociación incluiría la formación de dímeros, trímeros, e incluso estructuras de alto peso molecular. Por otro lado, el estado II de la proteína, donde el dominio carboxi-terminal adopta una conformación alternativa, quizás más definida, sería más estable como monómero y tendería a cerrarse sobre sí mismo como consecuencia de un contacto favorable entre el dominio ATPasa y el dominio de unión al péptido. Freeman y col. (1995) mostraron que la secuencia terminal EEVD juega un importante papel en la regulación de la actividad ATPasa amino-terminal. Este motivo regulador está conservado en el extremo carboxilo de prácticamente todas las Hsp70 citosólicas clonadas. Su delección o mutación afecta a la actividad ATPasa y a la capacidad para interactuar con el sustrato, además, es esencial para la asociación de las cochaperonas Hsp40 y Hop (Demand y col., 1998). Debe existir una interrelación entre ambos dominios puesto que la unión del nucleótido afecta la interacción con el sustrato proteico, mientras que la adición de sustratos peptídicos estimula la actividad ATPasa de las Hsp70 (López-Buesa y col., 1988, Davis y col., 1999).



**Fig. 11.** Modelo estructural para la auto-asociación de la Hsp70 y su dominio carboxi-terminal. La Hsp70 existe en equilibrio entre dos estructuras monoméricas, estado I y estado II, que difieren por la conformación del dominio carboxi-terminal (en blanco) y particularmente por el sitio de unión al péptido. En el **estado I**, esta conformación es tal que una región limitada (en negro) podría adoptar una estructura que mimetizara péptidos diana o proteínas desplegadas e interactuara con el sitio de unión al péptido de otra molécula Hsp70, llevando a la auto-asociación. En el **estado II**, todo el dominio carboxi-terminal, y una región limitada en particular, adopta una conformación alternativa, más definida, que estabiliza el monómero y que tiene tendencia a interactuar con el dominio amino-terminal (en gris), resultando en la formación de una estructura cerrada. El equilibrio entre los dos estados está regulado por nucleótidos, péptidos y cochaperonas.

#### 1.4.2 Utilidad diagnóstica y propiedades inmuno-moduladoras de la Hsp70.

Como ya se ha mencionado, la Hsp70 es un antígeno dominante en un amplio espectro de infecciones parasitarias, lo que es sorprendente teniendo en cuenta que es una de las proteínas más conservadas que se conocen. Se han encontrado niveles altos de anticuerpos anti-Hsp70 en el suero de personas y animales con diferentes formas clínicas de leishmaniasis. A pesar de la alta identidad de secuencia entre las Hsp70 del hospedador y de *Leishmania*, la respuesta del sistema inmune se dirige específicamente contra la Hsp70 del parásito (Maresca y Carratu, 1992, Skeiky y col., 1995, Quijada y col., 1996<sup>b</sup>) y no se inducen autoanticuerpos durante la infección (Skeiky y col., 1995).

El hecho de que la Hsp70 sea una proteína abundante, que induce una fuerte respuesta humoral y celular específica durante la infección, ha llevado a su estudio como herramienta para el diagnóstico inmunológico. Hay diversos trabajos donde se ha estudiado la antigenicidad de las Hsp70 de tripanosomátidos, como la de *L. donovani* (MacFarlane y col., 1990, De Andrade y col., 1992, Wallace y col., 1992, Arora y col., 1995), *T. cruzi* (Yeyati y col., 1991, Requena y col., 1993, Krautz y col., 1998), *L. infantum* (Quijada y col., 1996<sup>a,b</sup>, Quijada y col., 1998) o *L. braziliensis* (Amorim y col., 1996). Los resultados obtenidos han sido diferentes, así se ha propuesto que la Hsp70 de *L. donovani* es

específica de enfermedad, es decir, sólo es reconocida por sueros de pacientes con LV, no mostrando reacción cruzada con sueros de pacientes con otras parasitaciones (MacFarlane y col., 1990, De Andrade y col., 1992, Wallace y col., 1992). En cambio, ni la Hsp70 de *T. cruzi* (Requena y col., 1993, Krautz y col., 1998), la de *L. infantum* (Quijada y col., 1996<sup>a</sup>, Quijada y col., 1998), o la de *L. braziliensis* (Amorim y col., 1996) mostraron un reconocimiento específico de enfermedad, por lo que ha sido necesaria la búsqueda de determinantes antigénicos específicos, útiles para ser empleados en el diagnóstico inmunológico. Amorim y col. (1996) no estudiaron la proteína completa, sino sólo un fragmento que a su vez dividieron en dos, sin obtener buenos resultados respecto a la especificidad.

Hasta la fecha, la especificidad de este antígeno permanece en controversia debido a la aparente contradicción en algunos de los resultados obtenidos. Así, por ejemplo, Arora y col. (1995) encontraron que la Hsp70 de *L. donovani* no era útil para el diagnóstico serológico del Kala azar, ya que las personas sanas también presentaron anticuerpos contra este antígeno.

Por otra parte, se debe mencionar que, aparte del interés que la Hsp70 suscita en cuanto a su posible utilización como herramienta de diagnóstico, en estos años se ha sugerido que las Hsps juegan un papel crítico en la producción de una respuesta inmune específica frente a cánceres y agentes infecciosos, donde la especificidad es debida a los péptidos antigénicos acomplejados a las Hsps (Schild y col., 1999). Se ha sugerido que la distribución ubicua de estas proteínas y su elevada conservación de secuencia, ha sido explotada por el sistema inmune para desarrollar una respuesta rápida y universal contra las infecciones (Kaufmann, 1990). De este modo, las Hsps actuarían como chaperonas, no sólo durante la biogénesis de otras proteínas, sino también durante la respuesta inmune a otros antígenos.

Estas propiedades inmunoestimuladoras convierten a las Hsp70 en *carriers* o adyuvantes en vacunas conjugadas, debido a su alta afinidad de unión a determinados péptidos y su implicación en varios pasos del procesamiento antigénico. No hay un adyuvante inmune potente que haya sido aprobado para el uso humano de forma general y, en este punto, las proteínas Hsps serían candidatas a ser adyuvantes induciendo una respuesta celular T sin problemas de tolerancia.

La Hsp70 potencia una fuerte respuesta inmune celular T-CD8<sup>+</sup> contra los péptidos antigénicos unidos. La eficiencia de este proceso es debida a que los complejos Hsp70-antígeno entran en las células presentadoras de antígeno por una endocitosis mediada por receptor, donde éste ha sido identificado recientemente como CD91 (Basu y col., 2001). A continuación, los péptidos antigénicos son transportados desde el citoplasma hasta el retículo endoplasmático por un sistema de transporte especializado, denominado transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP). En el retículo endoplasmático, gp96 actúa como aceptor del péptido. Posteriormente, los complejos gp96-péptido se unen al MHC, donde, por un mecanismo dependiente de ATP, los péptidos son translocados desde gp96 al MHC de clase I, donde son presentados y posteriormente reconocidos por los linfocitos T-CD8<sup>+</sup>. Se ha encontrado que en células de ratón deficientes en TAP, la Hsp70 también presenta los péptidos de una forma eficaz a través del MHC tipo I, por que la presentación del antígeno también puede ocurrir por una ruta distinta a la clásica (Schirmbeck y col., 1997). La conservación de las funciones de la Hsp70 y gp96 en el procesamiento antigénico, sugiere la importancia de las Hsps en la evolución del sistema inmune vertebrado (Roberts y col., 2001).

Trabajos recientes han mostrado que las Hsps de varios patógenos poseen propiedades moduladoras cuando son utilizados como adyuvantes en las inmunizaciones. Así, Suzue y Young (1996) obtuvieron que la inmunización con la proteína recombinante p24 del VIH fusionada a la proteína Hsp70 de *M. tuberculosis* potencia una respuesta inmune tanto humoral como celular contra p24 en ausencia de adyuvante. La unión de la Hsp70 de *M. tuberculosis* al antígeno E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16), genera una respuesta inmune específica para E7 mediada por células T mucho más elevada (Hsu y col., 2001). En pacientes con cáncer se ha encontrado que la respuesta frente a la proteína p53 mutada es dependiente de la asociación con la Hsp70, de tal forma que los tumores que expresan p53 mutada, pero no en asociación con la Hsp70, no son capaces de inducir la producción de anticuerpos frente a p53 (Davidoff y col., 1992). Además, se han identificado los motivos asociados a la unión a las Hsps para ser utilizados en la construcción de péptidos híbridos. Moroi y col. (2000) no han empleado la proteína Hsp para realizar la construcción recombinante, sino sólo péptidos que contienen dominios con alta afinidad de unión a las proteínas Hsps, potenciándose una respuesta citotóxica T-CD8<sup>+</sup>. Respecto a una posible inmunoterapia frente al cáncer, Schueller y col. (2001) han observado una correlación entre los niveles de Hsp70-Hsp90 y la subpoblación de células



necróticas en células tumorales sometidas a choque térmico in vitro. Lo que sugiere que este mecanismo podría desarrollarse para incrementar la inmunogenicidad tumoral.

También se han estudiado las propiedades inmunomoduladoras de las Hsp70 de tripanosomátidos. Un estudio realizado con la Hsp70 de *L. infantum* muestra que las propiedades inmuno-estimuladoras se localizan en el dominio amino-terminal, donde se produce la unión e hidrólisis del ATP, que potencia principalmente una respuesta tipo Th1 (Rico y col., 1999). Planelles y col. (2001) han desarrollado una vacuna genética donde han fusionado el gen *HSP70* de *T. cruzi* al del antígeno de interés, KMP11. La inmunización de ratones con el plásmido de fusión provocó un descenso en la parasitemia y confirió protección frente a la infección experimental con *T. cruzi*. Potenció una respuesta inmune humoral IgG 2a de larga duración contra la proteína KMP11 y la activación de los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos de dos péptidos del antígeno, lo que llevó a la protección celular.

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Una de las líneas de investigación del Área de Parasitología de la Universidad de La Laguna persigue la identificación de proteínas de *Leishmania braziliensis* que sean útiles para el diagnóstico y/o protección frente a la infección por este parásito. Dada la dificultad del diagnóstico inmunológico en pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea causadas por *L. braziliensis*, junto con la existencia de reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos, sobre todo con *Trypanosoma cruzi*, que además presentan áreas endémicas solapadas, se planteó la identificación de proteínas de *L. braziliensis* que fuesen específicas y útiles para el diagnóstico.

Los objetivos principales de esta Tesis Doctoral quedan resumidos en los siguientes puntos:

1°. Caracterización de los componentes antigénicos de *L. braziliensis* y *T. cruzi* con objeto de identificar proteínas específicas de *L. braziliensis*, con una posible utilidad en el diagnóstico inmunológico.

2°. Purificación y microsecuenciación de las proteínas antigénicas específicas de *L. braziliensis*. Elaboración de anticuerpos policlonales frente a las mismas.

3°. Aislamiento en una genoteca de *L. braziliensis* de los genes que codifican dichas proteínas. Subclonaje y caracterización génica de los mismos.

4°. Estudio de la respuesta inmune humoral de pacientes con leishmaniasis cutánea, mucocutánea, visceral, y con la enfermedad de Chagas frente a estas proteínas: Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de *L. braziliensis*. Localización de sus determinantes antigénicos.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 Productos químicos.

Los reactivos químicos utilizados fueron suministrados principalmente por las firmas Amersham Pharmacia, Bio-Rad, Gibco, Merck, Millipore, Promega, Roche Diagnostics, Stratagene, Sigma y Quiagen. Las placas radiográficas empleadas, así como los reactivos para su revelado, fueron de la casa Fuji Film.

### 2.2 Cepas de parásitos.

- *Leishmania braziliensis* (MHOM/PE/95/LQ-8), cedida por la Dra. Rosa Luz Pacheco de la Universidad de San Antonio Abad de Cuzco, Perú.
- *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (Silva y Nussenzweig, 1953), cedida por el Dr. Manuel Carlos López del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Universidad de Granada.

### 2.3 Cepas bacterianas.

- *Escherichia coli* cepa XL-2 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* ZΔM15, Tn 10, *Amyr*, *Camr*), empleada para la transformación y propagación de los plásmidos de clonaje.
- *Escherichia coli* cepa KW 251 (Promega) genotipo: *sup* E44, *gal* K2, *gal* T22, *met* B1, *hsd* R2, *mcr* B1, *mcr* A, [*argA81::Tn10*], *rec* D1014, empleada para la infección con fagos.
- *Escherichia coli* cepa Topp 3 (Stratagene): Rif<sup>r</sup> [F' *pro* AB *lacI*<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>) (Kan<sup>r</sup>)], empleada para la expresión y purificación de proteínas recombinantes.



## 2.4 Cultivo de parásitos.

### 2.4.1 Medio de cultivo de *Leishmania*.

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

RPMI 1640	8,32 g
Hepes	4,75 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,60 g
Solución de aminoácidos orgánicos (10x) (1)	100,00 ml
Solución de vitaminas con fólico (1000x) (2)	0,20 ml
Suero bovino fetal inactivado (SBFI)	200,00 ml
Agua bidestilada 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	Alfa-ketoglutarato	3,00 g
Glutamina	16,4 g	Fumarato	0,55 g
L-Ornitina	1,0 g	Succinato	0,60 g
Agua bidestilada c.s.p.	1000,0 ml		

(2) Solución de vitaminas (1000x):

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

El medio de cultivo se ajustó a pH 7,2 y se esterilizó por filtración a través de filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Gelman). Al medio esterilizado se le añadió gentamicina a una concentración de 80  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 2.4.2 Medio de cultivo de *Trypanosoma*.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las formas epimastigotes de *Trypanosoma* fue el medio LIT:

NaCl	4,0 g
KCl	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 g
Glucosa	2,0 g
Triptosa	5,0 g
Infusión de hígado	5,0 g
Hemina	25,0 mg
Suero bovino fetal inactivado (SBFI)	100,0 ml
Agua bidestilada c.s.p.	1000,0 ml

El pH del medio se ajustó a 7,2 y se esterilizó por filtración a través de filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Gelman). Al medio esterilizado se le añadieron los antibióticos gentamicina y penicilina a una concentración de 40 mg/l y 600.000 U/l, respectivamente.

#### 2.4.3. Condiciones de cultivo de las cepas de parásitos.

El cultivo de las formas promastigotes de *Leishmania braziliensis* se mantuvo en medio RPMI 1640, enriquecido con aminoácidos y vitaminas y suplementado con suero bovino fetal inactivado al 20% (v/v), con agitación suave a 22°C. Las formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se cultivaron en medio LIT, suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10% (v/v), con agitación suave a 28°C. Los cultivos de ambos parásitos se realizaron en frascos estériles de cultivos celulares de 25 cm<sup>2</sup> (Corning). Para mantener los cultivos en fase logarítmica de crecimiento se realizaron pases con medio fresco cada tres

días. Adicionalmente, para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo se criopreservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  con glicerol al 15% (v/v).

## **2.5 Cultivo de las cepas bacterianas.**

### **2.5.1 Medios de cultivo de *Escherichia coli*.**

- Para el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* XL2-Blue y Topp3 se empleó el medio LB (Luria-Bertani) líquido, compuesto de extracto de levadura al 0,5% (p/v), bacto triptona al 1% (p/v) y NaCl al 1% (p/v). El medio sólido LB-agar se obtuvo añadiendo agar al medio LB líquido hasta una concentración final del 1,5% (p/v).

- Para el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* KW251 se empleó el medio LB suplementado con maltosa al 0,2% (v/v) y  $\text{MgSO}_4$  10 mM, que permite la inducción de la expresión de los receptores de adsorción del bacteriófago  $\lambda$ . Para el crecimiento de *Escherichia coli* KW251, infectada con el bacteriófago  $\lambda$ , se empleó el medio LB-*top* agarosa, que se obtuvo añadiendo agarosa al 0,8% (p/v) al medio LB.

- Para la recuperación de las células competentes recién transformadas, éstas se incubaron en medio SOC (medio LB líquido suplementado con glucosa 20 mM,  $\text{MgSO}_4$  10 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM) antes de ser sembradas en LB-agar.

Los medios LB se esterilizaron en autoclave. Los componentes sensibles al calor (maltosa, ampicilina) fueron preparados en forma de disolución madre concentrada, esterilizados por filtración (Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ) y añadidos al medio de cultivo esterilizado en autoclave después de que la temperatura del medio estuviese por debajo de  $50^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5.2 Condiciones de cultivo de *Escherichia coli*.**

Las diferentes cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en medio LB a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12-16 horas. Los cultivos en medio líquido se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de distintas capacidades con agitación moderada. Los medios se inocularon a partir de colonias recién aisladas de cultivos sólidos, o bien de precultivos frescos, crecidos en medio de cultivo líquido durante 12 horas. Para la selección de clones por resistencia a ampicilina, ésta se le añadió al medio de cultivo esterilizado a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

El mantenimiento de las cepas bacterianas se realizó mediante resiembras periódicas (60 días) en el medio LB sólido, incubación a 37°C y conservación a 4°C. Para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo, éstas se conservaron a -80°C en glicerol al 20% (v/v).

## **2.6 Aislamiento de ADN.**

### **2.6.1 Aislamiento de ADN genómico de *Leishmania* de alto peso molecular.**

El aislamiento de ADN genómico de *Leishmania* de alto peso molecular y alta calidad, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Medina-Acosta y Cross (1993), pero con una modificación: la lisis de los parásitos y la incubación con la RNasa se realizaron en un mismo paso. De este modo se pudo eliminar un paso de precipitación que podría mellar el ADN.

Se recogieron  $10^7$ - $10^8$  promastigotes de *Leishmania* en fase logarítmica de crecimiento, por centrifugación durante 10 minutos a 2.000 x g y a 4°C y se lavaron tres veces con tampón fosfato salino PBS [NaCl 0,14 M, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4]. El *pellet* celular se resuspendió en 150 µl de tampón de lisis TELT [Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 65,2 mM pH 9, LiCl 2,5 M, Tritón X-100 4% (v/v)] y se le añadió RNasa A (Roche Diagnostics) a una concentración final de 100 µg/ml. Tras incubar 1 hora a 37°C se añadió un volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl 0,1 M pH 8 (Eurobio) y se mezcló suavemente por inversión. Se separaron las fases por centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos y la fase acuosa se extrajo de nuevo con un volumen de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, en proporción 25/24/1. Se repitió la extracción con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24/1. El ADN genómico se precipitó con un volumen de isopropanol a -20°C durante 1 hora y se centrifugó a 13.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v), se secó a vacío y se disolvió en 50 µl de agua bidestilada estéril. El rendimiento de este método fue al menos de 75 µg de ADN genómico por cada  $10^8$  parásitos.

### **2.6.2 Aislamiento de ADN plasmídico de *Escherichia coli*.**

El método utilizado con mayor frecuencia para llevar a cabo preparaciones rápidas a pequeña escala, en las que no era preciso obtener ADN plasmídico de gran pureza, fue el

*Litium minipreps*, descrito por Wilde y Kaderbhai (1990). Se trata de un método basado en la utilización de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1) en presencia de LiCl y Triton X-100, lo cual permite la solubilización del ADN plasmídico y la precipitación tanto del ADN cromosómico como de las proteínas celulares. Las células bacterianas contenidas en 1,5 ml de cultivo, crecido durante 12-16 horas en medio LB-ampicilina, se recogieron mediante centrifugación a 13.000 x g durante 1 minuto, y se resuspendieron en 200 µl de tampón TELT [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 62,5 mM, LiCl 2,5 M y Triton X-100 al 4% (v/v)]. A continuación se añadieron 200 µl de fenol/cloroformo (1/1) e inmediatamente la mezcla resultante se agitó enérgicamente durante 15 segundos y se centrifugó 2 minutos a 13.000 x g. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa superior se precipitaron añadiendo 2 volúmenes de etanol, incubando durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugando 10 minutos a 13.000 x g, a 4°C. El ADN precipitado se lavó con 1 ml de etanol, se secó en un secador de vacío y se disolvió en 30 µl de agua bidestilada estéril a 37°C, a la que se le añadió 1 µl de RNAsa A (Roche Diagnostics) por cada 50 µl.

Cuando fue necesaria la obtención de ADN plasmídico de un mayor grado de pureza o cuando se llevó a cabo la purificación de los plásmidos a mediana escala se utilizaron los *kits* comerciales *Quantum Prep Plasmid Miniprep* (Bio-Rad) o bien *QIAprep Miniprep* (Quiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Ambos *kits* siguen un procedimiento similar. En un primer paso se produce la separación del ADN plasmídico del ADN genómico, siguiendo fundamentalmente el método de lisis alcalina descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979) y modificado por Birnboim (1983). En un segundo paso, el lisado bacteriano se neutraliza y se ajusta a unas condiciones de alta salinidad en las que el ADN plasmídico se adsorbe a una matriz de sílice. El tercer paso consiste en el lavado y elución del ADN plasmídico en agua bidestilada estéril o tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

Los vectores de ADN plasmídico utilizados fueron el vector pBluescript KS (+) (pBSKS) (Stratagene) y los vectores de expresión pQE<sub>30</sub> y pQE<sub>31</sub> (Quiagen)

### **2.6.3 Aislamiento de ADN de bacteriófago .**

Para que la extracción de ADN recombinante positivo de fago λGem12 (Promega) tuviese un alto rendimiento, fue necesario partir de un lisado de fagos a gran escala. Para ello

hubo que determinar la dilución del *stock* de fago a la que se producía la lisis total de la placa y preparar un total de 6 placas por fago recombinante positivo, según se indica más adelante en el apartado 2.15. Tras la lisis total se le añadieron a cada placa 4 ml de medio de suspensión de fago (SM) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y MgSO<sub>4</sub> 10 mM). Las placas se incubaron con agitación suave a 4°C durante toda la noche y se recogió el sobrenadante, que contiene los fagos eluidos. A éste se le añadieron 500 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante o lisado clarificado constituyó el *stock* de fagos a partir del cual se extrajo el ADN.

La extracción de ADN de fago se realizó utilizando el *kit* comercial *Wizard Lambda Preps DNA Purification System* (Promega), siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante. El método de extracción se basa en la eliminación de la cubierta de las partículas de fago y la purificación del ADN mediante su unión a una resina, lavado y elución con agua bidestilada estéril.

## **2.7 Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas.**

### **2.7.1 Digestión del ADN con Endonucleasas de Restricción.**

Las digestiones del ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo según las condiciones de tampón de reacción y temperatura especificadas por el fabricante. El volumen total de reacción osciló entre 15 y 100 µl y el tiempo de incubación fue de 3-12 horas para la digestión de plásmidos y de 12 horas para la digestión de ADN genómico.

Las digestiones dobles se realizaron digiriendo con las dos enzimas de restricción a la vez cuando el tampón de reacción fue común para las dos enzimas. De no ser así se empleó el tampón de reacción One-Phor-All Buffer PLUS (OPA<sup>+</sup>), Amersham Pharmacia, en las condiciones dadas por el fabricante.

### **2.7.2 Tratamiento con fosfatasa alcalina.**

Este tratamiento se llevó a cabo para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos linealizados utilizados como vectores de clonación, e impedir, de este modo, su religación. El plásmido linealizado se incubó con fosfatasa alcalina de intestino

de ternera (Roche Diagnostics) en una proporción de 1 U de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADN, durante 1 hora a 37°C. La reacción de desfosforilación se llevó a cabo en el tampón en el que se realizó la digestión del ADN, al que se llevó al doble de volumen con agua bidestilada estéril y se le añadió tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (tampón de desfosforilación).

Las endonucleasas de restricción se inactivaron previamente por calentamiento según las condiciones específicas de cada una. El plásmido ya desfosforilado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa, separándose la fosfatasa del ADN, y se recuperó la banda de interés.

### **2.7.3 Ligación de fragmentos de ADN.**

Las moléculas recombinantes se obtuvieron mediante la combinación de fragmentos de ADN purificados, uno de los cuales era siempre un vector plasmídico. La ADN ligasa del fago T4 (Roche Diagnostics) cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-OH y 5'-P de ADN adyacentes. Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen final de 10-20  $\mu\text{l}$ , con 1 U de enzima y en el tampón de ligación suministrado por la casa comercial. Se empleó una relación molar de 1:1 o 1:2 (vector: inserto) y se utilizó una concentración de vector de 100-200 ng, según el tamaño del inserto de ADN. La mezcla de ligación se incubó 14 horas a 16°C y los plásmidos recombinantes se recuperaron en *E. coli*, mediante transformación con los productos de la reacción de ligación.

El tratamiento del ADN con las proteínas enzimáticas anteriores (fosfatasa alcalina y ADN T4 ligasa) se llevó a cabo siguiendo los protocolos habituales (Sambrook y col., 1989) y las recomendaciones de las casas comerciales suministradoras.

### **2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador de la marca Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600. Esta técnica se utilizó, básicamente, para la amplificación de fragmentos de ADN clonados en pBSKS, con cebadores diseñados para tal fin, que posteriormente serían ligados en los vectores plasmídicos de expresión de la serie pQE.

Las condiciones de reacción se optimizaron de acuerdo con lo descrito por Rychlik y col. (1990). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50  $\mu$ l, donde se incluyeron 1,25 U de la enzima Taq ADN polimerasa del sistema *AmpliTaq DNA polymerase* (Perkin Elmer), entre 20 y 40 pmol de cada cebador, tampón de reacción 1x (Perkin Elmer) y una concentración de 200  $\mu$ M de cada nucleótido (Roche Diagnostics). La cantidad de ADN molde fue normalmente de 20-50 ng, excepto para amplificar el gen completo *HSP70* donde se partió de 200 ng de molde.

La región codificante de la *Hsp70* de *L. braziliensis* fue amplificada mediante PCR a partir del plásmido pBS/Lb70, utilizando los siguientes cebadores específicos que incluyen regiones *linker* que especifican dianas de restricción (subrayadas):

Cebador *Hsp70 sense*: 5' GAAGGATCCACGTTTCGAGGGTGCTATTGG 3' (*Bam*HI)

Cebador *Hsp70 antisense*: 5' GGAAAGCTTTTAGTCGACCTCCTCGACCTTGG 3' (*Hind*III)

Se emplearon condiciones de PCR estándar, con una desnaturalización de 3 minutos a 94°C seguida de 10 ciclos con la  $T_m$  (temperatura de anillamiento) del cebador interno o sin la región *linker* (94°C 1 minuto, 66°C 1 minuto y 72°C 2 minutos) y otros 20 ciclos con la  $T_m$  correspondiente al cebador completo (94°C 1 minuto, 69°C 1 minuto y 72°C 2 minutos), finalizando con una elongación de 72°C 10 minutos. El producto amplificado y ligado posteriormente al vector pQE, constituyó la construcción pQE/rLb70.

Del mismo modo se obtuvieron las construcciones de 5 plásmidos de expresión conteniendo fragmentos solapantes de la región codificante de la *Hsp70*:

1. pQE/rLb70 (1-114):

Cebador *sense*: 5' GAAGGATCCACGTTTCGAGGGTGCTATTGG 3' (*Bam*HI)

Cebador *antisense*: 5' GAATTAAAGCTTGGTCTTCTCCTCGCCGTG 3' (*Hind*III)

2. pQE/rLb70 (109-245):

Cebador *sense*: 5' GAAGGATCCCACGGCGAGGAGAAGACC 3' (*Bam*HI)

Cebador *antisense*: 5' GAATTCCCGGGGCTCGGTGAAGAAGGTCAC 3' (*Sma*I)



3. pQE/rLb70 (240-357):

Cebador *sense*: 5' GTTGGATCCGTGACCTTCTTCACCGAG 3' (*Bam*HI)

Cebador *antisense*: 5' GAATTGAGCTCGAAGAAGTCGGACACCAG 3' (*Sac*I)

4. pQE/rLb70 (352-518):

Cebador *sense*: 5' GAAGGATCCCTGGTGTCCGACTTCTTC 3' (*Bam*HI)

Cebador *antisense*: 5' GAATTAAGCTTGATGTCGTCCTTGCTCAG 3' (*Hind*III)

5. pQE/rLb70 (513-663):

Cebador *sense*: 5' GAAGAGCTCTCTGAGCAAGGACGACATC 3' (*Sac*I)

Cebador *antisense*: 5' GGAAGCTTTTAGTCGACCTCCTCGACCTTGG 3' (*Hind*III)

Para la amplificación de los 5 fragmentos recombinantes se redujeron los tiempos de los ciclos a 30 segundos para la desnaturalización y anillamiento y a 1 minuto para la elongación.

El resultado de la amplificación se visualizó sometiendo una muestra del producto amplificado a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados se purificaron añadiendo un volumen de una mezcla de fenol/cloroformo/isoamílico (25/24/1) y mezclando por inversión. A continuación, la mezcla se centrifugó a 13.000 x g, durante 10 minutos, y se retiró la fase acuosa, a la que se le añadió 0,1 volumen de acetato sódico 3 M, pH 5,3, y 2 volúmenes de etanol (a -20°C). La mezcla se mantuvo a -80°C durante 2 horas, y el ADN precipitado se recogió mediante centrifugación a 13.000 x g, 30 minutos, se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó al vacío y se resuspendió en 25 µl de agua bidestilada estéril. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, purificados de geles de agarosa y clonados en pauta de lectura en plásmidos de expresión de la serie pQE (Clontech, Quiagen). Todos los fragmentos fueron clonados en fase en el plásmido pQE<sub>30</sub>, excepto la construcción pQE/rLb70 (513-663) que se realizó en el vector pQE<sub>31</sub>.

## 2.9 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño, se llevó a cabo en geles de agarosa cuya concentración osciló entre 0,6 y 1,5% (p/v), según los casos. Las electroforesis se desarrollaron en cubetas horizontales a voltaje constante (65-80 V) y

como tampón se utilizó TAE 1x (Tampón TAE 50x: Tris-HCl 2 M, pH 7,2, EDTA 50 mM, pH 8, ácido acético glacial 57,1 ml y agua bidestilada hasta 1 l). Las muestras se prepararon mezclando el ADN con tampón de carga de alta densidad, compuesto por azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v) y descrito como de tipo II por Sambrook y col. (1989). Para la visualización del ADN se añadió bromuro de etidio (0,2 µg/ml) al gel de agarosa y se le hizo incidir luz ultravioleta de longitud de onda de 340 nm a través de un transiluminador de la marca Ultra-Lum. La fotografía del gel se realizó con el sistema Gel Printer (TDI) en papel térmico Mitsubishi P90.

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó comparando las distancias que éstos recorrían en el gel de agarosa con la distancia que recorrían fragmentos de ADN de tamaño conocido. Como marcadores de peso molecular se utilizaron:

- ADN del fago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III (Roche Diagnostics). Los fragmentos generados tienen un tamaño de 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 y 120 pb.
- Marcador de peso molecular X (Roche Diagnostics). Derivado del plásmido de 2 µm de *Saccharomyces cerevisiae*, con fragmentos de 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517/506, 396, 344, 298, 220/201, 154/134, y 75 pb.
- Marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics). Los fragmentos tienen un tamaño de 2.642 y 1.500-100 pb, con un decremento de 100 pb de uno a otro.
- Marcador de peso molecular VII marcado con digoxigenina (Roche Diagnostics). Consiste en 17 fragmentos con pesos moleculares de: 8.576, 7.427, 6.106, 4.899, 3.639, 2.799, 1.953, 1.882, 1.515, 1.482, 1.164, 992, 718, 710, 492, 359 y 81 pb.

### **2.10 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.**

La recuperación de los fragmentos de ADN desde el gel de agarosa se realizó mediante la solubilización de la agarosa y la adsorción del ADN a una matriz de sílice en presencia de alta concentración salina, para ser posteriormente lavado y eluido en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. Para la purificación se utilizó el sistema *Quiaex II gel extraction kit*, de Quiagen, y se siguieron las recomendaciones del fabricante.

El fragmento de ADN purificado desde gel fue utilizado para su ligación a un vector plasmídico o para el marcaje, ya sea con digoxigenina o con isótopos radiactivos. Dado que en ambos casos se precisan fragmentos de ADN de elevada pureza, tras su purificación desde el gel, el fragmento de ADN se volvía a purificar mediante fenolización, tal y como se describió para los productos amplificados por PCR (2.8).

## **2.11 Transformación de ADN en *E. coli*.**

### **2.11.1 Preparación de células de *E. coli* competentes.**

Las cepas de *E. coli* utilizadas para la transformación con ADN fueron XL-2 Blue y Topp 3, ambas de Stratagene. Para la preparación de las células competentes se inocularon 5 ml de medio de cultivo LB con una colonia bacteriana y, tras 12 horas de incubación a 37°C, este cultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio LB precalentado a 37°C, el cual fue incubado a la misma temperatura, con agitación vigorosa, hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. El cultivo se mantuvo en agua/hielo durante 5 minutos y seguidamente las células se recogieron por centrifugación a 2.000 x g, durante 15 minutos a 4°C. Éstas se resuspendieron en MgCl<sub>2</sub> 100 mM, previamente enfriado en hielo, hasta 1/5 del volumen del cultivo y se incubaron en agua/hielo durante 20 minutos. Se recogieron de nuevo por centrifugación (1.000 x g, 15 minutos a 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/50 del volumen en CaCl<sub>2</sub> 100 mM, para ser incubadas durante 1 hora en agua/hielo. Finalmente, se le añadió a la suspensión de células competentes glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (v/v), y se dividió en alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf estériles que se conservaron a -80°C, un mínimo de 24 horas y un máximo de 6 meses, antes de ser utilizadas.

### **2.11.2 Transformación de células bacterianas competentes.**

El proceso de transformación de *E. coli* fue mediante choque térmico. Las células competentes se descongelaron en hielo durante 5-10 minutos. A 100 µl de células se le añadieron 20-50 ng de ADN plasmídico circular, o bien toda la mezcla de ligación (hasta 400 ng), y se mantuvo en agua/hielo durante 20 minutos. A continuación, la mezcla se incubó a 42°C durante 1 minuto y nuevamente se mantuvo en agua/hielo durante 5 minutos. Tras este enfriamiento se añadió 1 ml de medio SOC a temperatura ambiente y se

incubó durante 1 hora a 37°C con agitación suave, para permitir la recuperación de las bacterias. Por último, las bacterias se recogieron por centrifugación a 13.000 x g, durante 15 segundos, se resuspendieron en 200 µl de medio fresco y se sembraron diferentes cantidades en placas Petri que contenían medio de cultivo sólido LB-ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C de 12 a 16 horas.

### **2.11.3 Selección de los clones transformantes de *E. coli*.**

Todos los plásmidos utilizados portan el gen de resistencia a la ampicilina, por lo que la selección de los transformantes se basó en el hecho de que sólo las células transformadas pueden crecer en un medio que contenga este antibiótico. La selección de los clones que portaban los plásmidos recombinantes se realizó inoculando clones al azar en 5 ml de medio LB-ampicilina y creciendo el cultivo 12 horas. Se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con diversas enzimas de restricción para verificar la presencia del ADN inserto, del que también se determinó su secuencia nucleotídica.

## **2.12 Secuenciación de ADN.**

### **2.12.1 Reacción de secuenciación.**

La secuenciación del ADN se realizó según el método descrito por Sanger y col. (1977), a través de una reacción de PCR 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 nueva ADN polimerasa termoestable, creada por ingeniería genética específicamente para la secuenciación del ADN (Tabor y Richardson, 1995), y que mantiene la precisión de la T7 ADN polimerasa. La cantidad de ADN plasmídico utilizada fue de 2 µg y se añadieron 2 pmol de cebador. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador modelo GeneAmp 9600 de Perkin Elmer. Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron: 3 minutos a 95°C y 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento del cebador y 60 segundos a 72°C.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en las reacciones de secuenciación fueron:

- Para la secuenciación a partir del plásmido de clonaje pBSKS:

T7: 5' TAATACGACTCACTATA 3'

M13- Reverse: 5' TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'

- Para la secuenciación del gen completo *HSP70* de *L. braziliensis*:

nLb70-5'UTR: 5' ATAGCACCCCTCGAACGTCAT 3'

cLb70-1: 5'GTGACCTTCTTCACCGAG 3'

cLb70-2: 5'CTGGTGTCCGACTTCTTC 3'

cLb70-3: 5'TCTGAGCAAGGACGACATC 3'

- Para la secuenciación a partir del plásmido de expresión pQE:

pQE-Type III: 5' CGGATAACAATTTACACAG 3'

pQE-Reverse: 5' GTTCTGAGGTCATTACTGG 3'

### 2.12.2 Electroforesis.

Para la separación de los fragmentos de ADN generados en las reacciones de secuenciación se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida y urea, partiendo de geles preparados *ReproGel High Resolution* (Amersham Pharmacia). El tampón utilizado en la electroforesis fue TBE 0,5x (TBE 10x: Tris 1 M, ácido bórico 0,83 M, EDTA 10 mM) y las condiciones de la electroforesis fueron 1.500 V, 60 mA, 30 W y 55°C. La electroforesis y el posterior análisis de los resultados se hizo en un secuenciador automático AlfExpress DNA Sequencer de Amersham Pharmacia.

Los cebadores empleados para la reacción de secuenciación están marcados en su extremo 5' con carbocianina. Este compuesto es excitado por un rayo láser que atraviesa perpendicularmente el gel, emitiendo una radiación que es detectada por unos fotodetectores situados por detrás del mismo. Esta señal es enviada al ordenador y procesada. El procesamiento de los resultados y almacenaje de los datos se realizó mediante el software Alf Manager v. 3.1.

### 2.13 Clones recombinantes cedidos.

pGEM70: contiene el gen *HSP70* de *T. cruzi* clonado en el plásmido pGEM-T (Marañón y col., 2000). Se utilizó para la construcción de la sonda del gen completo *HSP70* de *T. cruzi*.

### 2.14 Detección de secuencias de ADN específicas.

#### 2.14.1. Inmovilización de ácidos nucleicos: Transferencia del ADN.

a) **Southern blot** La transferencia de ADN a un soporte sólido, como es una membrana, permite obtener una réplica exacta de las moléculas separadas en una electroforesis para su posterior hibridación con sondas específicas. Las hibridaciones ADN:ADN se realizaron mediante el método descrito por Southern (1975). Después de digerir el ADN genómico (2 µg) o plasmídico (50-100 pg) con las enzimas de restricción adecuadas, los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Una vez finalizada la electroforesis, el ADN se sometió a un proceso de depurinación, sumergiendo el gel en HCl 0,25 N durante 10 minutos, y seguidamente se fraccionó parcialmente sumergiéndolo en NaOH 0,4 N durante 20 minutos. El ADN se transfirió sobre membranas de nylon cargadas positivamente (*Nylon membranes positively charged*, Roche Diagnostics), mediante capilaridad descendente, siguiendo el procedimiento descrito por Lichtenstein y col. (1990) y Chomczynsky (1992), y utilizando como solución de transferencia NaOH 0,4 N. Una vez que se transfirió el ADN sobre la membrana, ésta se neutralizó sumergiéndola en una solución que contenía Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 y SSC 2x (preparado a partir de una solución madre 20x, cuya composición es citrato sódico 0,3 M, pH 7,0, NaCl 3 M), durante 20 min. A continuación el ADN se fijó a la membrana de nylon horneándola, a 120°C, durante 30 min.

b) **Dot-blot.** En el *Dot-blot* el ADN es colocado en forma de gotas sobre la membrana de nylon, de modo que se omite la electroforesis y transferencia previas que se realizan en el *Southern blot*. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente 5 minutos, y luego se le fijó el ADN horneándola durante 10 minutos a 80°C.

### 2.14.2 Marcaje de sondas con digoxigenina.

El marcaje de las sondas de ADN y su cuantificación se llevó a cabo mediante la utilización de un *kit* de marcaje (DIG DNA Labelling and Detection Kit™, Roche Diagnostics), basado en la síntesis de cadenas complementarias mediante el método *Random Primer Labelling*, descrito por Feinberg y Vogelstein (1983). La cadena de ADN complementario es sintetizada por el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli*, que utiliza los terminales 3'OH de una mezcla de hexanucleótidos al azar como cebadores y una mezcla de dNTPs que contiene digoxigenina acoplada a dUTP (DIG-dUTP).

### 2.14.3 Marcaje de sondas con isótopos radiactivos ( $^{32}\text{P}$ ).

El método empleado para el marcaje de fragmentos de ADN con isótopos radiactivos fue el *Rediprime DNA labelling system* de Amersham Pharmacia, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este sistema también utiliza el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli*, pero incorpora [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP (3.000 Ci/mmol) en las cadenas sintetizadas utilizando cebadores al azar. Los nucleótidos marcados no incorporados se separaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-50 de 0,9 ml de lecho y equilibrada con 0,1 ml de agua bidestilada.

### 2.14.4 Hibridación ADN:ADN con sondas marcadas con digoxigenina.

Una vez transferido y fijado el ADN a la membrana, ésta se prehibridó incubándola en 20 ml de solución de prehibridación [SSC 5x, N-lauril sarcosina al 2% (p/v), SDS al 0,02% (p/v) y agente bloqueante (Roche Diagnostics) al 1% (p/v)], durante 2 horas a 68°C y con agitación suave, en un horno de hibridación “HB-2D Hibridizer”, de Techne. La hibridación de la membrana se llevó a cabo incubándola también a 68°C durante 14 h, utilizando 20 ml de solución de prehibridación, conteniendo 50 ng/ml de la sonda marcada con digoxigenina, previamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 10 minutos. Después de la hibridación, la membrana se lavó dos veces, durante 5 minutos cada una, en condiciones de baja astringencia [SSC 2x, SDS 0,1% (p/v)] a temperatura ambiente, y 2 veces más, de 15 minutos cada una, en condiciones de alta astringencia [SSC 0,1x, SDS 0,1% (p/v)] a 68°C. La detección inmunológica de la posición de las bandas de hibridación sobre la membrana se llevó a cabo según el *kit* comercial *DIG DNA Labelling and Detection Kit™* (Roche Diagnostics), siguiendo las instrucciones del fabricante. El

revelado está basado en el reconocimiento inmunológico de las sondas marcadas con DIG, mediante la utilización de un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina. La visualización del resultado se lleva a cabo sobre la membrana mediante la utilización de los sustratos colorimétricos NBT (*Nitro Blue Tetrazolium Salt*) y X-Fosfato (5-bromo-cloro-3-indolil-fosfato).

#### **2.14.5 Hibridación ADN:ADN con sondas marcadas radiactivamente.**

El ADN transferido a membrana que iba a ser hibridado con sondas radiactivas se prehibridó incubando la membrana en 20 ml de solución de prehibridación [formamida desionizada 50% (v/v), SSC 5x, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 6,5, SDS 0,2 % (p/v), solución de Denhardt 5x (Quantum)] a 42°C durante 2 horas. A la sonda se le añadieron 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón y se desnaturalizó hirviéndola a 95°C durante 5 minutos antes de mezclarla con la solución de hibridación (igual que la de prehibridación). La hibridación se mantuvo en agitación suave a 42°C durante 12-16 horas en el horno de hibridación “Hibridization oven/shaker” de Amersham Life Science. Tras la hibridación, la membrana se lavó en condiciones de baja astringencia 4 veces durante 5 minutos en solución SSC 2x, SDS 0,1% (p/v), a 42°C. Después se lavó durante 30 minutos a 55°C en condiciones de alta astringencia, en solución SSC 0,1x, SDS 0,1% (p/v).

Las membranas se protegieron de la desecación mediante sellado en bolsas de plástico, se expusieron a -80°C con placas autorradiográficas (Fuji Medical X-Ray Film) y se revelaron usando las soluciones de revelado de Fuji.

#### **2.15 *Screening* en una genoteca de ADN genómico de *Leishmania braziliensis*.**

El *screening* en la genoteca de ADN genómico se realizó para buscar el gen que codifica para la Hsp70 de *L. braziliensis*. La búsqueda se hizo por hibridación con una sonda heteróloga de ADN, consistente en el gen que codifica la Hsp70 de *T. cruzi*, que fue obtenida a partir de la construcción pGEM70 (Marañón y col., 2000). La genoteca de ADN genómico fue construida en el fago LambdaGem12 (Promega) usando ADN de promastigote de *L. braziliensis* digerido parcialmente con *Sau3A* (Carmelo y col, 2000).



### 2.15.1 Titulación de la genoteca.

Previo al *screening*, la genoteca se tituló para determinar el número de unidades formadoras de calvas (u.f.c.) por ml de genoteca. La cepa *E. coli* KW251 (Promega) se inoculó en 5 ml de medio LB suplementado con maltosa al 0,2% (p/v) y MgSO<sub>4</sub> 10 mM, y se creció durante 12 horas a 37°C. Se prepararon diluciones de la genoteca de fago desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup> en tampón de fago SM (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM). En tubos estériles (Sterilin, Afora) se mezclaron 100 µl de cada dilución de genoteca con 100 µl del cultivo de la bacteria. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 37°C produciéndose la adsorción de los fagos a las bacterias. A cada tubo se le añadió 3 ml de medio LB top-agarosa fundido (mantenido a 47°C), se mezcló por inversión y se vertió en placas de Petri que contenían medio LB sólido. Las placas se incubaron a 37°C durante 6-8 horas hasta que aparecieron las calvas de lisis. El recuento de unidades formadoras de calvas se realizó en aquellas placas en que las que aparecieron entre 20 y 200 calvas de lisis.

### 2.15.2 *Screening* de la genoteca.

Para el *screening* de la genoteca se eligió la dilución que producía unas 1.700 calvas por placa. Se emplearon un total de 6 placas, con lo que el número de calvas escrutadas fue de 1x10<sup>4</sup>. Una vez aparecieron las calvas de lisis, las placas se incubaron a 4°C durante 30 minutos y luego se realizó la transferencia a membrana de nylon (Roche Diagnostics) por contacto durante 1 minuto. La membrana se dejó secar sobre papel Wathman 3MM y luego se incubó sobre este mismo papel impregnado en las siguientes soluciones:

- Solución de desnaturalización NaOH 0,5 M, NaCl 1,5M, durante 5 minutos
- Solución de neutralización NaCl 1,5 M, Tris HCl 0,5M, pH 7,4, durante 15 minutos
- Solución SSC 2x, durante 15 minutos.

A continuación, el ADN se fijó a la membrana horneándola a 80°C durante, al menos, 30 minutos. Las membranas fueron prehibridadas, hibridadas y reveladas como se indicó en el apartado 2.14.4. Las calvas que dieron positivo a la hibridación con la sonda fueron aisladas desde el agar, recortando el trozo donde se localizó la calva. Éste fue disuelto en 1 ml de tampón de fago SM y 10 µl de cloroformo e incubado toda la noche a 4°C, para que los fagos eluyeran desde el agar. Se realizó un re-*screening* con los fagos

recombinantes positivos obtenidos. Para ello, se eligió la dilución de fago recombinante positivo que produjo unas 60 calvas por placa y se adsorbió a las bacterias y cultivó como se ha indicado. Tras la hibridación con la sonda específica, los fagos positivos recombinantes aislados fueron sometidos nuevamente a *screening*, para comprobar que se encontraban purificados y que no había contaminación con fagos negativos. El *stock* de fago recombinante positivo obtenido se mantuvo a 4°C o bien se le añadió dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 7% (v/v) en el caso de que se mantuviese a -80°C.

### 2.16 Obtención de extractos proteicos totales de *Leishmania braziliensis* y de *Trypanosoma cruzi*.

Los extractos proteicos totales se obtuvieron partiendo de  $1-2 \times 10^9$  parásitos de promastigotes de *Leishmania* y epimastigotes de *Trypanosoma*. Éstos se recogieron por centrifugación a  $2.000 \times g$  durante 15 minutos a 4°C, cuando se encontraban en fase logarítmica tardía ( $2-4 \times 10^7$  parásitos/ml), justo antes de entrar en fase estacionaria. Los parásitos se lavaron tres veces en tampón fosfato salino PBS pH 7,2 frío (NaCl 0,14 M, KCl 2,68 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,01 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76 mM) y se resuspendieron en 350  $\mu\text{l}$  de tampón de carga de Laemmli [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v)] (Laemmli, 1970). El lisado se hirvió durante 10 minutos y se centrifugó a  $14.500 \times g$  durante 30 minutos a 4°C. El extracto proteico se recogió con una jeringa Hamilton, con cuidado de no coger restos, y se dividió en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  que se mantuvieron a -80°C.

Los extractos proteicos totales de *L. braziliensis* que iban a ser utilizados en ensayos de ELISA se prepararon partiendo de  $1-3 \times 10^7$  parásitos/ml. Los parásitos se recogieron por centrifugación a  $2.000 \times g$ , 4°C, 15 minutos y se lavaron tres veces en tampón PBS frío. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis [Tris 0,05 M, EDTA 0,5 mM,  $\text{NaHSO}_3$ , SDS 1% (p/v), Nonidet P40 1% (v/v), PMSF 1% (p/v), pH 8]. El lisado se incubó a 4°C durante 1 hora, mezclando mediante vórtex ocasionalmente y se centrifugó durante 30 minutos a  $14.500 \times g$ , a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore), y se dializó frente a tampón PBS toda la noche a 4°C. El extracto proteico se mantuvo a -80°C.

Los extractos proteicos se cuantificaron usando el sistema *Micro BCA Protein Assay Kit*, de Pierce, siguiendo las condiciones del fabricante.

### **2.17 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE).**

Las muestras de proteína fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli (1970). Las electroforesis se llevaron a cabo en el sistema Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) y cuando se realizaron electroforesis preparativas o bien se requirió mayor capacidad resolutive se empleó el sistema Hoefer, serie SE-400. La separación de las proteínas fue desarrollada sobre geles en continuo en los que la concentración de acrilamida varió en función del experimento entre un 7 y un 13 % de reticulación. En muchos de los experimentos se utilizaron geles en gradiente de poliacrilamida, ya que estos ofrecen una mejor resolución cuando lo que se pretendía era separar proteínas de pesos moleculares muy similares. Estos geles fueron preparados según el método descrito por Hames (1987), y las concentraciones de acrilamida utilizadas para generar los gradientes dependieron del tipo de experimento que se realizó.

Las proteínas antes de ser cargadas en el gel se hirvieron durante 10 minutos en tampón de carga de Laemmli [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v)]. La electroforesis se desarrolló en tampón de electroforesis de proteínas SDS-PAGE 1x [SDS-PAGE 10x: Tris-HCl 250 mM, glicina 144 mM, SDS 10%], a amperaje constante, siendo de 12/20 mA para el sistema Mini-Protean y de 20-40 mA para el de Hoefer.

Cuando se pretendió realizar posteriormente la secuenciación del extremo amino-terminal, así como las digestiones internas de las proteínas, se añadieron 2 mg de tioglicolato sódico (Sigma) por cada 100 ml de tampón SDS-PAGE del reservorio superior del sistema de Hoefer. El gel se pre-corrió durante 2 horas tras lo que se renovaron los tampones, añadiéndole nuevamente tioglicolato sódico al reservorio superior, antes de cargar las muestras de proteína.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron los siguientes:

-*High Molecular Weight Standard Mixture for SDS gel electrophoresis* SDS 6H: 205.000, 116.000, 97.400, 66.000, 45.000, 29.000. Daltons (Sigma).

-Dalton Mark VII-L for SDS Electroforesis: 66.000, 45.000, 36.000, 29.000, 24.000, 20.000, 14.200. Daltons (Sigma).

-LMW Calibration kit: 94.000, 67.000, 43.000, 30.000, 20.000, 14.400 Daltons (Pharmacia).

-Kaleidoscope Prestained Standars: 218.000, 126.000, 90.000, 43.500, 33.900, 17.400, 7.600 Daltons (Bio-Rad).

La estimación de los pesos moleculares de las proteínas separadas tanto en geles en continuo como en geles en gradiente, se realizó en base a la relación Log PM-Rf y Log PM-Log %T, respectivamente, según describió Hames (1987).

### **2.18 Tinción de proteínas en los geles de poliacrilamida.**

Rutinariamente, las proteínas separadas mediante electroforesis se visualizaron tiñéndolas con azul Coomasie R-250 al 0,2% (p/v) en solución fijadora [metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v /v)], según el método descrito por Fairbanks y col. (1971). Los geles se destiñeron sumergiéndolos en una solución de metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), y finalmente se conservaron en ácido acético al 10% (v/v).

En el caso de que las proteínas separadas en SDS-PAGE fuesen posteriormente electroeluidas, las proteínas se visualizaron tiñendo el gel en una solución de azul de Coomasie al 0,05% (p/v) en agua bidestilada durante 1 hora y se destiñó sólo en agua bidestilada durante 1 hora, haciendo varios cambios de agua. De este modo se evitó la fijación de las proteínas al gel.

En ocasiones las proteínas de los geles se tiñeron mediante el empleo de nitrato de plata, utilizando un *kit* comercial (*Quick Silver*<sup>®</sup>, Amersham), basado en el método descrito por Morrissey (1981). Este tipo de tinción se usó cuando el grado de sensibilidad que se requirió fue mayor, como, por ejemplo, cuando se determinó el grado de pureza de las proteínas obtenidas tras el proceso de purificación.

### **2.19 Inmunodetección de proteínas fijadas en membrana (*Western-blot*).**

El análisis de *Western-blot* se llevó a cabo por métodos estándar (Towbin y col., 1979). Los componentes de una mezcla proteica son separados electroforéticamente

mediante SDS-PAGE y transferidos desde el gel a un soporte sólido donde se hibridan con anticuerpos.

### **2.19.1 Electro-transferencia de proteínas a membrana.**

El procedimiento seguido varió en función del tipo de membrana utilizada como soporte para la transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida.

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (HAHY 304FO, 0,45  $\mu$ m de poro, Millipore) se efectuó utilizando como tampón de transferencia Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v). La electro-transferencia se llevó a cabo utilizando el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad a 150 mA, a 4°C, durante 2 horas. La eficiencia del proceso se puso de manifiesto sumergiendo la membrana en una solución que contenía Ponceau S al 0,5% (p/v), en ácido acético glaciado al 1% (v/v).

Para la electro-transferencia de proteínas a membranas de PVDF (difluoruro de polivinidileno, Immobilon™-P, Millipore) se disminuyó la concentración de metanol del tampón de transferencia al 10%, y se siguieron las indicaciones de la casa comercial a la hora de tratar la membrana. Cuando la proteína se transfirió a membrana PVDF para la posterior secuenciación del extremo amino-terminal, como tampón de transferencia se utilizó CAPS 10 mM, pH 11, que contenía metanol al 10%. La electro-transferencia fue desarrollada a 25 V, durante toda la noche, siguiendo el procedimiento y las recomendaciones de Matsudaira (1987), y su eficiencia se comprobó también sumergiendo la membrana, durante 10 minutos, en una solución de Ponceau S al 0,5%, en ácido acético glaciado al 1% (v/v). El proceso fue llevado a cabo en una cubeta de electro-transferencia de la marca Hoefer Scientific Instruments.

### **2.19.2 Inmunodetección de proteínas inmovilizadas en membrana.**

Una vez terminado el proceso de transferencia las membranas fueron bloqueadas sumergiéndolas durante toda la noche en solución de bloqueo: T-TBS [Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1% (v/v)] con leche en polvo desnatada al 5% (p/v). Seguidamente, la membrana se lavó una vez, durante 10 minutos, y dos veces más, durante 5 minutos, con T-TBS. Las proteínas transferidas a membrana se incubaron con sueros humanos a una dilución de 1/1.500 en T-TBS, durante 1 hora 30 minutos. Después de lavar

la membrana como en el paso anterior, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulina G humana, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1/5.000 en T-TBS, durante otra hora y media. Después de lavar una vez, durante 15 minutos, y 3 veces, durante 5 minutos, con T-TBS, la membrana se equilibró sumergiéndola en el tampón de equilibrado de la fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) durante 5 minutos. A este tampón de equilibrado se le añadió el sustrato cromogénico NBT/BCIP (Roche Diagnostics) y la membrana se cubrió con esta solución. La reacción colorimétrica se desarrolló en oscuridad (1-5 minutos) hasta que el color alcanzó la intensidad deseada, y se paró sumergiéndola en abundante agua destilada. La membrana se conservó seca entre papel Wathman 3MM.

Cuando se emplearon sueros de conejos, se utilizó como segundo anticuerpo la anti-inmunoglobulina G de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Boehringer) diluida 1/5.000 en T-TBS.

### **2.20 Muestras biológicas.**

Los sueros empleados en la inmunodetección de proteínas, mediante *Western blot* o ELISA, fueron:

- 20 sueros de pacientes con leishmaniasis mucocutánea (LMC) y 30 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (LC), ambas producidas por *Leishmania braziliensis*, provenientes de Cuzco, Perú. Todos estos sueros fueron cedidos por la Dra. Rosa Luz Pacheco, del Departamento de Microbiología de la Universidad San Antonio Abad de Cuzco.
- 3 sueros de pacientes con leishmaniasis visceral (LV) producida por *Leishmania infantum* y procedentes de España. Fueron cedidos por el Dr. J. M. Requena, del CBM Severo Ochoa.
- 16 sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica procedentes de Brasil, cedidos por la Dra. Geny Aparecida; y otros 4 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 Perú sin antecedentes de contacto con *Leishmania*, y procedentes de la misma área geográfica que los sueros de LMC/LC, también cedidos por la Dra. Rosa Pacheco.
- 10 sueros de personas sanas de S/C de Tenerife que nunca han viajado a zonas endémicas de la enfermedad.
- 22 sueros de personas diagnosticadas con enfermedades autoinmunes, cedidos por las Dra. A. Jurado y M<sup>a</sup> J. Herrera, del Hospital Universitario de Canarias, sección de Inmunología.

Todos los pacientes con leishmaniasis presentaban lesiones activas y cultivos de biopsias positivos, a excepción de seis cuyas biopsias fueron negativas. Los sueros con Chagas crónico eran todos positivos por fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA.

Los sueros fueron ensayados previamente por ELISA frente a proteínas totales de *L. braziliensis* a una dilución de 1:400. Todos los sueros de las personas sanas de Perú y de S/C de Tenerife resultaron negativos, y se utilizaron como controles negativos.

### **2.21 Preabsorción de los sueros.**

En uno de los experimentos de *Western-blot*, los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea fueron previamente preabsorbidos con un extracto proteico total de *T. cruzi* para eliminar del suero los anticuerpos que producían reacción cruzada.

La cantidad de suero que se necesitaba para tener una dilución de 1:1.500 fue diluida 1:10 en solución de bloqueo, T-TBS [Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)] con leche en polvo desnatada al 5% (p/v), y se le añadieron aproximadamente 40 µg del extracto proteico de *T. cruzi*. La mezcla de preabsorción se incubó a temperatura ambiente durante 2-4 horas y posteriormente a 4°C durante toda la noche. La mezcla se centrifugó a 14.500 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se recuperó y se llevó a la dilución de 1:1.500 con T-TBS para ser utilizado en el *Western-blot*. En el residuo deben encontrarse precipitados los conjugados anticuerpo-proteína que presentaron reacción cruzada.

### **2.22 Análisis densitométrico.**

Los patrones de proteínas totales de *L. braziliensis* y de *T. cruzi*, obtenidos por SDS-PAGE, y los de seroreactividad frente a sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y sueros chagásicos, obtenidos por *Western-blot*, fueron analizados con el densitómetro láser Ultro Scan XL utilizando el sistema *Gel Scan XL (2.1) Software Package*, ambos de Pharmacia.

### **2.23 Purificación de proteínas desde geles de SDS-poliacrilamida: Electroelución.**

La separación de la proteína del gel mediante corriente eléctrica o electroelución, se empleó para purificar las proteínas antigénicas de *L. braziliensis* pLb70, pLb87 y pLb99 a partir de un extracto proteico total del parásito. También se electroeluyeron las proteínas recombinantes expresadas en el sistema pQE. Se utilizó el Electro-Eluter, modelo 422, de Bio-Rad. Tras una electroforesis preparativa en gel de SDS-poliacrilamida, las proteínas se visualizaron como se describió en el apartado 2.18. Los tacos de gel que contenían las bandas proteicas de interés se recortaron y las proteínas se electroeluyeron a través de membranas de punto de corte de 12-15 kDa o de 3,5 kDa de Bio-Rad, según el peso molecular. El tampón utilizado fue el mismo que para el SDS-PAGE y la electroelución se desarrolló a 10 mA por tubo, a 4°C durante 8 horas y con agitación. Las proteínas electroeluidas se dializaron y se dividieron en alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su uso.

### **2.24 Diálisis de disoluciones de proteínas.**

Las muestras proteicas a dializar se introdujeron en bolsas de membrana de diálisis tubular de 16 mm de diámetro (Sigma), con un límite de exclusión de 12 kDa y se equilibraron sumergiéndolas en tampón fosfato salino PBS, pH 7,2 [NaCl 0,14 M, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM] y el inhibidor de proteasas PMSF 1mM, con agitación durante toda la noche a 4°C.



## 2.25 Obtención de anticuerpos policlonales en conejo.

Las fracciones proteicas purificadas de *L. braziliensis*, pLb70, pLb87 y pLb99, fueron concentradas mediante centrifugación utilizando los filtros concentradores *MICROSEPT microconcentrators* (Filtron) de 10 kDa de punto de corte, a 5.000 x g y 4°C hasta un volumen de 500 µl. A las muestras concentradas se les añadió PMSF 1 mM y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. La inmunización se realizó con 500 µg de pLb70, 350 µg de pLb87 y 150 µg de pLb99; las 2 dosis de refuerzo fueron con 280 µg de Lb70, 200 µg de pLb87 y 75 µg de pLb99, cada una.

Para la inmunización se utilizaron 3 conejos *New Zealand* machos de 3 kg de peso y de 5 meses y medio de edad. Los 500 µl de proteína purificada se mezclaron con un volumen de coadjuvante de Freund's completo (Sigma), y esta emulsión se inoculó mediante inyección intradérmica en el lomo, en 10 dosis de 0,1 ml. A cada conejo se le extrajeron unos 2 ml de sangre de la vena lateral antes de la inmunización (suero preinmune), a los 10 días y a los 30 días. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 2.000 x g, durante 5 minutos, para obtener el suero, que se dividió en alícuotas y se guardó a -80°C. Tras la toma de una muestra de sangre a los 30 días, se inoculó la 1ª dosis de refuerzo. Las proteínas se mezclaron con un volumen (500 µl) de coadjuvante de Freund's incompleto (Sigma) y la suspensión se inyectó por vía intramuscular en las patas traseras de los conejos. Se obtuvo una muestra de suero a los 7 y 14 días del refuerzo. La 2ª dosis de refuerzo se inoculó a los 14 días de la primera, y se volvió a obtener suero pasados otros 14 y 30 días. Los sueros que se fueron obteniendo en el seguimiento de la inmunización iban siendo testados paralelamente, mediante *Western-blot*, para determinar el nivel de anticuerpos producidos. Al cabo de 1 mes del 2º refuerzo, los conejos fueron anestesiados y sacrificados y el desangrado total se realizó por la arteria central de la oreja y por la vena cava. La sangre recogida (100 ml) se dejó coagular a temperatura ambiente unas 5 horas y se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos. El suero obtenido con cada proteína se volvió a centrifugar a 7.000 x g durante 15 minutos a 4°C, para eliminar residuos. Los sueros se dividieron en alícuotas de 2 ml y se conservaron a -80°C hasta su uso.

Todo el proceso de inmunización de los conejos se realizó en el Animalario de la Facultad de Medicina, y se siguieron los protocolos generales dados por Harlow y Lane (1988).

## **2.26 Inducción, solubilización y purificación de proteínas recombinantes.**

Las proteínas recombinantes fueron obtenidas utilizando el sistema *QIAexpress*<sup>TM</sup> de Quiagen. Este sistema emplea vectores de expresión de la serie pQE en los que el fragmento de ADN de interés, que codifica una proteína determinada, es clonado en aquel vector de la serie que permite que quede en pauta de lectura. La proteína de interés es expresada como una proteína de fusión a la que se le ha añadido una diana de afinidad específica, que consiste en 6 residuos de histidina consecutivos (6xHis). El uso de la diana de afinidad simplifica la purificación de la proteína de fusión recombinante, ya que permite utilizar métodos de afinidad cromatográfica. En este sistema la purificación se realiza mediante una cromatografía de afinidad a metal utilizando matrices de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA), donde los residuos de histidina interaccionan con el níquel.

Los vectores de expresión utilizados fueron el pQE<sub>30</sub> y pQE<sub>31</sub>, en los que la diana 6xHis queda en el extremo amino de la proteína de fusión. La matriz cromatográfica usada fue Ni-NTA agarosa, compuesta por Ni-NTA acoplada a Sepharosa®CL-6B, que ofrece una alta capacidad de unión y una mínima unión inespecífica.

Con este sistema se purificó la proteína recombinante Hsp70 de *L. braziliensis*, así como los 5 fragmentos recombinantes solapados en que se dividió la misma para realizar el mapeo antigénico.

### **2.26.1 Ensayo de inducción de las proteínas recombinantes.**

Las condiciones óptimas de inducción se determinaron para cada proteína recombinante, variando tanto las concentraciones del inductor IPTG (Roche Diagnostics), como los tiempos de inducción. La inducción de las proteínas recombinantes se realizó en un sistema bacteriano, utilizando la cepa Topp 3 de *E. coli*.

Se inoculó un cultivo de la cepa de *E. coli* que portaba la construcción recombinante en 5 ml de medio LB-ampicilina, y se dejó crecer a 37°C durante 14 horas. Con este precultivo se inocularon 4 matraces Erlenmeyer (de 50 ml de capacidad),

conteniendo 5 ml de LB-ampicilina y PMSF 0,5 mM cada uno, de modo que la densidad óptica inicial del cultivo fuese de 0,5 a 600 nm. A cada uno de ellos se les añadió IPTG a concentraciones finales de 0, 0,5, 2 y 4 mM, y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa. A las 2 y 4 horas se tomaron alícuotas de 1,5 ml de cada cultivo, las células se recogieron por centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos y se lisaron con 150 µl de tampón de carga de Laemmli. A cada lisado se le añadieron 20 µl de una solución madre de una mezcla de inhibidores de proteasas *Complete, mini, EDTA-free tablets* (Roche Diagnostics). En cada toma de muestra los matraces se colocaron sobre hielo para ralentizar el crecimiento y se les volvió a añadir PMSF a concentración final de 0,5 mM antes de volverlos a incubar a 37°C, ya que éste se va inactivando con la temperatura. Las muestras proteicas se guardaron a -20°C hasta someterlas a electroforesis. Se cargaron 5 µl en un gel de 0,75 mm de grosor (Mini-Protean, Bio-Rad). La inducción se verificó comparando con el cultivo sin inducir, y se tomaron la concentración de IPTG y el tiempo con los que la proteína recombinante se indujo mejor.

### **2.26.2 Solubilización de las proteínas recombinantes en condiciones desnaturalizantes.**

Todas las proteínas recombinantes se solubilizaron y purificaron en condiciones desnaturalizantes, ya que se iba a estudiar posteriormente la respuesta inmune humoral de los diferentes sueros frente a los determinantes antigénicos lineales de las proteínas.

Se inocularon 10 ml de medio LB-ampicilina con la cepa de *E. coli* recombinante y se incubó a 37°C durante 14 horas. Con este precultivo se inocularon 100 ml de medio fresco LB-ampicilina con PMSF 0,5 mM llevándolos a DO<sub>600</sub> inicial de 0,5. Paralelamente se realizó un control negativo al que no se le añadió inductor. La inducción se realizó con la concentración de IPTG y durante el tiempo previamente determinados, a 37°C con agitación vigorosa y en un matraz Erlenmeyer que permitiera una buena aireación del cultivo. Se tomaron muestras de 1,5 ml del cultivo inducido y del no inducido, donde las células se recogieron y lisaron como se indicó en el apartado anterior. Las células del cultivo inducido se recogieron en tubos Falcon preenfriados centrifugando a 2.000 x g, a 4°C durante 10 minutos, y la masa celular se mantuvo en hielo durante 15 minutos. Ésta se lisó con una solución desnaturalizante de urea 8 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, Tween-20 al 0,1% (v/v), β-Mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10% (v/v), a un pH próximo al punto

isoelectrico teórico de la proteína. Se tomó la relación 1 g de células (peso húmedo)/ 5 ml de tampón de lisis. Se le añadió PMSF a concentración final de 1 mM y se incubó con agitación suave a 4°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo la suspensión bacteriana se sonicó con 6 pulsos de 30 segundos-1 minuto de descanso hasta que quedó clara, incrementándose el número de pulsos cuando fue necesario. La suspensión se centrifugó a 13.000 x g durante 30 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante, que constituyó el extracto proteico solubilizado. El residuo también se lisó con 150 µl de tampón de carga de Laemmli, siendo el extracto insoluble. Ambos se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Una alícuota de 5 µl de solubilizado y de 2,5 µl de extracto insoluble se visualizaron en un gel SDS-PAGE, junto con una muestra del cultivo inducido y no inducido, para comprobar que la proteína recombinante se había inducido y solubilizado correctamente, y si también estaba presente en el material insoluble.

### **2.26.3 Solubilización de las proteínas recombinantes en condiciones no desnaturizantes.**

La proteína recombinante rLb70(513-663) fue también solubilizada y purificada en condiciones no desnaturizantes con el fin de estudiar la respuesta inmune humoral hacia sus determinantes antigénicos conformacionales.

El cultivo de *E. coli* con la construcción recombinante se indujo en las condiciones descritas anteriormente, y la masa bacteriana se resuspendió en una solución de lisis que contenía NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM, a pH 8, a razón de 1g células (peso húmedo)/ 5 ml de solución de lisis, a la que se le añadió MgCl<sub>2</sub> 5 mM (estabiliza la conformación de la proteína nativa), Tween-20 0,1 % (v/v), PMSF 1 mM y glicerol 10%. La suspensión se mantuvo en agitación suave a 4°C durante 3 horas y luego se sonicó con 8 pulsos de 1minuto/1 minuto de descanso. Se centrifugó durante 30 minutos a 13.000 x g, 4°C, guardando el sobrenadante (extracto soluble) y lisando el residuo con 150 µl de tampón de Laemmli (extracto insoluble).

Una alícuota de 5 µl de solubilizado y de 2,5 µl de extracto insoluble se visualizaron en un gel SDS-PAGE, junto con una muestra del cultivo inducido y no inducido. Los extractos se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

#### **2.26.4 Purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup>.**

Se tomó 1 ml de resina Ni-NTA agarosa (Quiagen) y se equilibró previamente durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación suave, en el mismo tampón en el que se había solubilizado la proteína. A la resina se le añadió el extracto proteico solubilizado y se incubó con agitación suave a 4°C durante 12 horas en un tubo estéril Sterilin (Afora), produciéndose la adsorción de la diana 6xHis de la proteína recombinante al ión níquel de la resina. La mezcla se empaquetó en una columna que se construyó con una jeringa de 2 ml de capacidad a la que se le puso un trozo de gasa estéril en la base de émbolo para retener la resina. El eluido, que normalmente contiene algo de resina que escapa por la gasa, se recogió y se volvió a empaquetar. El denominado efluente de la columna es el eluido que sale por 2ª vez de la misma, que contiene la mayoría de las proteínas de *E. coli*. La resina se lavó entonces 2 veces con 2 ml de la solución de solubilización utilizada en cada caso, pero a pH 7,5 y 6,5. Las fracciones de los lavados con cada pH se recogieron en un mismo tubo. La elución de la proteína recombinante unida a la resina se realizó con 2 ml de solución de solubilización a pH 5,5, pasando primero 1 ml y luego el otro ml, y con 1,5 ml de la solución de solubilización a pH 4,5, divididos en 3 pases de 500 µl cada uno. Las fracciones del mismo pH se recogieron juntas.

En el caso de la proteína recombinante rLb70(109-245), a la mezcla resina-solubilizado se le añadió imidazol a concentración final 10 mM, que a bajas concentraciones reduce la unión de proteínas de *E. coli* que puedan copurificar. A las soluciones de lavado pH 7,5 y 6,5 también se les añadió imidazol 10 mM. Las soluciones de elución pH 5,5 y 4,5 no llevaron β-Mercaptoetanol ni imidazol. En la purificación de la proteína recombinante rLb70 (513-663) en condiciones no desnaturizantes, también se añadió imidazol a concentración final 10 mM sólo a las soluciones de lavado.

Todo el proceso de empaquetado y purificación se realizó por decantación lenta de las distintas soluciones a través de la columna, y el mecanismo de purificación consistió en un gradiente de pH. Los residuos de histidina tienen un pK<sub>a</sub> de 6,0, y se protonan cuando el pH se reduce a 4,5-5,5. Bajo estas condiciones, la proteína recombinante no puede mantenerse unida a los iones níquel y se disocia de la resina.

Se tomaron 5 µl de cada una de las fracciones obtenidas: solubilizado (antes de unir a la resina), efluente de la columna; lavado pH 7,5; lavado pH 6,5; elución pH 5,5; elución pH 4,5; y 2,5 µl de cultivo inducido y no inducido, lisados con tampón de Laemmli, y se sometieron a electroforesis, comprobándose en qué fracción se localizaba la proteína.

## **2.27 ELISA.**

Los ensayos ELISA para evaluar el reconocimiento antigénico de las distintas proteínas recombinantes por los sueros relatados en 2.20, se realizaron en placas *microtiter Immulon 4HBX (High Binding Extra)*, Dynex. Las placas fueron sensibilizadas con 100 µl de proteína por pocillo y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las proteínas se diluyeron en tampón carbonato (NaHCO<sub>3</sub>/ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM, pH 9,6) a una concentración de 2 µg/ml para la proteína recombinante de *L. braziliensis* Hsp70 y de 4 µg/ml para los distintos fragmentos recombinantes en que se dividió la Hsp70. A continuación se desechó la proteína que no se había unido y las placas se lavaron durante 5 minutos, 3 veces, con 150 µl de tampón PBS-Tween-20 0,05% (v/v) a temperatura ambiente y con agitación. La incubación con los sueros de los pacientes se realizó durante 1 hora a 37°C, con 100 µl de los sueros diluidos 1:100 en PBS-Tween-20 0,05% (v/v) con leche en polvo desnatada al 5%. Tras desechar esta solución, las placas se lavaron de la misma manera y cada pocillo se incubó durante 1 hora a 37°C con un segundo anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina IgA + IgG + IgM (H+L) humana conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch), en un volumen de 100 µl y diluido 1:2.000 en PBS-Tween-20 0,05% (v/v) con leche en polvo desnatada al 5%. Esta solución se desechó, las placas se lavaron de nuevo y se revelaron con 100 µl por pocillo de *o*-fenildienamina (OPD, Sigma) en tampón citrato (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 66 mM, pH 5,15) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos y en oscuridad. Esta solución de revelado se preparó al instante de ser utilizada como sigue: 25 ml de tampón citrato + 6 mg de OPD + 75 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tras los 30 minutos de revelado, la reacción se paró añadiendo 200 µl de ácido sulfúrico 2N por pocillo y se determinó la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas (Titertek Multiskan® PLUS).

Cuando se ensayaron los sueros frente a proteínas totales de *L. braziliensis*, se diluyeron 1:400 y las placas se sensibilizaron con 500 ng de proteína total por pocillo.

### **2.28 Determinación de auto-anticuerpos en suero.**

Se utilizó el sistema *INNO-LIA-ANA* (Innogenetics), como indicó el fabricante, para determinar si los sueros de los enfermos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea procedentes de Perú presentaban enfermedades autoinmunes. La presencia en el suero humano de anticuerpos contra algunos tejidos propios es un indicador del padecimiento de determinadas enfermedades autoinmunes, como puede ser el Lupus Eritematoso Sistémico o las conectivopatías. Este sistema permite detectar la presencia en el suero de anticuerpos contra diferentes antígenos citoplasmáticos y nucleares, como los Sm (SmB y SmD), RNP (RNP-70k, RNP-A y RNP-C), proteínas ribosomales P e histonas, entre otros.

### **2.29 Análisis informático.**

Para los análisis de similitud de secuencia, identificación de dominios y otras características deducidas de la secuencia proteica de la Hsp70, se utilizaron los programas BLASTA (Altschul y col., 1997); ALIGN (Myers y Miller, 1988); PrositeScan y ProfileScan, del servidor ISREC y SAPS (Brendel y col.,1992). Los estudios referentes a las características de estructura secundaria y temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos, así como de los puntos isoeléctricos teóricos, se realizaron con la aplicación del programa “Genne-Runner”.

La secuencia de nucleótidos del gen *HSP70* de *L. braziliensis* incluida en este trabajo se encuentra depositada en la base de datos “GeneBank” con el número de acceso AF291716.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

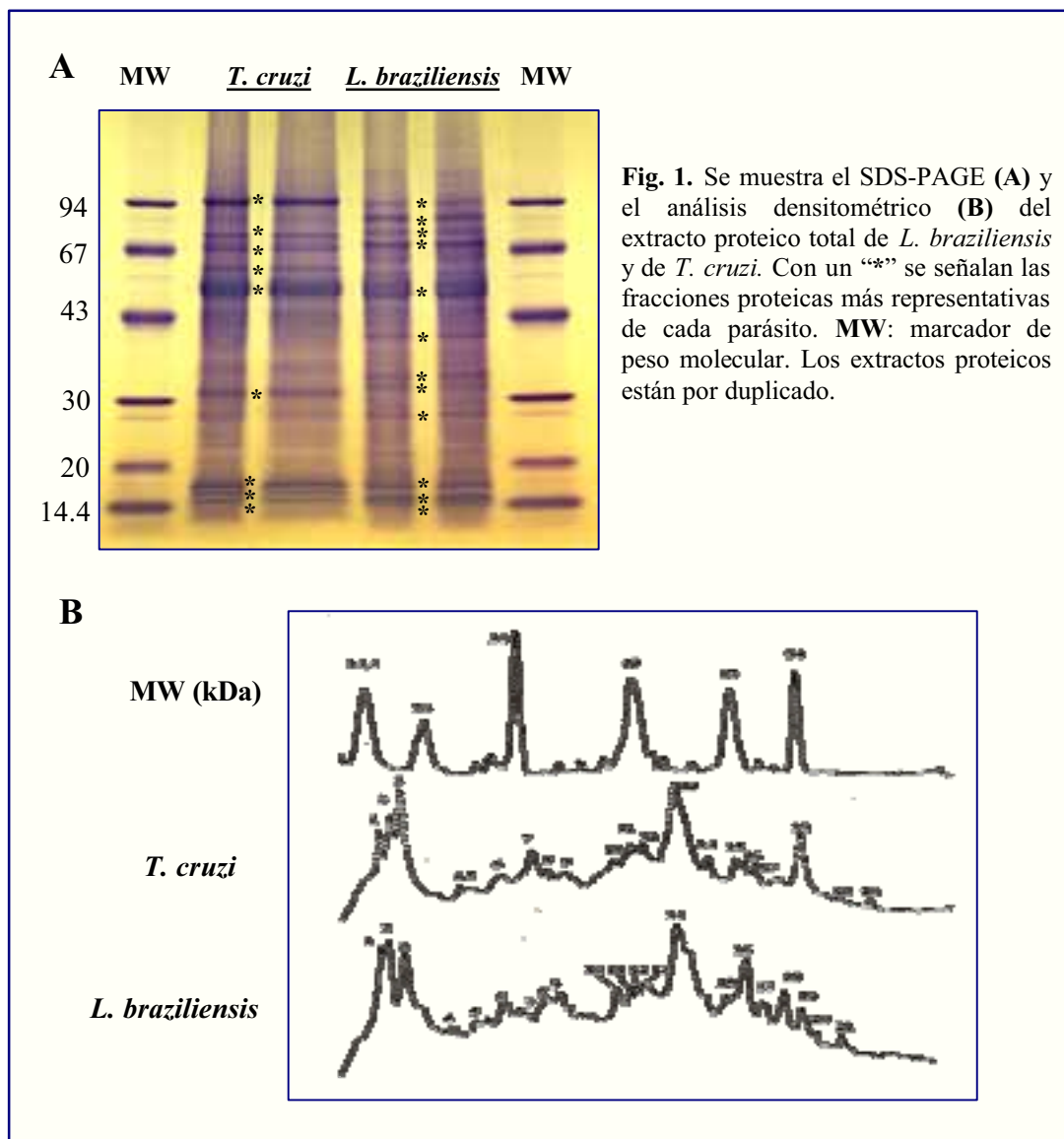
#### 3.1 Identificación de proteínas antigénicas específicas de *Leishmania braziliensis*, útiles para el diagnóstico.

En esta primera parte del trabajo se caracterizaron, mediante análisis de *Western-blot*, los componentes antigénicos de *Leishmania braziliensis* y de *Trypanosoma cruzi* con el objeto de identificar los antígenos específicos y comunes de ambos parásitos, y de este modo seleccionar aquellos antígenos con una posible utilidad en el diagnóstico inmunológico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea debidas a la infección por *L. braziliensis*.

##### 3.1.1 Establecimiento de los patrones proteicos de *L. braziliensis* y de *T. cruzi*.

En primer lugar se estableció el patrón proteico propio de cada parásito. Para ello, se obtuvieron los extractos de proteínas totales de promastigotes de *L. braziliensis* y de epimastigotes de *T. cruzi*, ambos en fase logarítmica tardía de crecimiento. Como se relató en el apartado 2.16 de Materiales y Métodos, los parásitos se lisaron en tampón de Laemmli (1970), quedando las proteínas solubles. Se tomaron 8 µg de cada extracto y los componentes proteicos se separaron mediante SDS-PAGE en un gel en gradiente del 7 al 15% de reticulación y de 1,5 mm de grosor, utilizando el sistema Mini-Protean de BioRad. En ambos casos se detectaron polipéptidos con un rango de pesos moleculares desde menos de 14 kDa hasta más de 100 kDa, como se observa en la Figura 1.A. Estas fracciones proteicas se sometieron a análisis densitométrico para obtener el perfil o patrón proteico característico de cada parásito (Figura 1.B). Se numeraron los picos obtenidos en el densitometrado, y el tamaño molecular de cada uno se estimó en función de la migración de los marcadores de peso molecular según Hames (1987). Se obtuvieron 20 picos correspondientes a las fracciones proteicas de *T. cruzi*, y 21 picos correspondientes a *L. braziliensis*. En ambos, destacaron por su intensidad los picos 1, 2 y 3 de bajo peso molecular, así como las fracciones 7, 13, 14, 15, 17 y 18 de *T. cruzi* y las fracciones 6, 8, 9, 10, 14, 16, 18 y 19 de *L. braziliensis* (señaladas con un \* de mayor a menor en la Fig. 1. A). La fracción 13 de *T. cruzi* y la 14 de *L. braziliensis*, están compuestas a su vez por varias fracciones proteicas de pesos moleculares muy próximos que bajo estas condiciones no se resolvieron bien. En la Tabla 1 se indican los pesos moleculares de las fracciones

más representativas de los dos patrones proteicos. Estos pesos son aproximativos debido a las condiciones de resolución empleadas en el SDS-PAGE.



**Fig. 1.** Se muestra el SDS-PAGE (A) y el análisis densitométrico (B) del extracto proteico total de *L. braziliensis* y de *T. cruzi*. Con un “\*” se señalan las fracciones proteicas más representativas de cada parásito. MW: marcador de peso molecular. Los extractos proteicos están por duplicado.

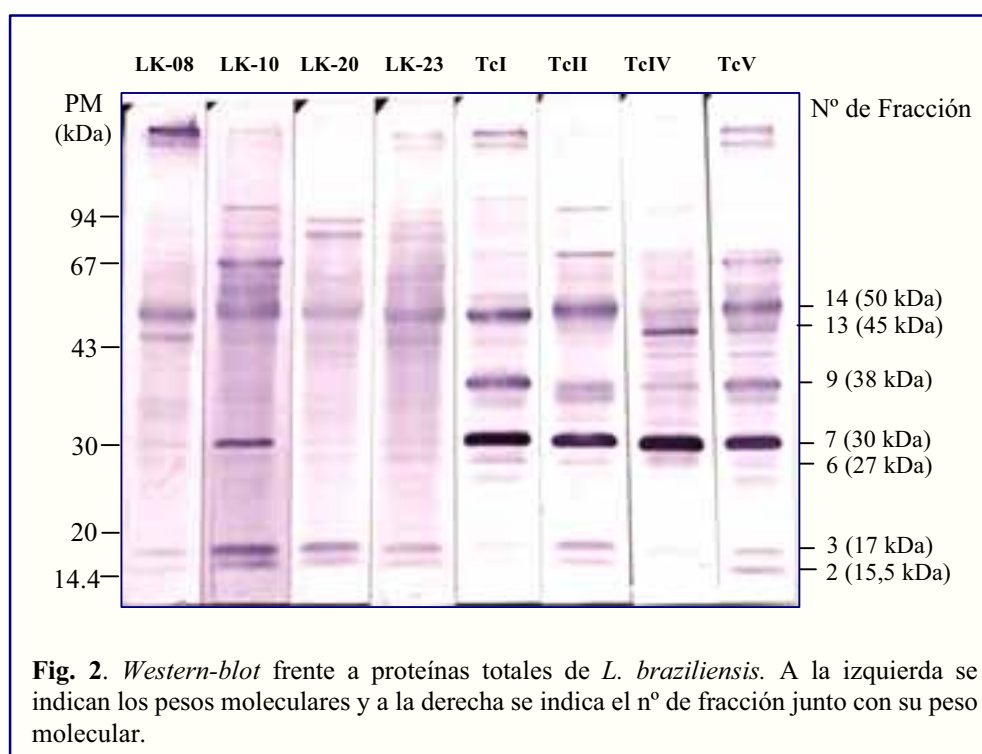
<i>L. braziliensis</i>	1 14,8 kDa	2 15,5 kDa	3 17 kDa	6 27 kDa	8 35 kDa	9 38 kDa	10 40 kDa	14 50 kDa	16 70 kDa	17 78 kDa	18 87 kDa	19 99 kDa
<i>T. cruzi</i>	1 15 kDa	2 16 kDa	3 17 kDa	7 30 kDa	13 50 kDa	14 60 kDa	15 69 kDa	17 75 kDa	18 99 kDa			

**Tabla 1.** Pesos moleculares de las fracciones más representativas de los patrones proteicos de *L. braziliensis* y de *T. cruzi*.

### 3.1.2 Análisis de *Western-blot* frente a antígenos totales de *Leishmania braziliensis*.

Para determinar los antígenos de *L. braziliensis* que eran específicos de esta parasitosis y los que mostraban reacción cruzada con la enfermedad de Chagas, se analizó la respuesta inmune humoral de sueros de pacientes con ambas enfermedades frente a las proteínas totales de *L. braziliensis*. Para ello, se emplearon 4 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (LC) activa (LK-08, LK-10, LK-20 y LK-23) y otros 4 de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica (TcI, TcII, TcIV y TcV).

La electroforesis con el extracto proteico total de *L. braziliensis* se realizó manteniendo las mismas condiciones con las que se elaboró el patrón de fracciones proteicas. Tras la transferencia a membrana de nitrocelulosa ésta se cortó en tiras longitudinales y 4 de ellas se incubaron con los sueros de pacientes con LC y las otras 4 con los sueros de pacientes chagásicos. Todos los sueros se emplearon diluidos 1/1.500 en tampón T-TBS. (Figura 2)



Las tiras obtenidas tras el *Western-blot* se densitometraron. Los picos obtenidos con cada suero se extrapolaron a los del patrón proteico de *L. braziliensis* elaborado previamente, determinando a qué fracción proteica correspondían. El patrón antigénico se

estableció de la siguiente manera: se compararon los densitometrados de los 4 sueros de pacientes con LC por un lado y de los 4 sueros chagásicos por otro, y se escogieron sólo aquellas fracciones que fueron comunes a todos los sueros de pacientes con LC, y las que fueron comunes a todos los sueros chagásicos. Además sólo se tuvieron en cuenta las fracciones más representativas en cuanto a la intensidad de la señal.

Como se puede observar, hay una extensa reacción cruzada de los sueros chagásicos con las proteínas de *L. braziliensis*, tal y como ya han descrito diversos autores (Chiller y col., 1990; Brito y col., 2000). Cada suero dio un patrón de hibridación diferente, destacando las fracciones 2, 3 y 14, que fueron comunes a todos ellos y que fueron reconocidas de un modo prominente. De resto, los sueros de pacientes con LC que se utilizaron no mostraron un patrón de bandas definido, sino que más bien todas las proteínas de *L. braziliensis* fueron reconocidas de un modo “basal”, como ruido de fondo. Con los sueros chagásicos, por contra, si hubo un patrón definido, donde destacaron determinadas fracciones por su elevada señal de reconocimiento.

En la Tabla 2 se muestran las fracciones reconocidas por los sueros LC y por los sueros chagásicos.

Nº Fracción/ PM (kDa)	2 (15,5)	3 (17)	6 (27)	7 (30)	9 (38)	13 (45)	14 (50)
Sueros LC	+	+	+	?		+	+
Sueros chagásicos	+	+	+	+	+	+	+

**Tabla 2.** Fracciones antigénicas de *L. braziliensis* reconocidas por los sueros con LC y por los sueros chagásicos.

La fracción 6 fue reconocida por todos los sueros LK pero no de una forma importante, sin embargo está señalada como “+” sólo para indicar que no fue reconocida exclusivamente por los sueros chagásicos. Según se observa en el *Western-blot*, la fracción nº 7 de 30 kDa fue intensamente reconocida por todos los sueros chagásicos correspondiendo al pico que mayor área relativa presentó, a pesar de su baja representatividad en el extracto proteico. El hecho de que también fuese reconocida con una relativa intensidad por el suero LK-10, hizo que en la Tabla 2 se indicara con un “?”.

En la región del gel donde se localizaron las proteínas con peso molecular superior a 50 kDa, el patrón de hibridación fue más variable y no se observó claramente ninguna fracción a tener en cuenta.

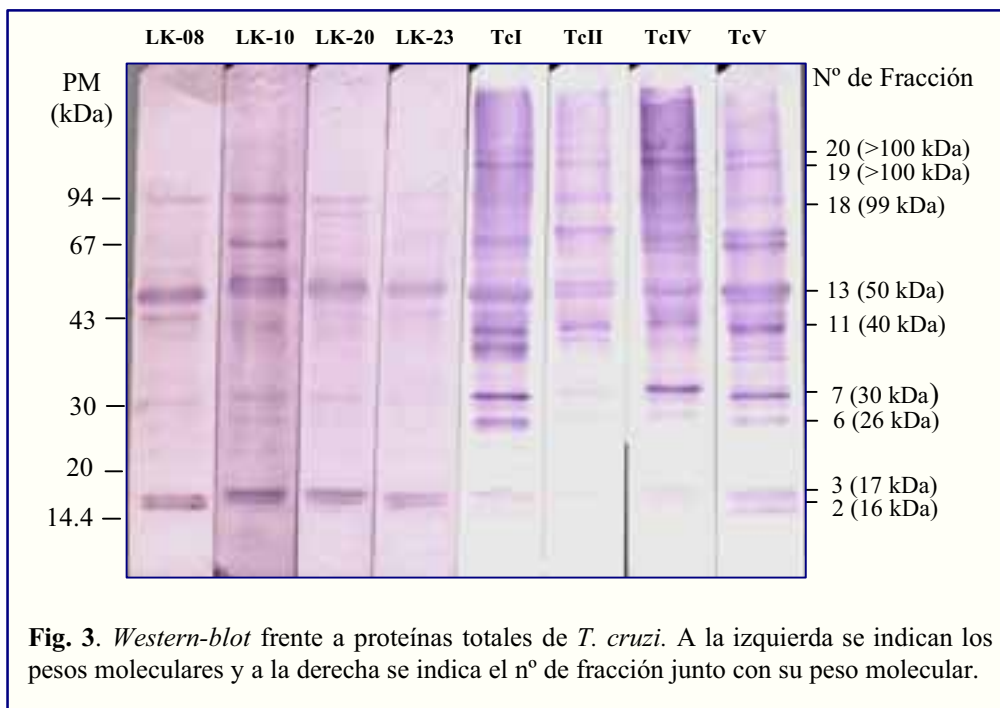
Los datos preliminares obtenidos tras el análisis de seroreactividad de los antígenos de *L. braziliensis* fueron que, en principio, el patrón antigénico de *L. braziliensis* no es definido, y que aquellas bandas que resaltaron también mostraron determinantes de reacción cruzada. Por tanto, no tenemos ninguna fracción con un reconocimiento específico por sueros con esta parasitosis.

### 3.1.3 Análisis de *Western-blot* frente a antígenos totales de *Trypanosoma cruzi*.

Aunque el propósito de esta Tesis era identificar proteínas antigénicas de *L. braziliensis* útiles para su diagnóstico, también se realizó el análisis de *Western-blot* de los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea frente a las proteínas totales de *T. cruzi*. Se pretendía determinar la reacción cruzada existente y si había algún antígeno característico de *T. cruzi*. La seroreactividad de los antígenos de *T. cruzi* se analizó siguiendo la misma estrategia que con los antígenos de *L. braziliensis*. Tras la electroforesis del extracto proteico total de *T. cruzi* el gel se transfirió a membrana. Las tiras se incubaron con los mismos sueros de pacientes con LC y con la enfermedad de Chagas, diluidos también 1/1.500. El resultado de este *Western-blot* se muestra en la Figura 3.

La reacción cruzada de los sueros LK hacia el extracto proteico de *T. cruzi* fue mucho menor que la observada con los sueros chagásicos frente a proteínas de *L. braziliensis* (Fig. 2), y además el patrón de reactividad fue muy similar para los 4 sueros LK. Tras densitometrar las tiras se elaboró el patrón de fracciones antigénicas correspondientes a *T. cruzi*. En la Tabla 3 se indican las fracciones que dieron reacción cruzada con los sueros de pacientes con LC y las que reaccionaron con los sueros chagásicos. El patrón de seroreactividad reveló que las fracciones 2, 3, 13 y 17 mostraron reacción cruzada, donde parece que la fracción 2 (pTc15) fue solamente reconocida por los sueros con LC. La fracción antigénica de 30 kDa de *T. cruzi* (pTc30), también numerada como fracción 7, fue reconocida por los sueros chagásicos, al igual que reconocieron la fracción 7 de *L. braziliensis*, del mismo peso molecular (pLb30). Este reacción cruzada podría deberse a una posible homología entre los epitopos de ambas fracciones, teniendo los sueros chagásicos mayor afinidad por la fracción de *L. braziliensis* que por la de *T. cruzi*.

Las fracciones 15, 16 y 17, que también fueron reconocidas por los sueros chagásicos, no se incluyeron en el patrón de antigenicidad ya que el reconocimiento fue distinto según cada suero.



**Fig. 3.** *Western-blot* frente a proteínas totales de *T. cruzi*. A la izquierda se indican los pesos moleculares y a la derecha se indica el n° de fracción junto con su peso molecular.

N° Fracción/ PM (kDa)	2 (16)	3 (17)	6 (26)	7 (30)	11 (40)	13 (50)	18 (99)	19 (>100)	20 (>100)
Sueros LC	+	+				+	+		
Sueros Chagásicos		+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabla 3.** Fracciones antigénicas de *T. cruzi* reconocidas por los sueros con LC y con Chagas.

### 3.1.4 Análisis de *immunoblot* con los sueros preabsorbidos frente a antígenos totales de *L. braziliensis*.

En el análisis de *Western-blot* frente a proteínas totales de *L. braziliensis* no se pudo obtener un patrón de antigenicidad específico del parásito, sino que sólo mostraron una clara hibridación aquellas fracciones más representativas del extracto proteico en cuanto a abundancia, que fueron reconocidas también por los sueros chagásicos. Para intentar mejorar el resultado se procedió a preabsorber previamente cada suero de

leishmaniasis con el extracto total de proteínas de *T. cruzi* (apartado 2.21 de Materiales y Métodos) antes de enfrentarlos a las proteínas de *L. braziliensis*. En la preabsorción, los anticuerpos presentes en los sueros con LC se incuban con todas las proteínas de *T. cruzi*, accediendo, por tanto, a todos los epitopos que el parásito posee. Tras centrifugar la mezcla de preabsorción se recoge el sobrenadante, que es el suero “limpio”, mientras que se desecha el residuo donde quedan los precipitados antígeno-anticuerpo.

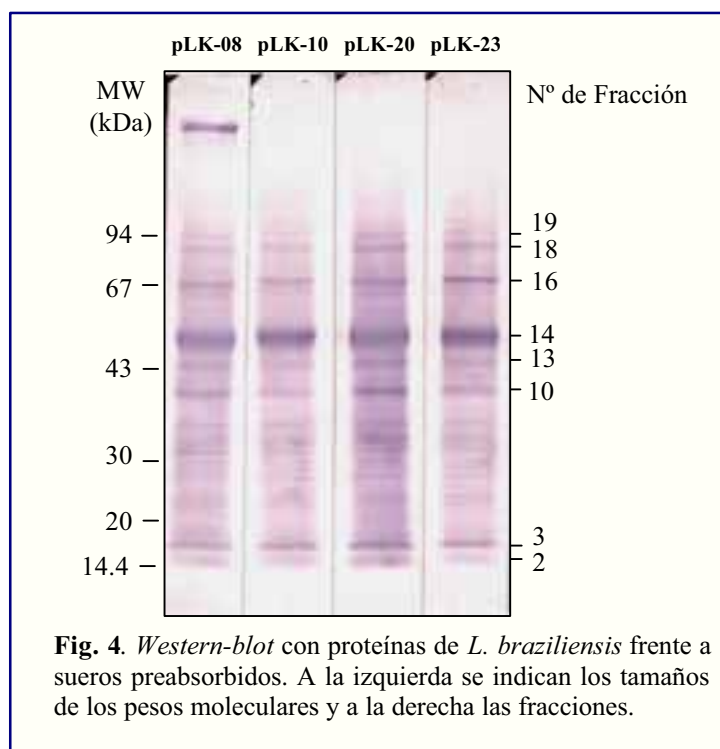
Se realizó un SDS-PAGE en las mismas condiciones de reticulación y se cargaron 8 µg/pocillo de extracto proteico total de *L. braziliensis*. Tras la transferencia a membrana, las tiras fueron incubadas con los sueros LK previamente preabsorbidos con 40 µg de un extracto de proteínas de *T. cruzi*. Todos los sueros se siguieron empleando a la dilución 1/1.500.

Con el tratamiento de preabsorción de los sueros el patrón inmunológico se volvió homogéneo, es decir, se unificaron y definieron las bandas de hibridación. Todos los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea reconocieron los mismos antígenos de *L. braziliensis*, como puede observarse en la Figura 4. Todas las bandas antigénicas aparecieron mucho más definidas. Las fracciones 16, 18 y 19, que con los sueros sin preabsorber mostraron una hibridación que no fue significativa y por ello no se tuvieron en cuenta (Fig. 2), se detectaron aquí de una forma mucho más prominente. La fracción 10, de 40 kDa, que no había mostrado hibridación, aparece claramente. No obstante, las fracciones 2, 3, 13 y 14 siguieron manteniendo el reconocimiento a pesar de ser antígenos de reacción cruzada. Puede que determinados epítomos sean específicos de estas proteínas o que hubiesen más anticuerpos frente a estos antígenos de los que se llegaron a preabsorber.

Tras este experimento, se concluyó que las fracciones 10, 16, 18 y 19 de *L. braziliensis* podrían ser los antígenos específicos que se buscaban como primer objetivo de este trabajo, aunque la fracción 10 sólo fuese reconocida por los sueros preabsorbidos. Estas fracciones se denominaron pLb40, pLb70, pLb87 y pLb99, respectivamente.

Curiosamente, los sueros con LC también reconocen una fracción de 99 kDa de *T. cruzi* (Fig. 3), mientras que los sueros chagásicos no reconocen la fracción pLb99 (Fig. 2).





### 3.1.5 Seroreactividad de antígenos de *L. braziliensis* y de *T. cruzi* frente a más sueros.

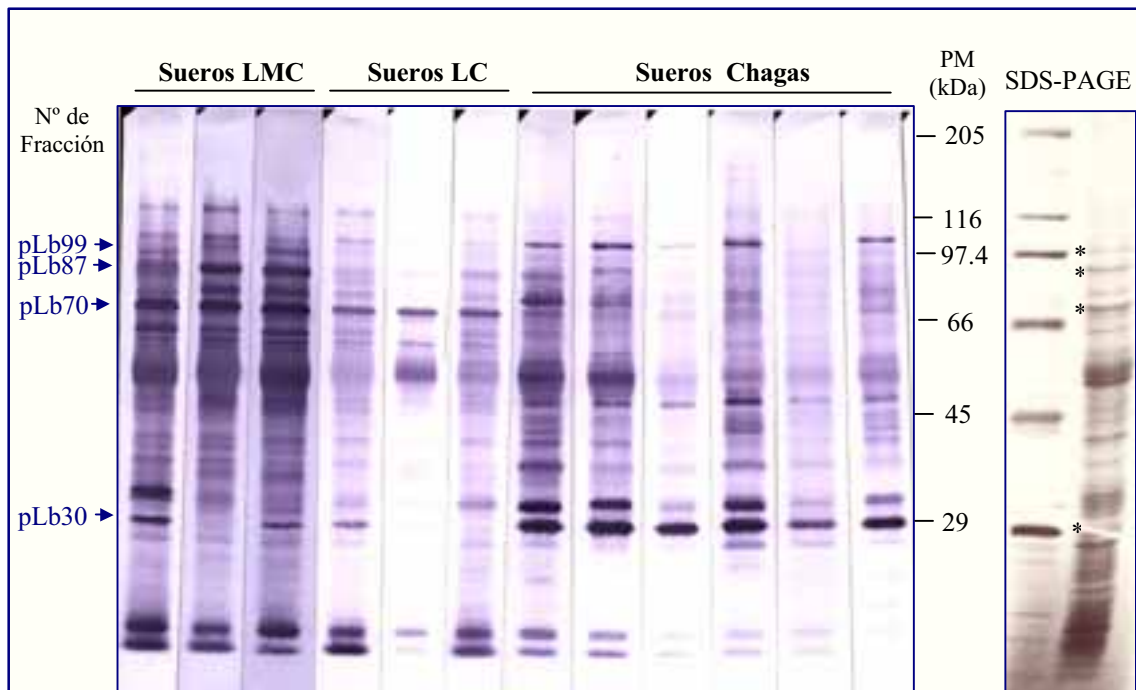
En el momento en el que se realizaron estos experimentos de análisis de seroreactividad tan sólo se disponía en el laboratorio de unos pocos sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica. Más adelante se fueron recibiendo más sueros de ambas enfermedades, así como de pacientes con leishmaniasis mucocutánea (LMC). Con el fin de verificar si los resultados obtenidos eran válidos se repitieron los *Western-blot* frente a proteínas totales de *L. braziliensis* y de *T. cruzi*.

Se realizaron dos SDS-PAGE en gradiente del 7 al 15% de reticulación, uno con cada extracto proteico total de *L. braziliensis* y de *T. cruzi*, empleando esta vez el sistema Hoefler para obtener una mayor resolución de las bandas proteicas. Se cargó aproximadamente 5 µg/pocillo de cada extracto total y tras las electroforesis los geles se transfirieron a membranas PVDF (difluoruro de polivinilideno). Las membranas se cortaron en tiras y cada una de ellas se incubó con el suero diluido 1/1.500. Se emplearon 3 sueros de pacientes con leishmaniasis mucocutánea (LR-536, LR-538, LR-628), 3 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (LR-537, LR-591, LR-594), 6 sueros de pacientes

con la enfermedad de Chagas (Try1, Try4, Try7, Try8, Try10, C+Try) y un suero de una persona sana procedente de Perú (B-01), que se tomaría como control negativo. Las condiciones de bloqueo e incubación con los sueros y con el 2º anticuerpo fueron las mismas que en los *Western-blot* anteriores realizados en membrana de nitrocelulosa. Los resultados de estos *Western-blot* no se densitometraron ya que no se pretendía comparar todo el patrón de seroreactividad, sino sólo determinar si aquellas fracciones de las que se obtuvo alguna conclusión seguían estando presentes.

#### a) *Western-blot* con proteínas totales de *L. braziliensis*.

El *Western-blot* frente a proteínas totales de *L. braziliensis* se muestra en la Fig. 5. El reconocimiento de las fracciones de *L. braziliensis* pLb70 y pLb87 se siguió manteniendo: pLb70 tuvo una hibridación muy fuerte con todos los sueros de LMC y LC, y el reconocimiento de la fracción pLb87 fue mucho más intenso por los sueros de LMC que por los sueros de LC, aunque uno de ellos apenas mostró reconocimiento. Sin embargo, pLb99 sólo fue reconocida por dos de los sueros con LMC, y con dos de los sueros con LC la señal fue muy débil. A pesar de ello, se decidió proseguir con esta fracción.



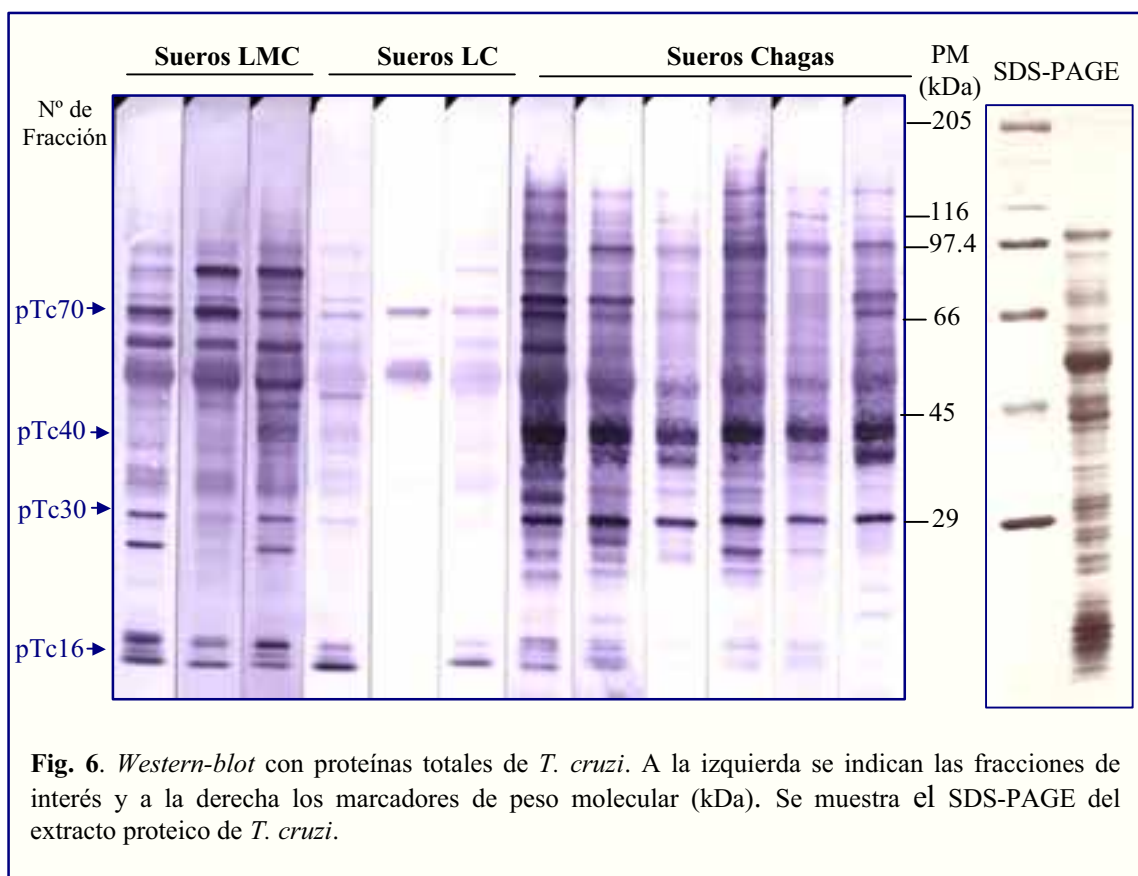
**Fig.5.** *Western-blot* con proteínas totales de *Leishmania braziliensis*. A la izquierda se indican las fracciones de interés y a la derecha los marcadores de peso molecular (kDa). Se muestra el SDS-PAGE del extracto proteico de *L. braziliensis*, donde las fracciones están señaladas con \*.

La fracción pLb40 siguió sin mostrar hibridación con los sueros sin preabsorber, por lo que se decidió, en principio, no seleccionar esta fracción.

Por otro lado, indicar como curiosidad que la fracción 7 (30 kDa), que sólo había hibridado con el suero LK-10, mostró reacción con 3 de los 6 sueros de leishmaniasis empleados aquí, y siguió mostrando una fuerte reacción con los 6 sueros chagásicos.

**b) Western-blot con proteínas totales de *T. cruzi*.**

Por otra parte, se realizó el *Western-blot* con las proteínas totales de *T. cruzi*, que se muestra en la Figura 6:



La fracción pTc16, que en principio fue sólo reconocida por todos los sueros de pacientes con LC, también tuvo reconocimiento por los sueros chagásicos, aunque con una intensidad menor. También se observa una fracción de aproximadamente 70 kDa de *T. cruzi* (pTc70) que fue reconocida, y de forma relevante, por todos los sueros con LMC y LC. Este reconocimiento no se produjo en el experimento equivalente del apartado 3.1.3, donde se utilizaron otros sueros. Este antígeno tiene el mismo peso molecular que pLb70 y

podrían ser proteínas homólogas. Hay que hacer notar que pLb70 no tuvo reacción cruzada con los sueros chagásicos, mientras que pTc70 sí muestra reacción cruzada con los sueros de pacientes con LC y LMC. Por otro lado, la fracción pTc40, específica de *T. cruzi*, también fue intensamente reconocida por todos los sueros chagásicos, y por último, la fracción pTc30 fue reconocida por los mismos sueros que reconocieron la fracción del mismo peso molecular de *L. braziliensis*.

En las condiciones que se han utilizado, el suero B-01, perteneciente a una persona sana de Perú, no mostró hibridación ni con las proteínas de *L. braziliensis* ni con las de *T. cruzi*, quedando las tiras de membrana completamente en blanco. Como era de esperar, las proteínas de ambos parásitos sólo fueron reconocidas por las personas con estas parasitosis.

Como se ha comentado anteriormente, el diagnóstico definitivo de la leishmaniasis recae en las manifestaciones clínicas de la enfermedad junto con la detección del parásito en biopsias y en cultivos. No obstante, a menudo no puede confirmarse el diagnóstico por no poder identificar el parásito. En los últimos años se han desarrollado muchos trabajos referentes a la caracterización de los componentes antigénicos de *Leishmania* con el fin de identificar aquellos componentes específicos para un diagnóstico inmunológico. Sin embargo, la mayoría de los trabajos sobre el empleo del *immunoblot* se han llevado a cabo sobre la leishmaniasis visceral (Reed y col., 1987, Rolland-Burger y col., 1991, Cardeñosa y col., 1995) ya que cursa con altos niveles de anticuerpos anti-*Leishmania* debido a una marcada respuesta celular Th2. El diagnóstico inmunológico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea se ve dificultado por el hecho de que durante la leishmaniasis cutánea la producción de anticuerpos contra el parásito no es muy importante (Pedrosa y col., 1999), y se caracteriza por un balance entre las respuestas Th1 y Th2, resultando más leve cuanto más se inclina a una respuesta Th1 (Kharazmi y col., 1999). Por su parte, la leishmaniasis mucocutánea, que es una secuela de la LC por metástasis de los parásitos hacia las mucosas, presenta unas características intermedias entre la LC y la LV, como es un título de anticuerpos superior a los de LC, debido a su carácter fuertemente inflamatorio (Herwaldt, 1999) y una respuesta celular muy importante (Carvalho y col., 1985). El hecho de que en los *Western-blot* la respuesta inmune humoral de los sueros con LC fuese mucho menor que la de los sueros con LMC, es debido a que la respuesta inmunológica que se produce frente a cada tipo de enfermedad es distinta.

A pesar de esta dificultad, son varios los trabajos que han demostrado la utilidad del diagnóstico inmunológico de la leishmaniasis cutánea. Así, Chiller y col. (1990) identificaron distintos patrones antigénicos para la parasitación por *L. braziliensis panamensis*, por *T. cruzi*, y con doble infección. Obtuvieron que los sueros chagásicos reconocían bandas de 25, 38 y >97 kDa de lisados de *T. cruzi* y una banda de 38 kDa del lisado de *Leishmania*, mientras que los sueros con leishmaniasis sólo reconocían una banda de 66 kDa de *L. braziliensis* y ninguna a considerar de *T. cruzi*. Brito y col. (2000) han identificado dos antígenos solubles, de 27 y 30 kDa, de *L. braziliensis* que consideran relevantes para el diagnóstico. En ambos casos, los resultados no son comparables a los obtenidos en este trabajo ya que los antígenos se obtuvieron de distinta forma.

En nuestro estudio, el primer objetivo nos llevó a la determinación de que las fracciones de *L. braziliensis* 16 y 18, que fueron denominadas **pLb70** y **pLb87**, respectivamente, eran candidatas a ser estudiadas para analizar su posible validez en el diagnóstico específico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea. La fracción 19, o **pLb99**, aunque no mostró un reconocimiento tan acusado, también se seleccionó para ser posteriormente purificada y testada frente a más sueros de LC, LMC y de Chagas.

De forma paralela al desarrollo del primer objetivo, se obtuvieron una serie de resultados atendiendo al patrón de seroreactividad de los sueros chagásicos. Se determinó que el reconocimiento de la fracción 11 de *T. cruzi*, pTc40, se realizó únicamente por parte de todos los sueros chagásicos y con una intensidad muy alta, y que la fracción 7, tanto de *L. braziliensis*, pLb30, como de *T. cruzi*, pTc30, mostró reacción cruzada, siendo la establecida por los sueros chagásicos con la proteína de *L. braziliensis* de una magnitud mucho más elevada.

## **3.2 Purificación de las proteínas de *Leishmania braziliensis* pLb70, pLb87 y pLb99. Obtención de anticuerpos policlonales.**

En el capítulo anterior se determinó que las proteínas de *L. braziliensis* pLb70, pLb87 y pLb99 eran las candidatas a ser estudiadas para determinar su posible validez en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea. El siguiente objetivo fue la purificación e identificación de las mismas, para lo que se elaboraron anticuerpos policlonales frente a ellas y además se procedió a su microsecuenciación.

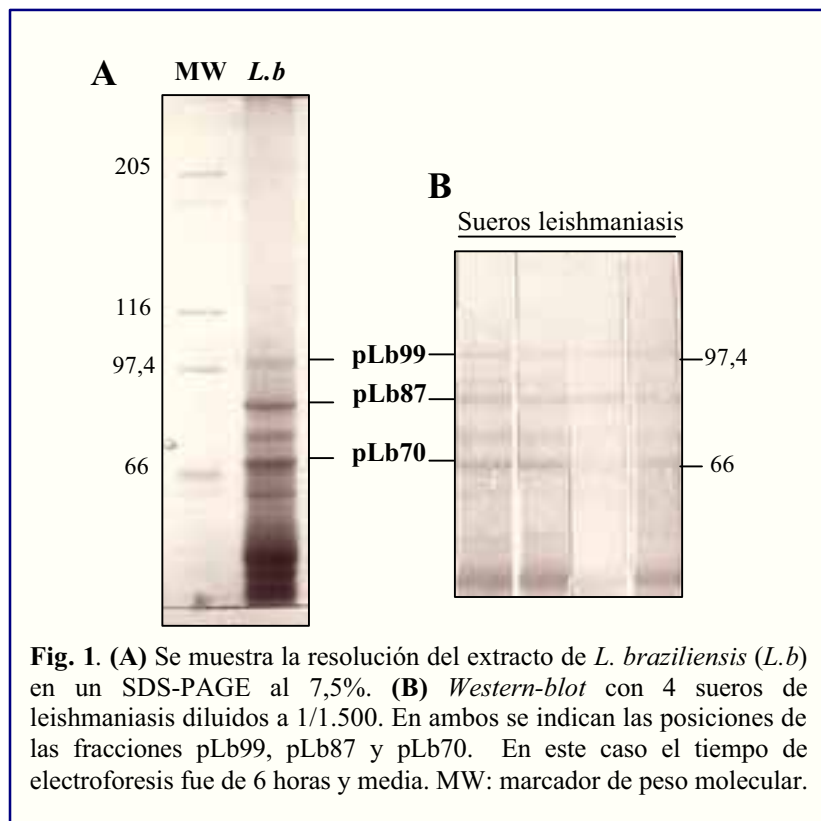
### **3.2.1 Aislamiento y purificación de pLb70, pLb87 y pLb99.**

Ya que las proteínas antigénicas pLb70, pLb87 y pLb99 fueron identificadas en condiciones desnaturalizantes, su purificación se realizó también en estas condiciones, mediante electroelución desde geles de SDS-poliacrilamida. Para ello se optimizaron las condiciones del SDS-PAGE, tanto el porcentaje de reticulación del gel como el tiempo de electroforesis, con el fin de determinar con cuáles se obtenía una mejor resolución. Paralelamente se realizaron *Western-blot*s para la identificación de las proteínas en el gel.

El sistema utilizado fue el de Hoefer. Dado el peso molecular de las tres proteínas, el extracto proteico total de *L. braziliensis* fue sometido a electroforesis utilizando geles con reticulaciones que oscilaron desde un 7 hasta un 9%, tanto en continuo como en gradiente. Como las proteínas que se querían purificar habían sido identificadas en un gel en gradiente del 7 al 15%, al variar la reticulación cambió el patrón proteico observado. Fracciones proteicas de alto peso molecular que no se resolvían bien, lo hacen al utilizar porcentajes tan bajos de acrilamida/bisacrilamida, por eso, con cada ensayo de reticulación se tuvo que determinar a qué fracciones proteicas del gel correspondían las proteínas de interés. De este modo, una parte del gel se transfería a membrana y se hibridaba con sueros de pacientes con leishmaniasis, mientras que otra parte del gel se teñía con azul de Coomassie. Las condiciones de hibridación fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos de identificación de las proteínas antigénicas (Capítulo 3.1 de Resultados y Discusión).

Tras analizar diferentes condiciones, se determinó que la mejor resolución se obtenía con un SDS-PAGE al 7,5% de reticulación y con un tiempo de electroforesis de un frente y medio, o 7 horas, a amperaje constante de 20 mA, con un grosor de gel de 1,5 mm.

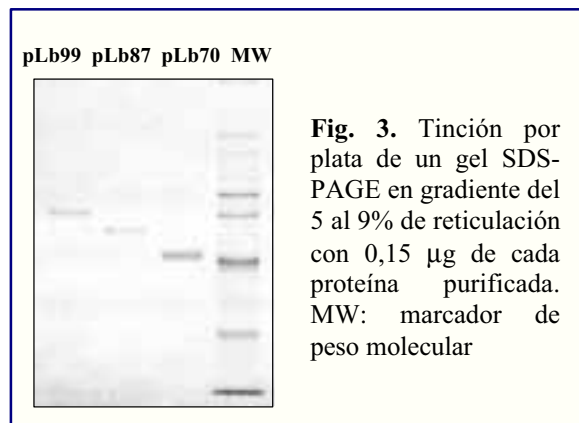
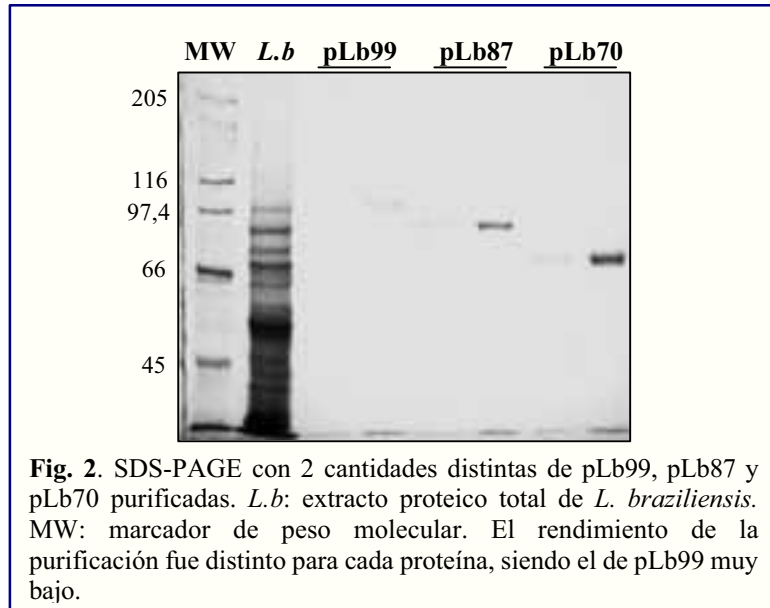
Como las tres proteínas tenían pesos moleculares próximos, se pudieron purificar desde un mismo gel (Fig. 1).



**Fig. 1.** (A) Se muestra la resolución del extracto de *L. braziliensis* (L.b) en un SDS-PAGE al 7,5%. (B) *Western-blot* con 4 sueros de leishmaniasis diluidos a 1/1.500. En ambos se indican las posiciones de las fracciones pLb99, pLb87 y pLb70. En este caso el tiempo de electroforesis fue de 6 horas y media. MW: marcador de peso molecular.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de separación, la purificación se realizó mediante electroelución, utilizando el sistema de Bio-Rad, como se relata en los apartados 2.18 y 2.23 de Materiales y Métodos. A continuación, las proteínas electroeluidas fueron dializadas frente a tampón PBS, pH 7,2, con inhibidor de proteasas PMSF 1 mM. Se tomó una alícuota de cada una y se visualizaron en un gel también al 7,5% de reticulación (Fig. 2). Tanto el agua bidestilada como el material de vidrio utilizado en el proceso de purificación se esterilizaron previamente para evitar la degradación de las proteínas.

Para determinar el grado de pureza de las proteínas purificadas se realizó la tinción por plata con el *kit Quick Silver®* (Amersham). Como se observa en la Figura 3, las fracciones proteicas fueron detectadas como una única banda, no hubo co-purificación de otras proteínas.



### 3.2.2 Reactividad de sueros con LC, LMC y Chagas frente a las proteínas purificadas pLb70, pLb87 y pLb99.

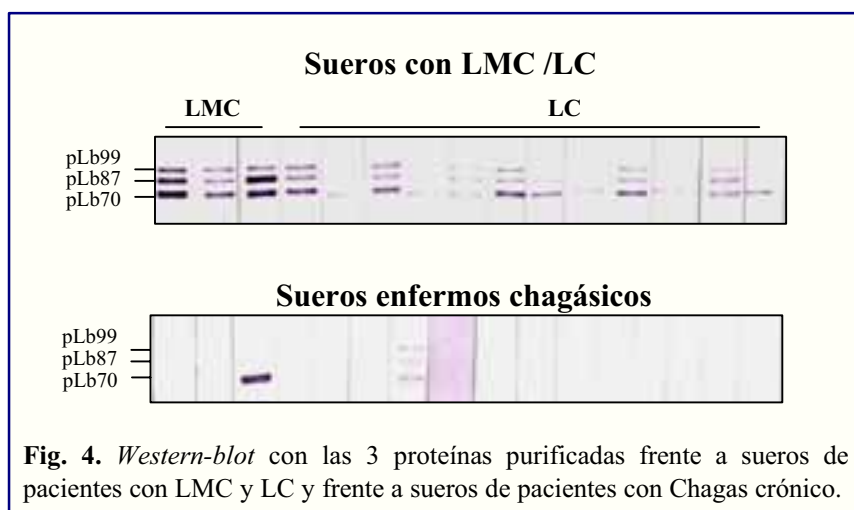
Una vez se purificaron las tres proteínas, se decidió testarlas mediante *Western-blot* frente a más sueros: 12 de pacientes con leishmaniasis cutánea y 3 con mucocutánea; 16 con la enfermedad de Chagas; y como controles negativos, 10 de personas sanas procedentes de la misma zona geográfica que los enfermos de leishmaniasis y 5 de personas sanas procedentes de Santa Cruz de Tenerife. Con este experimento pretendíamos comprobar si las conclusiones obtenidas en la primera parte del trabajo eran válidas.

En esta ocasión, las muestras proteicas que se sometieron a electroforesis contenían 0,1 µg por pocillo de cada proteína purificada y se cargaron en un gel en gradiente del 5 al



10% (Mini-Protean, Bio-Rad). El gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa y cada tira con el antígeno triple se incubó con el suero diluido 1/1.500.

El resultado del *immunoblot* se muestra en la Figura 4 y los porcentajes de reconocimiento se muestran en la Tabla 1:



Proteína	Seros LC/LMC	Seros chagásicos	Seros control -
<b>pLb70</b>	100% (15/15) 100% LMC (3/3) 100% LC (12/12)	12,5% (2/16)	0% (0/15)
<b>pLb87</b>	66,6% (10/15) 100% LMC (3/3) 58,3% LC (7/12)	6,25% (1/16)	0% (0/15)
<b>pLb99</b>	60% (9/15) 100% LMC (3/3) 50% LC (6/12)	6,25% (1/16)	0% (0/15)

**Tabla 1.** Porcentajes de reconocimiento de los sueros con LC/LMC, sueros chagásicos y sueros control frente a pLb70, pLb87 y pLb99.

Las tres proteínas mostraron un porcentaje elevado de reconocimiento por los sueros con leishmaniasis, donde pLb70 fue reconocida en un 100%, pLb87 por un 66,6% y pLb99 por un 60%. Las tres fueron reconocidas por los tres sueros con LMC, sin embargo el reconocimiento por los sueros con LC disminuyó a un 58,3% y un 50% para pLb87 y pLb99, respectivamente. Al igual que pudo observarse en el *Western-blot* de la Fig. 5 del Capítulo 3.1 de Resultados y Discusión, pLb99 fue la fracción menos antigénica de las

tres. Hubo reacción cruzada en los tres casos, pero sólo por parte de un suero, en el caso de pLb87 y de pLb99, y por 2 sueros en el caso de pLb70. Ninguno de los antígenos fue reconocido por los 15 sueros de personas sanas.

Como se ha comentado con anterioridad, la respuesta humoral de la leishmaniasis mucocutánea y sobre todo cutánea, es baja. En nuestro laboratorio se han realizado estudios de antigenicidad con varias proteínas de *L. braziliensis*, entre ellas las proteínas ribosomales L14 y L6, la KMP-11 (Carmelo y col., 2001) y la histona H1. Excepto esta última que fue reconocida por un 66,6% de los sueros con LC y LMC, las demás no son buenas inmunógenas durante la leishmaniasis cutánea y mucocutánea causadas por este parásito. Por el contrario, se ha descrito una buena respuesta humoral frente a las proteínas ribosomales P0, P1 y P2 de *L. infantum* en sueros de perros con LV (Soto y col., 1995<sup>a,b</sup>, 1996) y frente a la KMP-11 durante la LV, LC, LMC y la enfermedad de Chagas (Trujillo y col., 1999, Thomas y col., 2001). Por ello están siendo estudiadas para su empleo en el diagnóstico.

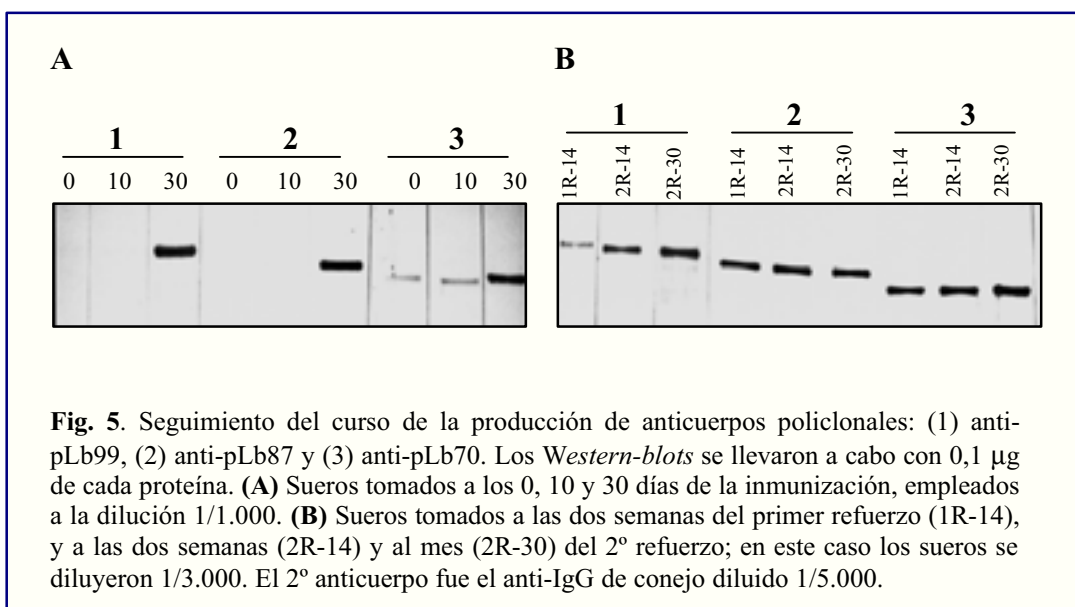
Por este motivo estos resultados fueron alentadores ya que, aunque hubo algo de reacción cruzada, el hecho de haber sido ésta tan baja y que el reconocimiento por los enfermos de LMC y LC haya sido tan elevado, justificó que pLb70, pLb87 y pLb99 fuesen candidatas para ser estudiadas como herramienta en el serodiagnóstico específico de la leishmaniasis causada por la parasitación con *L. braziliensis*. Dada la existencia de algo de reacción cruzada, será necesario analizar la respuesta antigénica frente a más sueros así como realizar un mapeo antigénico para localizar los determinantes antigénicos que muestren sensibilidad y especificidad.

### **3.2.3 Obtención de anticuerpos anti-pLb70, anti-pLb87 y anti-pLb99.**

Con objeto de identificar las proteínas y de aislar los genes que codifican para pLb70, pLb87 y pLb99, se procedió a obtener anticuerpos policlonales para ser utilizados en el *screening* de una genoteca de cDNA de promastigote de *L. braziliensis*, fabricada en nuestro laboratorio (Aragón, Tesis Doctoral, 1999).

Para purificar las proteínas en gran cantidad, se tuvieron que realizar cultivos en masa de *L. braziliensis*. Las proteínas fueron electroeluidas a partir de geles SDS-PAGE de 3 mm de grosor (Hofer), donde se cargaron 150 µl de extracto proteico total por pocillo, y dializadas frente a tampón PBS. Una vez se tuvo suficiente proteína purificada, las inmunizaciones de conejos *New-Zealand* se llevaron a cabo según lo descrito en el

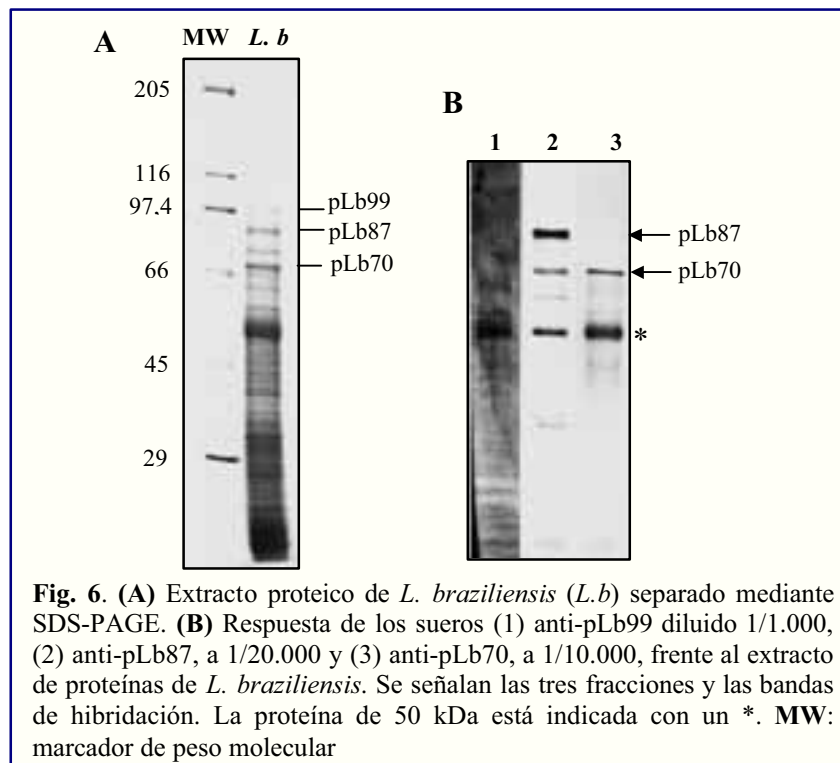
apartado 2.25 de Materiales y Métodos. La dosis de inmunización fue de 500 µg de pLb70, 350 µg de pLb87 y 150 µg de pLb99, y las dos dosis de refuerzo fueron de 280 µg de pLb70, 200 µg de pLb87 y 75 µg de pLb99, cada una. El rendimiento de la proteína pLb99 siempre fue menor, por eso la dosis de inmunización fue tan baja. Al mes se suministró la primera dosis de refuerzo y a las dos semanas de ésta, la segunda. El curso de la inmunización se monitorizó extrayendo periódicamente muestras de sangre a los conejos. Los sueros obtenidos se iban testando por *Western-blot* para visualizar la presencia de anticuerpos frente a cada proteína purificada, como se muestra en la Figura 5. El desangrado total se realizó al mes de la 2ª dosis de refuerzo, cuando los niveles de anticuerpo ya no siguieron aumentando.



Como se observa en la figura, al mes de la 1ª inmunización la producción de anticuerpos fue ya bastante elevada. El suero pre-inmune que se enfrentó a la proteína pLb70 presentaba anticuerpos frente a esta, con un título bajo.

Para determinar el título de anticuerpos, así como su respuesta frente al extracto proteico total de *L. braziliensis*, se realizaron *Western-blot*s con varias diluciones, desde 1/500 hasta 1/20.000, de los sueros anti-pLb70, anti-pLb87 y anti-pLb99. Se realizó un gel en gradiente del 6 al 12% de reticulación y el extracto proteico de *L. braziliensis* se sometió a electroforesis y transferencia a membrana. Como se muestra en la Figura 6, el suero anti-pLb99 da una hibridación muy “sucia” y, para ser utilizado, el anticuerpo

tendría que ser previamente purificado por cromatografía de afinidad. El suero anti-pLb87 sigue siendo positivo incluso a una dilución de 1/20.000 y también mostró hibridación con pLb70. Por último, el suero anti-pLb70 tuvo un título de 1/10.000. Los tres sueros también reaccionaron, y de una manera muy intensa, con una proteína de *L. braziliensis* de aproximadamente 50 kDa, correspondiente a la fracción 14 del patrón proteico.



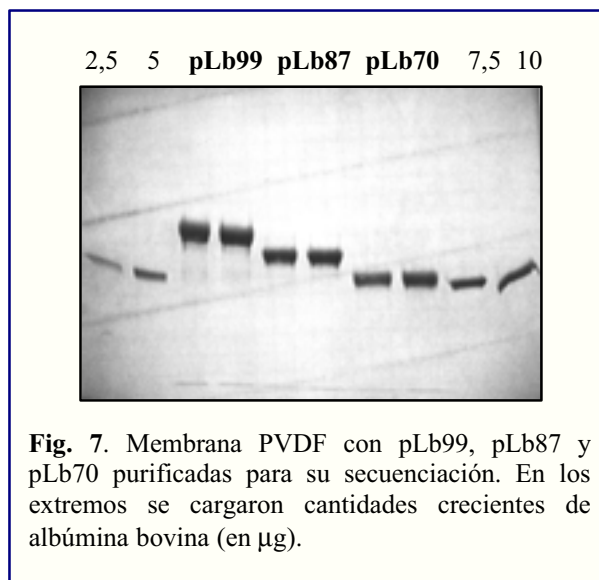
**Fig. 6. (A)** Extracto proteico de *L. braziliensis* (*L.b*) separado mediante SDS-PAGE. **(B)** Respuesta de los sueros (1) anti-pLb99 diluido 1/1.000, (2) anti-pLb87, a 1/20.000 y (3) anti-pLb70, a 1/10.000, frente al extracto de proteínas de *L. braziliensis*. Se señalan las tres fracciones y las bandas de hibridación. La proteína de 50 kDa está indicada con un \*. **MW**: marcador de peso molecular

### 3.2.4 Microsecuenciación de pLb70, pLb87 y pLb99.

Las proteínas pLb70, pLb87 y pLb99 fueron enviadas para ser secuenciadas al Laboratorio de Química de Proteínas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC) de la Universidad Autónoma de Madrid, por el Dr. Jesús Vázquez.

pLb70, pLb87 y pLb99 se purificaron en grandes cantidades en las condiciones descritas en el apartado 3.2.1. Cada una de ellas se concentró a un volumen de 300  $\mu$ l utilizando filtros concentradores (Filtron) por centrifugación a 5.000 x g, a 4°C y con PMSF 1 mM. Todo el volumen de cada proteína purificada se sometió a electroforesis en un gel al 7% de reticulación en el sistema de Hoefer, que se desarrolló a 40 mA hasta que el frente llegó al final del gel. También se cargaron diferentes cantidades de albúmina bovina (2,5; 5; 7,5 y 10  $\mu$ g). El gel se transfirió a una membrana PVDF (Millipore), pre-tratada según las condiciones del fabricante, en tampón de transferencia (Tris 25 mM, pH

8,3, glicina 192 mM) con metanol al 10% (v/v), durante toda la noche a 4°C y 25 V. Las proteínas transferidas se visualizaron en una solución de Ponceau-S. La cantidad de proteína se estimó por comparación con la albúmina bovina. La membrana se envió para la secuenciación de las proteínas (Fig. 7).



**Fig. 7.** Membrana PVDF con pLb99, pLb87 y pLb70 purificadas para su secuenciación. En los extremos se cargaron cantidades crecientes de albúmina bovina (en µg).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Las tres proteínas tienen el extremo amino-terminal bloqueado, por lo que no se pudieron secuenciar.
- Mediante secuenciación por masas de un fragmento interno, pLb70 dio la secuencia: TTPSYVAFTDSER, que corresponde al 100% con la proteína de choque térmico de 70 kDa de varias especies.
- La proteína pLb87 fue sometida a digestiones internas y los péptidos fueron analizados por MALDI-TOF. Uno de ellos dio la secuencia: FIAREFK(R,Y)R. Debido a que sólo consta de 9 aminoácidos no se pudo realizar el análisis de homología con otras proteínas en la base de datos.
- Un péptido originado tras la digestión interna de pLb99 fue secuenciado por masas dando la secuencia: (MQ,MK,CR)(IL)TDD(EG,W)NPYP(I,L)R, donde los aminoácidos entre paréntesis pueden estar situados también a la inversa. Una secuencia posible sería: MQLTDDEGNPYPLR. Dado el elevado número de combinaciones posibles, esta secuencia no fue útil para la búsqueda de homologías.

El hecho de que pLb70 corresponda a una proteína de choque térmico de 70 kDa, explica que el suero pre-inmune de conejo haya reaccionado con la proteína, así como que el suero anti-pLb87 también presente este anticuerpo. Posiblemente se deba a una reacción cruzada con la proteína homóloga de conejo, detectable con la técnica utilizada.

Para intentar evitar el bloqueo del extremo amino-terminal, en el caso de que se debiese a la manipulación de las muestras y no fuese fisiológico, éstas no se purificaron mediante electroelución. El extracto proteico total de *L. braziliensis* fue sometido a electroforesis en un gel al 7% de reticulación (Hoefler) que se dejó polimerizar durante 16 horas para disipar los componentes químicos que causan bloqueo amino-terminal. El gel se pre-corió una hora y media con tioglicolato sódico (2 mg/100ml de tampón) en el tampón del cátodo, y los tampones se renovaron antes de cargar las muestras proteicas. El tioglicolato actúa como un “capturador” de radicales libres dentro del gel, reduciendo el bloqueo amino-terminal de las proteínas. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido para determinar el tiempo de electroforesis. Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana PVDF en tampón CAPS 10 mM y metanol al 10% (v/v), durante toda la noche a 25 V y 4°C. La membrana se tiñó en Ponceau-S y las tres proteínas fueron recortadas y enviadas para su secuenciación.

Las tres proteínas siguen teniendo el extremo amino-terminal bloqueado. Dadas las precauciones tomadas y que las proteínas se enviaron en diferentes ocasiones, pensamos que se trata de un bloqueo fisiológico.

De las tres proteínas, sólo se pudo identificar por secuenciación pLb70. Análisis BLAST (Alschul y col., 1997) realizados con la secuencia obtenida revelan que tiene un 100% de homología con la familia de las proteínas de choque térmico de 70 kDa de diferentes tripanosomátidos, entre ellos *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* y *T. cruzi*, además de tener el mismo peso molecular. El alineamiento de la secuencia siempre es en la posición 37 (Tabla 2). Puesto que la proteína Hsp70 de *L. braziliensis* no estaba depositada en las bases de datos, se decidió centrar el trabajo en pLb70, y realizar tanto la caracterización del gen como el estudio de antigenicidad de la proteína.

<b>Tripanosomátido y Referencia del GeneBank</b>	<b>Secuencia y posición</b>
Q07437 <i>L. amazonensis</i> Heat shock 70 kD protein	37 TTPSYVAFTDSER
P17804 <i>L. donovani</i> Heat shock 70 kD protein	37 TTPSYVAFTDSER
P14834 <i>L. major</i> Heat shock 70 kD protein	37 TTPSYVAFTDSER
P05456 <i>T. cruzi</i> Heat shock 70 kD protein	37 TTPSYVAFTDSER
P11145 <i>T. brucei brucei</i> Heat shock 70 kD protein 4	37 TTPSYVAFTDSER
X85798 <i>L. infantum</i> Heat shock 70 kD protein (fragment)	37 TTPSYVAFTDSER
Y08020 <i>L. infantum</i> Heat shock protein 70	37 TTPSYVAFTDSER
L14605 <i>L. amazonensis</i> Heat shock protein 70	37 TTPSYVAFTDSER

**Tabla 2.** Análisis BLAST de homología de secuencia de pLb70 con varios tripanosomátidos.

### 3.3 Aislamiento y caracterización del gen *HSP70* de *Leishmania braziliensis*.

El hecho de que la proteína pLb70 correspondiera a la Hsp70 de *L. braziliensis* y que ésta no estuviera descrita, nos llevó a realizar el clonaje y la caracterización del gen que codifica para la Hsp70 de *L. braziliensis*, para proceder posteriormente a su expresión y estudio de antigenicidad.

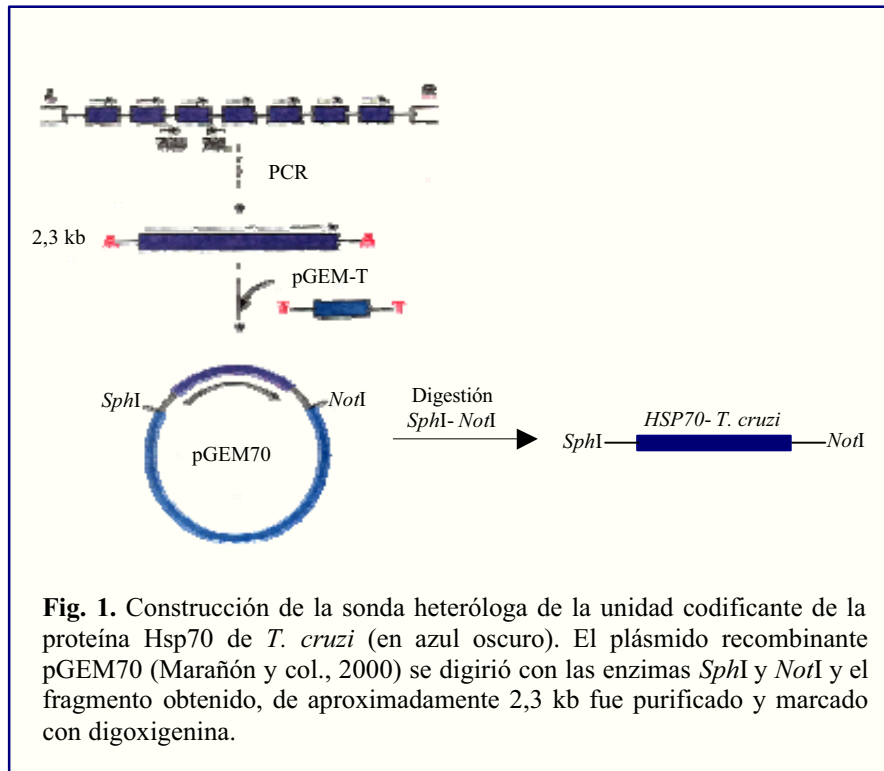
#### 3.3.1 Aislamiento y subclonaje del ADN genómico que codifica la proteína Hsp70.

Debido al carácter altamente conservado de las proteínas Hsp70, no fue necesario utilizar el suero anti-pLb70 para realizar un *screening* en la genoteca de ADNc, sino que se utilizó una sonda heteróloga con la que se realizó el *screening* en la genoteca de ADN genómico.

Dada la proximidad filogenética entre *T. cruzi* y *L. braziliensis*, se utilizó como sonda el gen *HSP70* de *T. cruzi* (Requena y col., 1988), que se obtuvo a partir de la construcción pGEM70 (Marañón y col., 2000), cedida por el Dr. Manuel Carlos López del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (C.S.I.C., Granada). El fragmento *SphI-NotI*, obtenido tras la digestión del plásmido pGEM70, fue purificado desde un gel de agarosa y marcado con digoxigenina según los protocolos correspondientes descritos en Materiales y Métodos (apartados 2.10 y 2.14.2). La sonda obtenida corresponde a la totalidad del gen *HSP70*, flanqueado por las regiones intergénicas de la unidad de repetición (Fig. 1). El *screening* se realizó en una genoteca de ADN genómico de promastigote de *L. braziliensis* digerido parcialmente con la enzima *Sau3A*, construida en el bacteriófago LambdaGem12 (Carmelo y col, 2000).

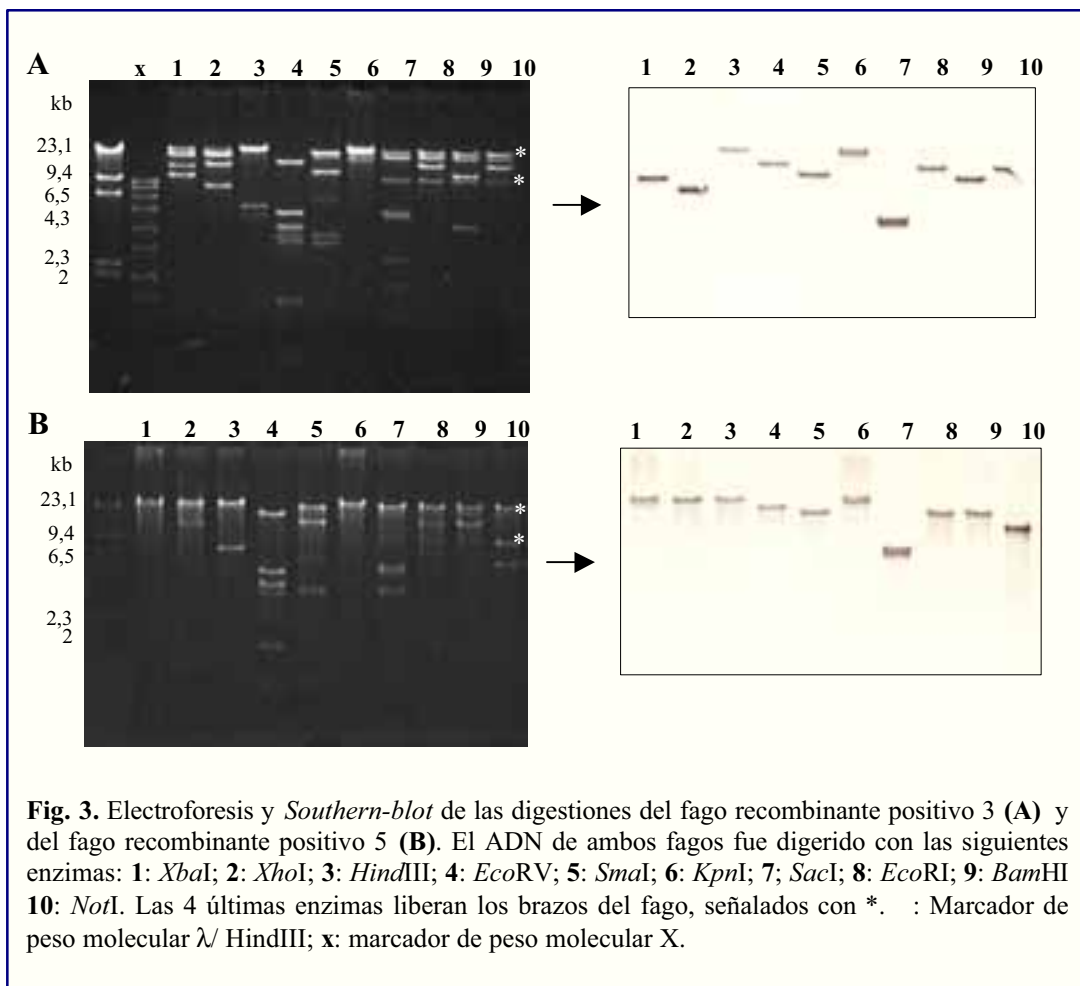
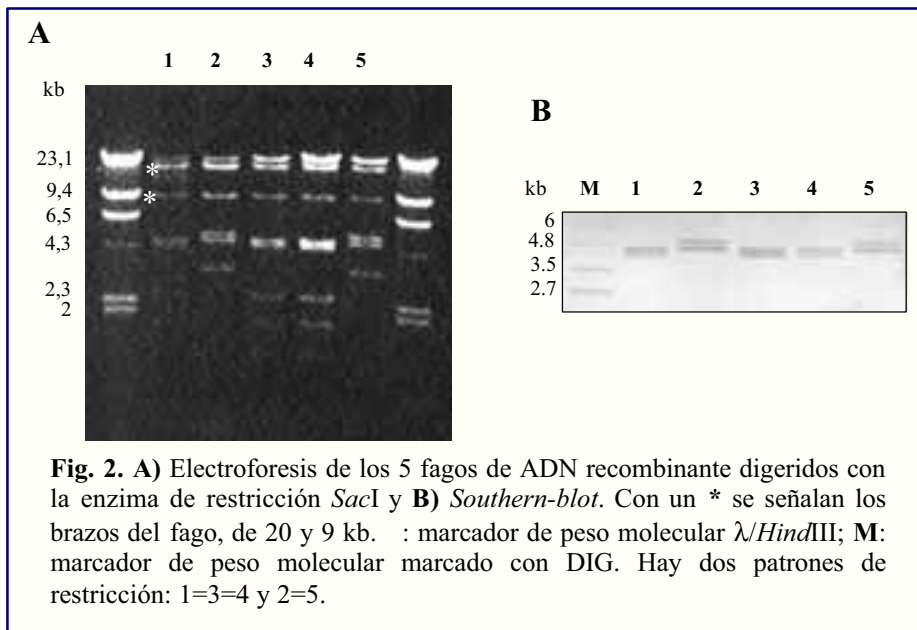
Se escrutaron  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de calvas (ufc), según el protocolo dado en el apartado 2.15 de Materiales y Métodos, utilizando la sonda a una concentración de 50 ng/ml y empleando condiciones de hibridación altamente astringentes (68°C). En un primer cribado se seleccionaron 10 positivos, de los que se descartaron la mitad después del *re-screening*. Con los 5 fagos positivos se realizó un segundo *re-screening* para verificar que se habían aislado a homogeneidad. Se purificó el ADN de los fagos seleccionados y aproximadamente 400 ng se digirieron con 15 unidades de las enzimas de restricción que cortaban en el *polylinker* del fago, liberándose los brazos del mismo, de 20 y 9 kb,

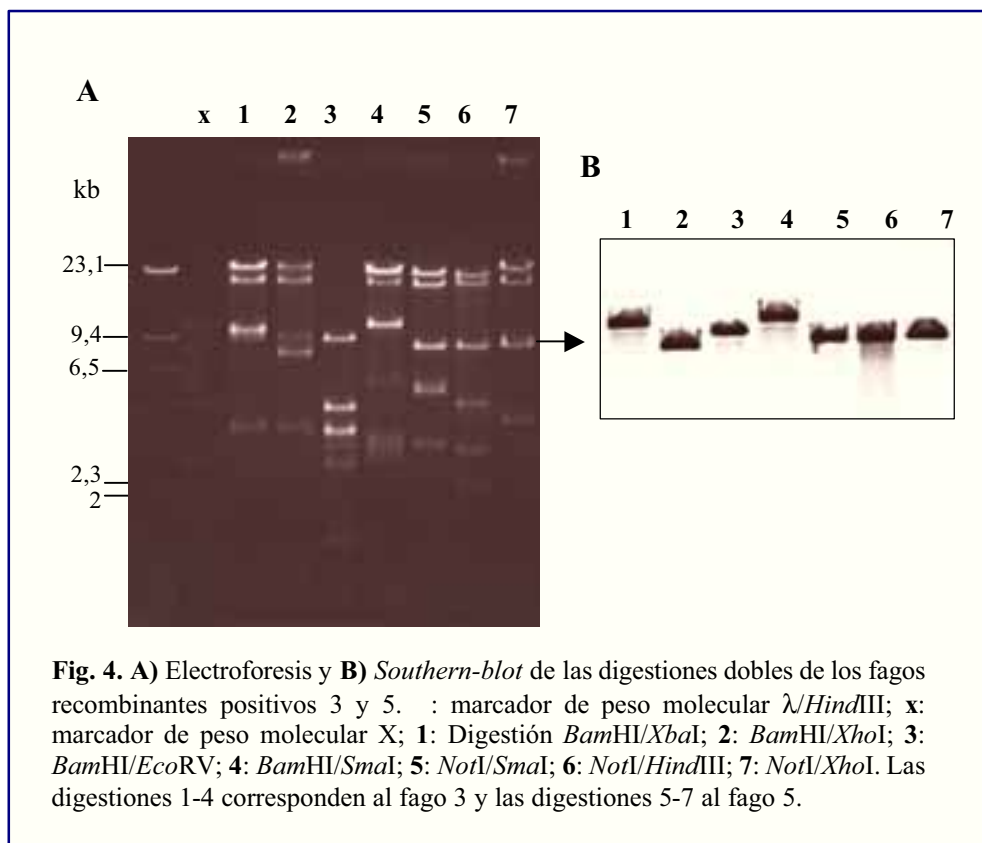




respectivamente, y el fragmento clonado en él, de aproximadamente 14 kb de longitud. Las digestiones se incubaron durante 4 horas a 37°C y los fragmentos generados se separaron en un gel de agarosa al 0,7%. Se observó que los fagos de ADN recombinante positivos eran iguales tres a dos: 1=3=4 y 2=5, puesto que presentaron el mismo patrón de restricción y de hibridación y todos contenían el gen completo. En la figura 2 se muestra la digestión de los 5 fagos recombinantes positivos con la enzima *SacI* y el *Southern-blot* (Apartado 2.14.4 de Materiales y Métodos). Se seleccionaron sólo dos fagos: el 3 y el 5, y para localizar en qué fragmento(s) se encontraba el gen, para proceder posteriormente a su subclonaje en un vector plasmídico, se realizaron digestiones con varias enzimas de restricción y *Southern-blot* (Figura 3). Las digestiones con las enzimas *SacI*, *EcoRI*, *BamHI* y *NotI* (digestiones 7-10) cortan en el *polylinker* del fago y liberan los brazos del mismo. La digestión con *SacI* da 2 fragmentos de hibridación muy próximos, de 4,6 y 4,4 kb con el fago 3, y de 5,2 y 4,6 kb con el 5. La digestión con *EcoRI* libera el inserto completo, unas 14 kb, en los dos casos. *BamHI* produce, en el fago 3, un fragmento de 10 kb que hibrida y otro de 4 que no, mientras que en el otro fago se libera el inserto completo. Con *NotI* ocurre lo contrario, en el fago 3 no hay diana en el inserto, y en el 5 se liberan dos fragmentos, uno de 8 kb que hibrida y otro de 5 que no. Las digestiones con otras enzimas (digestiones 1-6) produjeron fragmentos de hibridación de un tamaño

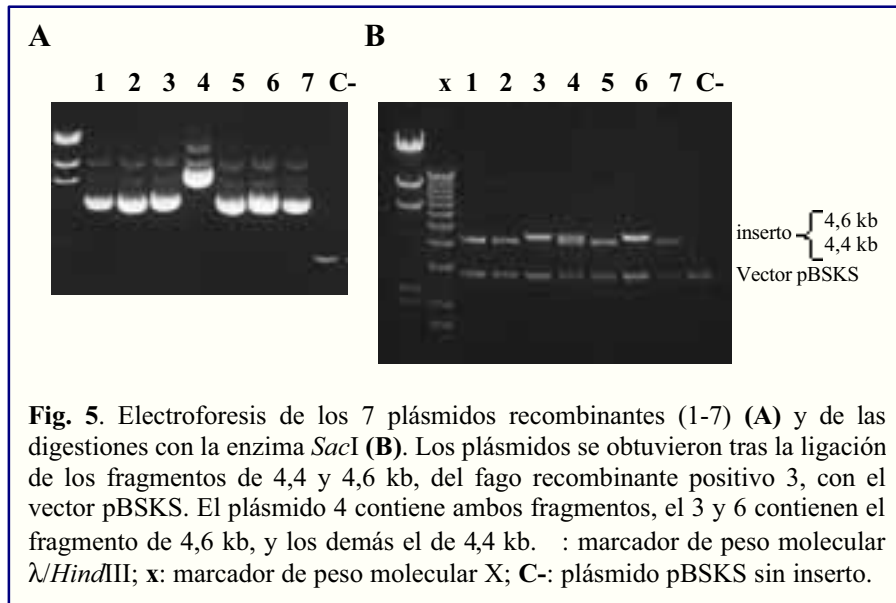
también elevado para el subclonaje. Se realizaron digestiones dobles (Fig. 4), pero todos los fragmentos de hibridación obtenidos tuvieron un tamaño que osciló entre 12 y 8 kb.



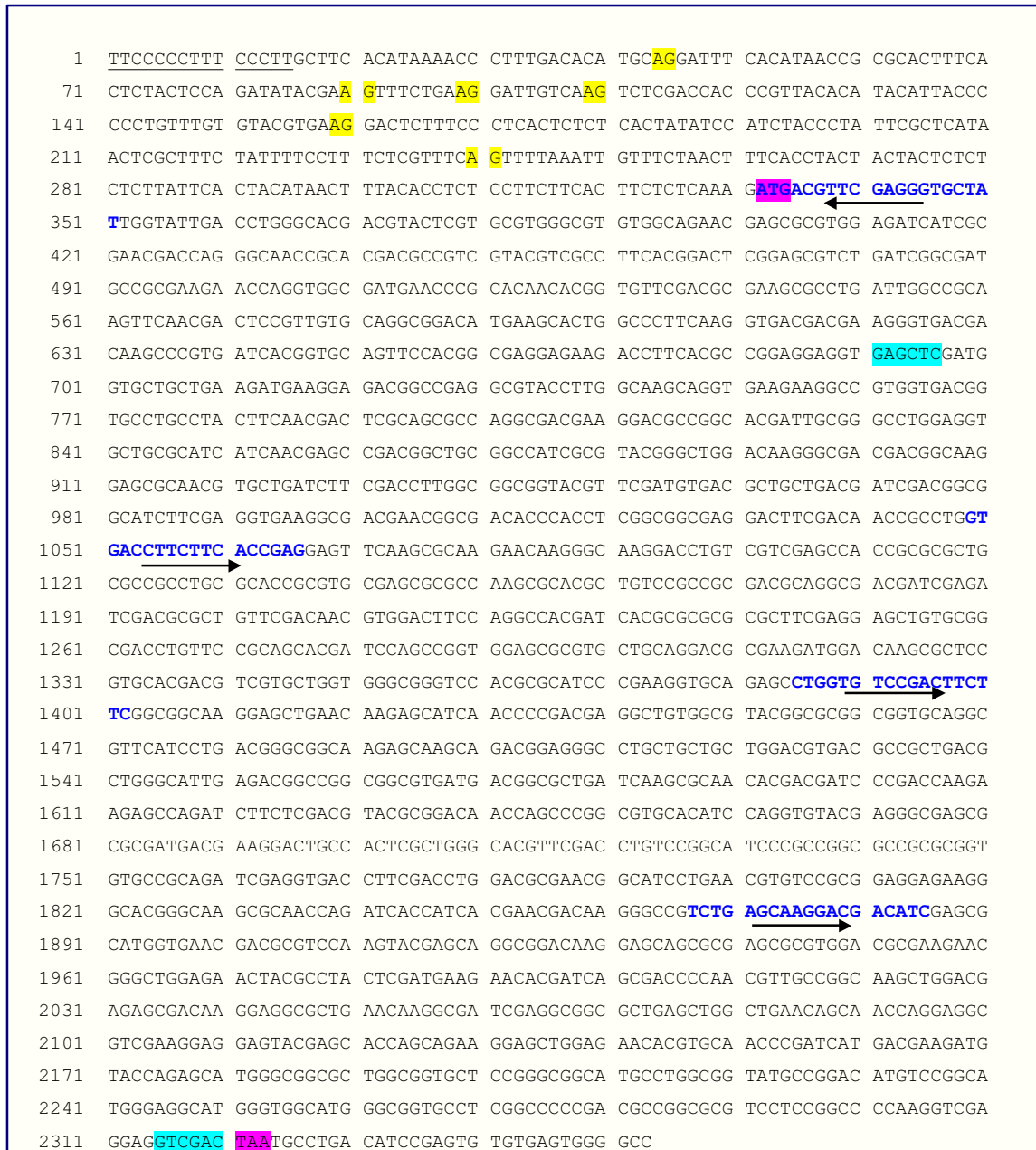


Se optó por seleccionar la digestión del fago recombinante positivo 3 con *SacI*, y se purificaron los fragmentos de 4,4 y 4,6 kb desde un gel de agarosa y en un mismo taco de gel. El subclonaje se realizó mediante ligación al vector pBSKS empleando dos relaciones molares inserto:vector [1(240 ng):1(130 ng) y 2(180 ng):1(50 ng)]. El vector había sido previamente digerido con esta enzima, desfosforilado y purificado desde un gel de agarosa. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes XL2-Blue y se obtuvieron 7 colonias. Se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con *SacI*, resultando que todas las colonias contenían el plásmido recombinante (Fig. 5).

Los 7 plásmidos recombinantes fueron secuenciados con los cebadores del vector T7 y M13-Reverse marcados con carbocianina, según como describió en Materiales y Métodos (apartado 2.12). El análisis BLAST (Altschul y col., 1997) de las secuencias obtenidas mostró el extremo de los fragmentos en que se localizó la homología con el gen *HSP70*, indicando la orientación de los subclonajes. La región 5' del gen está incluida en el fragmento de 4,6 kb, donde la diana *SacI* se sitúa a 368 pb del codon de iniciación, mientras que el fragmento de 4,4 kb contiene la región 3' del gen. Se seleccionaron dos de los clones recombinantes, uno con el fragmento de 4,6 kb que se denominó pBS/Lb-n70, y



el otro con el fragmento de 4,4 kb, denominado pBS/Lb-c70. Estos dos clones se utilizaron como molde para la secuenciación del gen en su totalidad, para lo que fue necesario diseñar cebadores internos (Materiales y Métodos, 2.12). En la Figura 6 se muestra la secuencia completa del gen *HSP70* de *L. braziliensis*, secuenciada en ambas cadenas por triplicado. Presenta 1.992 nucleótidos desde el codón de iniciación (ATG) hasta el de parada, el cual está formado por el triplete TAA. En la región 5' corriente arriba (5'UPR) se encuentran una serie de dinucleótidos AG, que podrían actuar como posibles sitios aceptores de *splicing* durante la transcripción de este gen. Del mismo modo, al principio de la secuencia de nucleótidos se observa la presencia de residuos C+T que probablemente pertenecen a una cadena de polipirimidinas (C+T), que continúa corriente arriba, y que ha sido descrita como una secuencia 5' esencial para un correcto proceso de *trans-splicing* (Curotto de Lafaille y col., 1992; Huang y Van der Ploeg, 1991). Por otro lado, la región 5' no traducida (5'UTR) consta de 226 nucleótidos, y se extiende desde el sitio aceptor de *splicing* hasta el codón de iniciación ATG. Las regiones 5'UPR y 5'UTR están altamente conservadas en los genes *HSP70* de otras especies de *Leishmania*, sin embargo, en *L. braziliensis* no se observa esta homología de secuencia. La región 3'UTR no pudo ser secuenciada por ser una región muy rica en guaninas y adeninas, con una estructura secundaria muy fuerte.

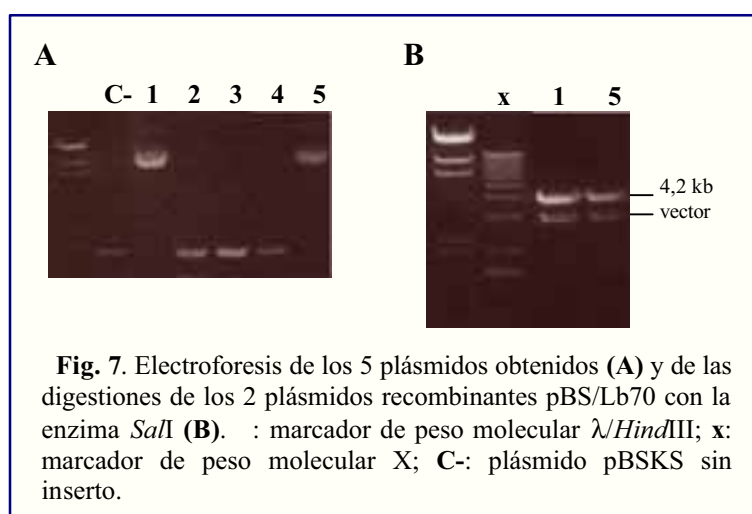


**Fig. 6** Secuencia de nucleótidos del gen *HSP70* de *Leishmania braziliensis* (AF291716). Resaltado en fucsia se señalan los codones de iniciación y terminación del gen; en amarillo, los posibles sitios aceptores de *trans-splicing*; la secuencia subrayada corresponde a la cadena de polipirimidinas. Se indican, en turquesa, las dianas de restricción *SacI* y *SalI* utilizadas en los subclonajes. También están señalados los cebadores internos empleados en la secuenciación (en azul), donde las flechas indican el sentido 5'-3' de los mismos.

El análisis BLAST (Altschul y col., 1997) de la secuencia de nucleótidos de esta ORF (pauta abierta de lectura) mostró que codifica la proteína Hsp70 de *L. braziliensis*. Esta secuencia de nucleótidos fue remitida al GeneBank donde se encuentra bajo el

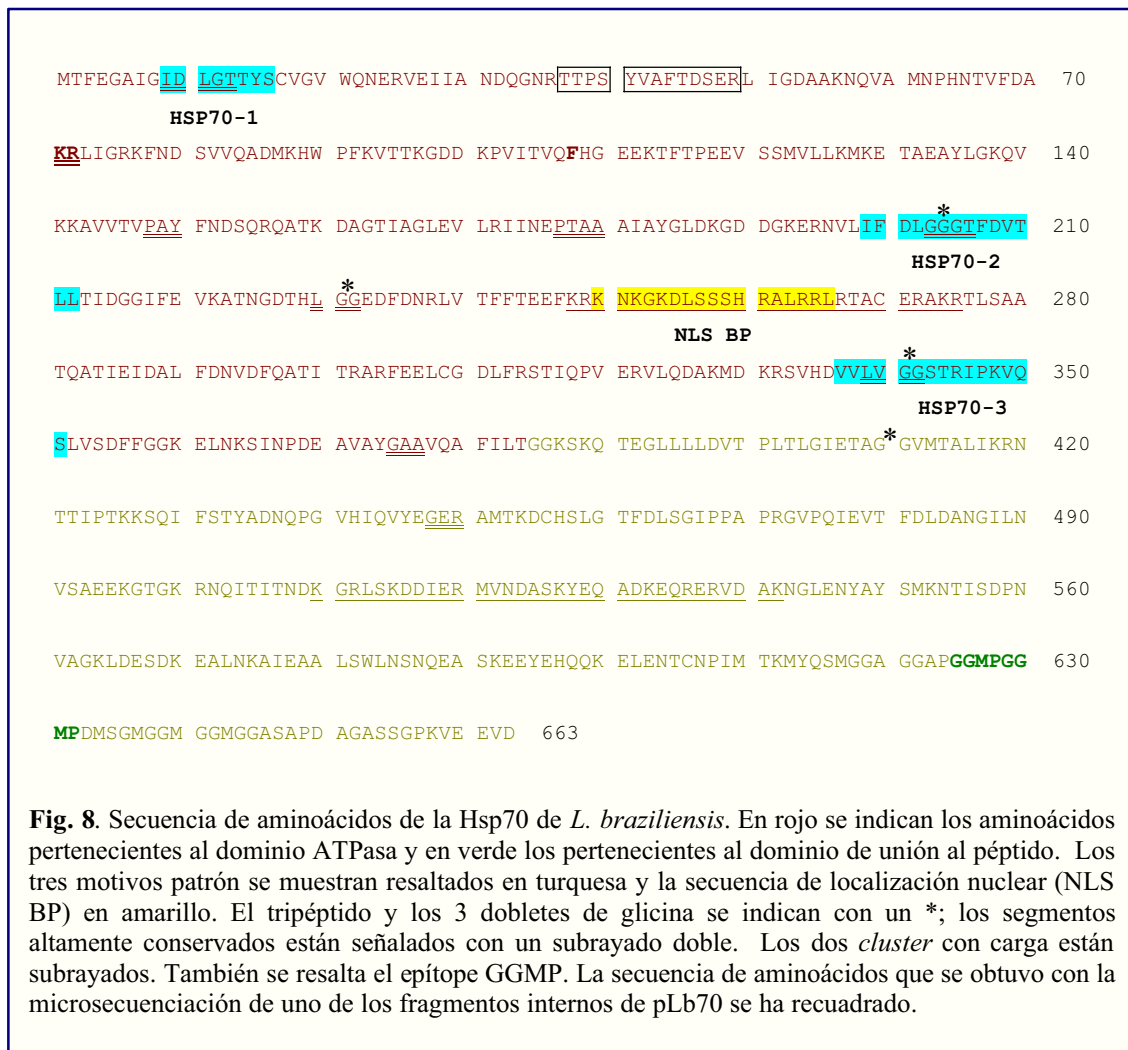
número de acceso **AF291716**. Los genes *HSP70* de eucariotas muestran entre un 50 y un 95% de identidad a nivel de nucleótidos. El análisis comparativo, realizado con el *software* LALING (Myers y Miller, 1988), entre algunos tripanosomátidos muestra un porcentaje de identidad de un 91,7% respecto a la secuencia de nucleótidos de *L. infantum* (Quijada y col., 1997), un 91,9% respecto a la de *L. donovani* (MacFarlane y col., 1990), o un 82,2% respecto a *T. cruzi* (Requena y col., 1988).

El análisis de restricción de la secuencia de nucleótidos del gen reveló que sólo poseía una diana *SaII* (GTCGAC), donde GAC codifica el ácido aspártico anexo al codón de terminación TAA. Para subclonar el gen entero, el ADN del fago recombinante 3 se digirió con la enzima *SaII* y se realizó el *Southern-blot* correspondiente. El fragmento de hibridación resultante, de 4,2 kb, se purificó y ligó al vector pBSKS previamente linealizado con la misma enzima y desfosforilado. La ligación también se llevó a cabo con relaciones molares de 1:1 y 1:2 (vector:inserto), con 180 ng de vector y 270 ó 420 ng de inserto. De las colonias transformadas, dos contenían el fragmento de 4,2 kb que porta el gen completo. Esta construcción fue denominada pBS/Lb70 (Fig. 7).



### 3.3.2 Caracterización teórica y estudio de homología de secuencia de la proteína Hsp70 de *L. braziliensis*.

Desde el ORF del gen *HSP70* de *L. braziliensis* se deduce una proteína de 663 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 5,35 y un peso molecular teórico de 71,95 KDa (Fig. 8).



Es probablemente la proteína más conservada a lo largo de la evolución en todos los organismos analizados hasta el momento, procariotas y eucariotas, y tanto en estructura como en función. Consta de dos dominios, un dominio amino-terminal de 44 kDa (aminoácidos 1-384) que une e hidroliza ATP, y un dominio carboxi-terminal de aproximadamente 30 kDa (aminoácidos 385 hasta el final) que contiene el sitio de unión al péptido (Benaroudj y col., 1997). Algunas Hsp70 contienen extensiones amino-terminal hidrofóbicas, de 26 a 52 aminoácidos, requeridas como péptido señal para la translocación hacia la organela, ya sea la mitocondria o el retículo endoplasmático, y extensiones de tetrapéptidos carboxi-terminal para la retención de la proteína en dicha organela, como KDEL, HDEL ó KDKK (Gething y Sambrook, 1992). Sin embargo, la Hsp70 de *L. braziliensis* caracterizada por nosotros carece de péptido señal y posee la secuencia conservada EEVD en el extremo carboxi-terminal, por lo que codifica la forma

citoplasmática y no mitocondrial o del retículo endoplasmático de la proteína. Esta forma presenta una localización difusa por todo el citoplasma.

La familia de las Hsp70 posee tres motivos patrón característicos, el primero centrado en un octapéptido conservado localizado en la región NH<sub>2</sub>-terminal de estas proteínas, y los otros dos en regiones conservadas localizadas en la parte central de la secuencia. Los tres se encuentran dentro del dominio de unión al ATP, y deben de estar implicados con la funcionalidad del mismo. Con el *software* PrositeScan del servidor ISREC se localizaron las posiciones de los tres motivos patrón de la Hsp70 de *L. braziliensis*:

- HSP70-1 Motivo patrón 1 de las proteínas de choque térmico hsp70  
Secuencia consenso: [IV] DLGT [ST] x [SC]  
Posición 9: IDLGTTYS
- HSP70-2 Motivo patrón 2 de las proteínas de choque térmico hsp70  
Secuencia consenso: [LIVMF] [LIVMFY] [DN] [LIVMFS] G [GSH] [GS]  
[AST] x(3) [ST] [LIVM] [LIVMFC]  
Posición 199: IFDLGGGTFDVTLL
- HSP70-3 Motivo patrón 3 de las proteínas de choque térmico hsp70  
Secuencia consenso:[LIVMY] x [LIVMF] x GG x [ST] x [LIVM] P x  
[LIVM] x [DEQKRSTA]  
Posición 337: VVLVGGSTRIPKVQS

El análisis de la secuencia de aminoácidos con el *software* ProfileScan (ISREC) mostró que la proteína posee tres regiones: una región rica en glicina, entre los aminoácidos 618-656; una región rica en metionina, aminoácidos 610-643; y una secuencia de localización nuclear de tipo bipartito (NLS BP), aminoácidos 249-266. Los NLS suelen ser secuencias básicas, necesarias para la unión de la proteína a un complejo proteico receptor de la membrana nuclear denominado importina, y su posterior translocación al interior nuclear. Este motivo se encuentra en la mayor parte de las proteínas que se acumulan en el núcleo, y es lógico que se encuentren en las Hsp70 puesto que durante la respuesta de “estrés” muchas migran desde el citoplasma al núcleo donde se asocian con polipéptidos que forman complejos insolubles. A elevadas temperaturas las proteínas nucleares se desnaturalizan parcialmente, exponiendo regiones hidrofóbicas que tienden a interactuar formando agregados insolubles. La unión de las Hsp70 a estas regiones podría



limitar tales interacciones y promover la disgregación (Gething y Sambrook, 1992). El transporte al núcleo también podría estar relacionado con un mecanismo de protección de la cromatina y ARN nuclear, así como con el fenómeno de termotolerancia, que se produce si existe un período de preinducción de choque térmico (Velázquez y col., 1980). También posee numerosos sitios putativos de fosforilación por diferentes kinasas, como tirosina kinasa (Tyr K), kinasa C (PKC), caseína kinasa II (CK2) y kinasa dependiente de AMPc. En concreto, hay dos sitios putativos para Tyr K, en las posiciones 520 y 542, nueve para PKC, distribuidos por toda la proteína, dieciséis para CK2 también por toda la proteína, y uno para la quinasa dependiente de AMPc, en la posición 418. La fosforilación de los distintos sitios modificaría la actividad catalítica de la proteína. Además, presenta dieciséis posibles sitios de N-miristilación, distribuidos por toda la proteína.

Karlin y Brocchieri (1998) han comparado un gran número de secuencias de Hsp70 de procariotas y eucariotas mediante los programas SSPA (alineamiento significativo de pares de segmentos) e INTERALIGN, que establece alineamientos globales o separados de subfamilias de las Hsp70. De este estudio determinaron residuos y regiones de elevada conservación que también aparecen conservados en la Hsp70 de *L. braziliensis* (Se señalan en la Fig. 8). Destacan el aminoácido glicina, donde un tripéptido y tres dobletes se conservan en varias posiciones, pudiendo ser críticos en el establecimiento de las conexiones estructurales o en facilitar conformaciones terciarias alternativas. También establecieron segmentos de al menos tres posiciones contiguas altamente conservadas, donde destacan la perfecta conservación del par de aminoácidos básicos KR que podría ser funcionalmente importante. Con la excepción de uno, todos los segmentos pertenecen al dominio de unión de ATP y tres de ellos están incluidos en las tres secuencias patrón de la Hsp70 descritas anteriormente.

El análisis estadístico de la secuencia proteica con el *software* SAPS (Brendel y col., 1992) para la distribución de cargas, mostró que la Hsp70 posee dos *cluster* o regiones con carga: una región con carga positiva, desde el aminoácido 248 al 275, y una región con carga mixta, desde el 509 al 542. La Hsp70 de eucariotas se distingue por poseer múltiples *cluster* con carga, una propiedad inusual de las secuencias proteicas presente en menos del 4% de todas las proteínas eucariotas (Karlin, 1995). Es posible que estas regiones con carga interaccionen iónicamente para ayudar a orientar y colocar la proteína para que interactúe de una manera hidrofóbica con residuos especiales de la proteína diana en su estado mal plegado. Las Hsp70 mitocondriales carecen de regiones con carga, mientras que

las citoplasmáticas y del retículo endoplasmático poseen dos regiones con carga separadas, una con carga mixta siempre próximo al extremo carboxi-terminal, y una segunda región con carga que en humanos y en levaduras se localiza entre las posiciones 244-272 (Karlin y Brocchieri, 1998).

En la Figura 9 se observa el alineamiento de las proteínas Hsp70 de varios tripanosomátidos. El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos refleja la observación general de que las dos terceras partes (sobre 450 aminoácidos) de la región NH<sub>2</sub>-terminal de estas proteínas están mucho más conservadas que la región COOH-terminal (Lindquist, 1986). La Hsp70 de *L. braziliensis* presenta 10 aminoácidos más que la de *L. infantum* y la de *L. donovani*, localizados en el extremo carboxi-terminal. Análisis con el *software* LALING (Myers y Miller, 1988) revelan que presenta un 91% de identidad de secuencia con la Hsp70 de *L. infantum*, un 91,1% de identidad con la de *L. dononani* y un 85% de identidad con la de *T. cruzi*. Cuando se establece la comparación con la Hsp70 de humanos el porcentaje disminuye a un 71,5% de identidad. La región del extremo carboxi-terminal contiene dos repeticiones del tetrapéptido GGMP, epítipo inmunodominante presente en todas las proteínas Hsp70 de parásito secuenciadas, excepto en *L. amazonensis* (Bock y Langer, 1993) y en *L. mexicana* (Vegara, Tesis Doctoral, 1992), así como en la Hsc70 de humanos y ratas (Young y col., 1990). Por otra parte, el alineamiento con el fragmento de la Hsp70 de *L. braziliensis* (MHOM/BR/M2903) obtenido por Amorim y col. (1996), que carece de los primeros 140 aminoácidos, muestra algunas diferencias con la Hsp70 obtenida por nosotros, tiene 9 aminoácidos menos y el alineamiento de aminoácidos y de nucleótidos de su fragmento respecto a la región correspondiente obtenida por nosotros muestra una identidad del 93,7% y 92%, respectivamente. Estas diferencias se deben probablemente al hecho de proceder de cepas distintas y provenientes de distintas zonas, Perú y Brasil. Este autor también ha realizado estudios de antigenicidad, pero no llegó a aislar el gen completo que codifica para la Hsp70 de *L. braziliensis*.

**Figura 9.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de las Hsp70 de *Leishmania braziliensis* (**Lb**), Genebank: AF291716 (en rojo); *L. infantum* (**Li**), Genebank: Y08020 (Quijada y col., 1997); *L. donovani* (**Ld**), Genebank: X52314 (MacFarlane y col., 1990); *T. cruzi* (**Tc**), Genebank: X07083 (Requena y col., 1988); Hsc70 humana (**Hu**), Genebank: Y00371 (Dworniczak y Mirault, 1987); y del fragmento de la Hsp70 de *L. braziliensis* obtenido por Amorim y col. (1996) (**Lb\***), Genebank: M87878. En verde se representan los residuos distintos a los de la secuencia de *L. braziliensis*. Las líneas indican los *gaps* introducidos para maximizar el alineamiento.

<b>Lb70</b>	MTFEGAIGIDLGTYSVGVWQNERVEIIANDQGNRTTSPSYVAFTDSERLIGDAAKNQVAMNPHNTVFD	70
<b>Li70</b>	MTFEGAIGIDLGTYSVGVWQNERVEIIANDQGNRTTSPSYVAFTDSERLIGDAAKNQVAMNPHNTVFD	70
<b>Ld70</b>	MTFEGAIGIDLGTYSVGVWQNERVEIIANDQGNRTTSPSYVAFTDSERLIGDAAKNQVAMNPHNTVFD	70
<b>Tc70</b>	MTFEGAIGIDLGTYSVGVWQNERVEIIANDQGNRTTSPSYVAFTDSERLIGDAAKNQVAMNPHNTVFD	70
<b>Hu70</b>	MSKGPAGIDLGTYSVGVWQNERVEIIANDQGNRTTSPSYVAFTDSERLIGDAAKNQVAMNPHNTVFD	70
<b>Lb70</b>	KRLIGRKFNDSSVQADMKHWPFKVTTKGDGDKPVIIVQFHGEEKFTTPEEVSSMVLKMKETAEEAYLGKQV	140
<b>Li70</b>	KRLIGRKFNDSSVQADMKHWPFKVTTKGDGDKPVIIVQFHGEEKFTTPEEVSSMVLKMKETAEEAYLGKQV	140
<b>Ld70</b>	KRLIGRKFNDSSVQADMKHWPFKVTTKGDGDKPVIIVQFHGEEKFTTPEEVSSMVLKMKETAEEAYLGKQV	140
<b>Tc70</b>	KRLIGRKFNDSSVQADMKHWPFKVTTKGDGDKPVIIVQFHGEEKFTTPEEVSSMVLKMKETAEEAYLGKQV	140
<b>Hu70</b>	KRLIGRKFNDSSVQADMKHWPFKVTTKGDGDKPVIIVQFHGEEKFTTPEEVSSMVLKMKETAEEAYLGKQV	139
<b>Lb70</b>	KKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRIINEPTAAAIAVGLDKGDDGKERNVLIIDLGGGTFDVT	210
<b>Li70</b>	KKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRIINEPTAA-IAYGLDKGDDGKERNVLIIDLGGGTFDVT	209
<b>Ld70</b>	KKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRIINEPTAA-IAYGLDKGDDGKERNVLIIDLGGGTFDVT	209
<b>Tc70</b>	KKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRIINEPTAAIAVGLDKGDDGKERNVLIIDLGGGTFDVT	210
<b>Hu70</b>	KNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRIINEPTAAAIAVGLDKGDDGKERNVLIIDLGGGTFDVT	208
<b>Lb70*</b>	KKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRIINEPTAAAIAVGLDKGDDGKERNVLIIDLGGGTFDVT	210*
<b>Lb70</b>	LLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRNKNGKDLSSSHRALRRLRTACERAKRTLSSA	280
<b>Li70</b>	LLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRNKNGKDLSSSHRALRRLRTACERAKRTLSSA	279
<b>Ld70</b>	LLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRNKNGKDLSSSHRALRRLRTACERAKRTLSSA	279
<b>Tc70</b>	LLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRNKNGKDLSSSHRALRRLRTACERAKRTLSSA	280
<b>Hu70</b>	LLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRNKNGKDLSSSHRALRRLRTACERAKRTLSSA	277
<b>Lb70*</b>	LLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRNKNGKDLSSSHRALRRLRTACERAKRTLSSA	280*
<b>Lb70</b>	TQATIEIDALFDNVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQ	350
<b>Li70</b>	TQATIEIDALFDNVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQ	349
<b>Ld70</b>	TQATIEIDALFDNVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQ	349
<b>Tc70</b>	TQATIEIDALFDNVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQ	350
<b>Hu70</b>	TQATIEIDALFDNVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQ	347
<b>Lb70*</b>	TQATIEIDALFDNVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQPVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQ	350*
<b>Lb70</b>	SLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN	420
<b>Li70</b>	SLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN	419
<b>Ld70</b>	SLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN	419
<b>Tc70</b>	SLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN	420
<b>Hu70</b>	SLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN	417
<b>Lb70*</b>	SLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFILTTGGKSKQTEGLLLLDVTPPLTLGIETAGGVMTALIKRN	420*
<b>Lb70</b>	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVVEGERAMTKDCHSLGTFDLSGIPPAPRGVPQIEVTFDLDANGILN	490
<b>Li70</b>	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVVEGERAMTKDCHSLGTFDLSGIPPAPRGVPQIEVTFDLDANGILN	489
<b>Ld70</b>	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVVEGERAMTKDCHSLGTFDLSGIPPAPRGVPQIEVTFDLDANGILN	489
<b>Tc70</b>	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVVEGERAMTKDCHSLGTFDLSGIPPAPRGVPQIEVTFDLDANGILN	490
<b>Hu70</b>	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVVEGERAMTKDCHSLGTFDLSGIPPAPRGVPQIEVTFDLDANGILN	487
<b>Lb70*</b>	TTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVVEGERAMTKDCHSLGTFDLSGIPPAPRGVPQIEVTFDLDANGILN	490*
<b>Lb70</b>	VSAEEKGTGKRNIITITNDKGRLSKDDIERMVDNASKYEQADKEQREVDKNGLENYAYSMKNTISDPN	560
<b>Li70</b>	VSAEEKGTGKRNIITITNDKGRLSKDDIERMVDNASKYEQADKEQREVDKNGLENYAYSMKNTISDPN	559
<b>Ld70</b>	VSAEEKGTGKRNIITITNDKGRLSKDDIERMVDNASKYEQADKEQREVDKNGLENYAYSMKNTISDPN	559
<b>Tc70</b>	VSAEEKGTGKRNIITITNDKGRLSKDDIERMVDNASKYEQADKEQREVDKNGLENYAYSMKNTISDPN	560
<b>Hu70</b>	VSAEEKGTGKRNIITITNDKGRLSKDDIERMVDNASKYEQADKEQREVDKNGLENYAYSMKNTISDPN	557
<b>Lb70*</b>	VSAEEKGTGKRNIITITNDKGRLSKDDIERMVDNASKYEQADKEQREVDKNGLENYAYSMKNTISDPN	560*
<b>Lb70</b>	VAGKLESDKALNKAIEAALSWLNSNQEASKEEYEHQKELENTCNPIMTKMYQSMGGGAG---GAPGGM	627
<b>Li70</b>	VAGKLESDKALNKAIEAALSWLNSNQEASKEEYEHQKELENTCNPIMTKMYQSMGGGAG---GAPGGM	620
<b>Ld70</b>	VAGKLESDKALNKAIEAALSWLNSNQEASKEEYEHQKELENTCNPIMTKMYQSMGGGAG---GAPGGM	620
<b>Tc70</b>	VAGKLESDKALNKAIEAALSWLNSNQEASKEEYEHQKELENTCNPIMTKMYQSMGGGAG---GAPGGM	630
<b>Hu70</b>	VAGKLESDKALNKAIEAALSWLNSNQEASKEEYEHQKELENTCNPIMTKMYQSMGGGAG---GAPGGM	618
<b>Lb70*</b>	VAGKLESDKALNKAIEAALSWLNSNQEASKEEYEHQKELENTCNPIMTKMYQSMGGGAG---GAPGGM	624*
<b>Lb70</b>	PGGMPDM---SGM-GGM-GGMGGA---SAPDA---GA---SSGPKVEEVD	663
<b>Li70</b>	PGGMPDM---SGMSGG-----AGPAGGA---SSGPKVEEVD	653
<b>Ld70</b>	PGGMPDM---SGMSGG-----AGPAGGA---SSGPKVEEVD	653
<b>Tc70</b>	PGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGANPSSSSGPKVEEVD	680
<b>Hu70</b>	PGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGMPGGANPSSSSGPKVEEVD	646
<b>Lb70*</b>	PGGMPDM---SGM-GG---GAG-----PGA---GA---SSGPKVEEVD	654*

### 3.3.3 Organización genómica del gen *HSP70* de *L. braziliensis*.

El análisis de restricción con varias enzimas y *Southern-blot* mostró que los 5 fagos de ADN recombinante positivos obtenidos tras el *screening* de la genoteca contenían un único gen *HSP70* completo, pero incluido en dos tipos de fragmentos solapantes de ADN genómico generados por dos digestiones parciales distintas de la enzima *Sau3A* utilizada en la construcción de la genoteca, por lo que sólo se seleccionaron 2 fagos (el 3 y 5). Este hecho sugirió que en *L. braziliensis* el gen *HSP70* no se encuentra organizado en repeticiones en tándem de varias unidades génicas, como sucede en el resto de tripanosomátidos.

Para confirmar este resultado, así como para comprobar la posibilidad de que quizás hubiera alguna copia localizada en un sitio distante en el genoma, como sucede en otras especies de tripanosomátidos como *L. amazonensis* (Bock y Langer, 1993), *L. major* (Lee y col., 1988), *T. brucei* (Lee y col., 1990) o *T. cruzi* (Requena y col., 1989), se realizaron análisis de *Southern-blot* del ADN genómico de *L. braziliensis*.

Se construyó una sonda homóloga correspondiente a la región codificante completa del gen *HSP70* obtenida por la digestión del plásmido pQE/rLb70, que contiene inserto el gen *HSP70* completo, con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Fig. 10). El fragmento de 1,99 kb se purificó desde un gel de agarosa y se marcó radiactivamente con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP mediante el método *Rediprime DNA labelling system* de Amersham Pharmacia, según las indicaciones del fabricante (Materiales y Métodos, 2.14.5). Se realizaron digestiones totales de 2  $\mu$ g de ADN genómico de promastigote de *L. braziliensis* con 20 unidades de enzima durante toda la noche a 37°C. Se utilizaron enzimas que cortan 1 sola vez dentro de la región codificante y enzimas que no cortan dentro.

-Enzimas que cortan dentro:

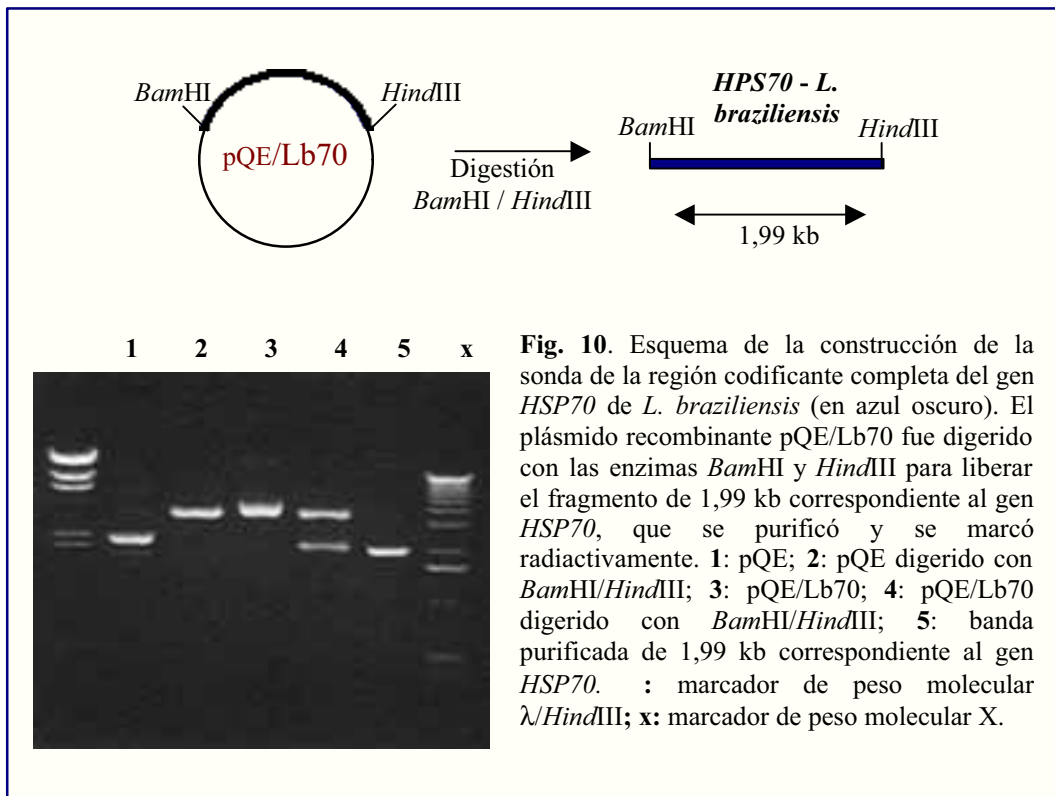
-*Pst*I: corta a 970 pb corriente abajo del ATG

-*Bgl*III: corta a 1286 pb corriente abajo del ATG

-Enzimas que no cortan dentro:

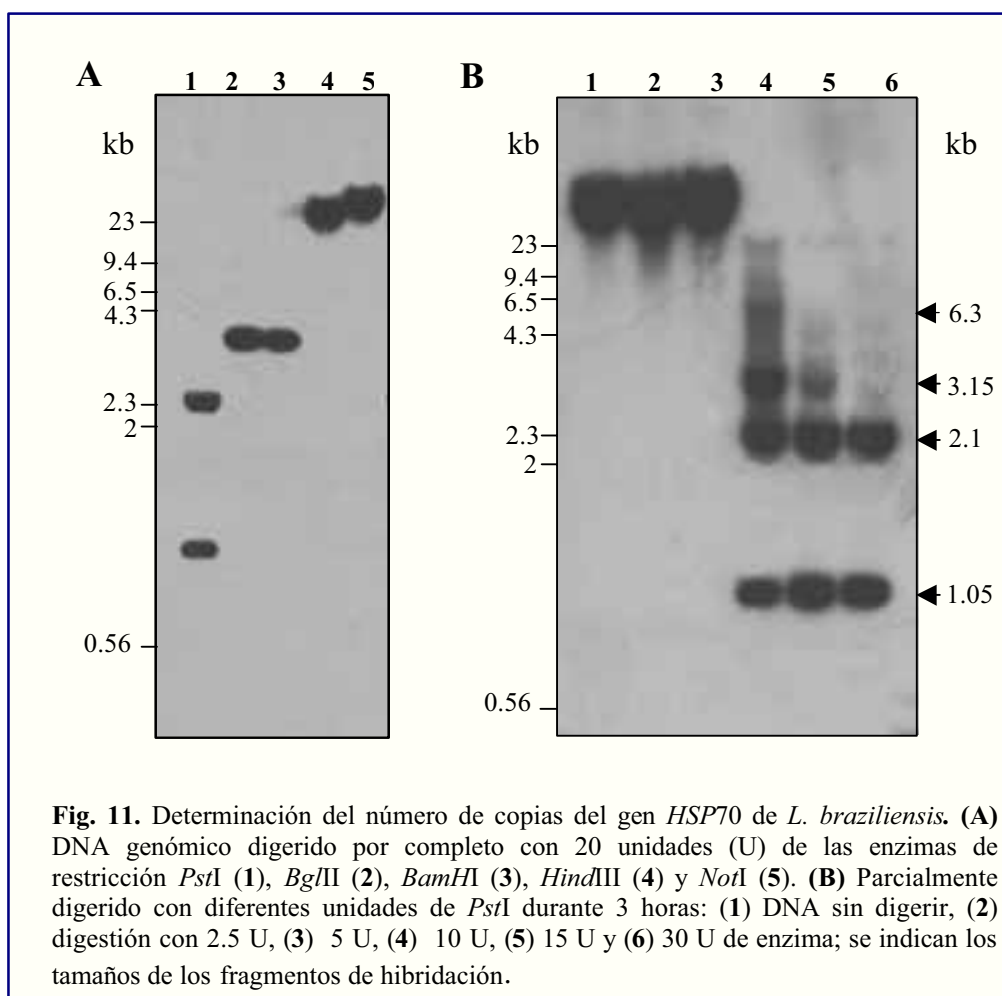
-*Bam*HI, *Hind*III y *Not*I

El ADN digerido fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y transferido a membrana de nylon. La hibridación con la sonda homóloga se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 2.14.5 de Materiales y Métodos. En la Figura 11.A se



muestra la hibridación obtenida. La enzima *Pst*I genera dos bandas de hibridación, una de 1,05 kb de longitud y otra de mayor intensidad de 2,1 kb; con *Bg*/II aparecen dos bandas con un tamaño próximo a 3,3 kb y que, dada la reticulación del gel, no se resuelven bien. La digestión con *Bam*HI libera un fragmento de 3,2 kb, mientras que *Hind*III y *Not*I generan fragmentos de alto peso molecular. Las digestiones con *Pst*I y *Bg*/II también se realizaron en el plásmido pQE/rLb70, verificándose que ambas cortan una sola vez dentro de la unidad génica puesto que el plásmido se linealiza.

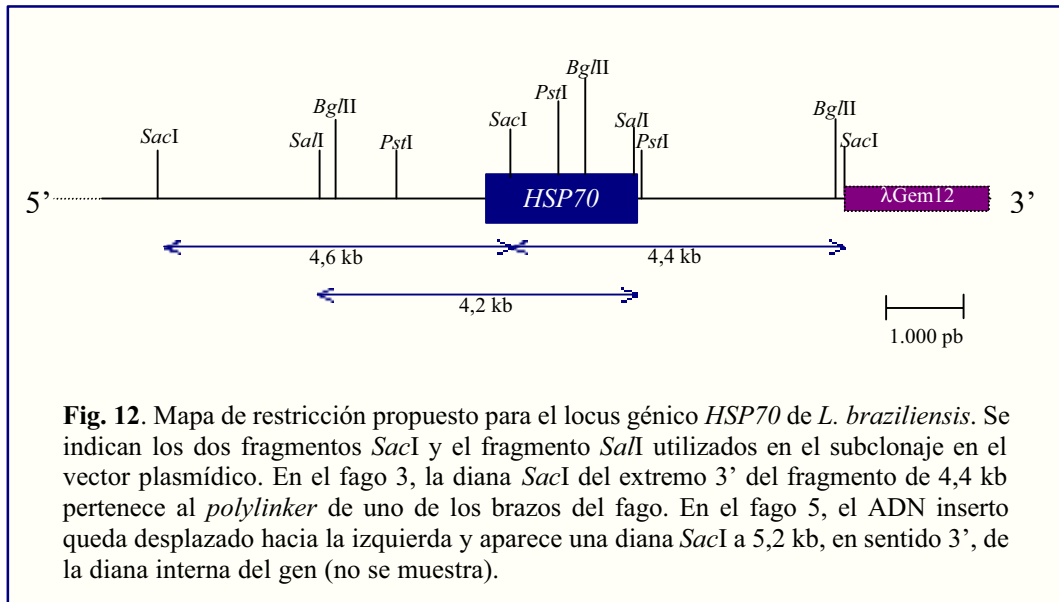
De este análisis *Southern* se deduce que hay una única copia del gen *HSP70* en *L. braziliensis*, y se confirmó por la hibridación con la misma sonda de una serie de digestiones parciales de 2  $\mu$ g de ADN genómico con cantidades crecientes de unidades de enzima *Pst*I, durante 3 horas a 37°C. Como se muestra en la Figura 11.B, con 10 unidades de enzima se generan 4 fragmentos con longitudes de 6,3 kb, 3,15 kb, 2,1 kb y 1,05 kb. Aumentando las unidades de enzima, el fragmento de 6,3 es digerido dando dos fragmentos de 3,15 kb, que a su vez es digerido generando finalmente los fragmentos de 2,1 kb y 1,05 kb.



Los resultados obtenidos muestran que el gen que codifica la Hsp70 de *L. braziliensis* consiste en una única copia, al contrario de que ocurre con el resto de tripanosomátidos, donde se organizan en *cluster* formado por repeticiones en tándem de varias unidades génicas. En *T. cruzi* hay 7 copias (Requena y col., 1988), *L. donovani* tiene 12 (MacFarlane y col., 1990), y *L. infantum* 6 (Quijada y col., 1997). Es relevante el hecho de que el gen que codifica la histona H1 en *L. braziliensis* se encuentra también en una única copia (Martínez y col., 2001), mientras que en otros tripanosomátidos consiste en varias repeticiones. En ambos casos se trata de proteínas altamente conservadas y con una fuerte inmunogenicidad. Probablemente la cepa de *L. braziliensis* (MHOM/PE/95/LQ-8) empleada sea una cepa ancestral que haya mantenido algunos de sus genes sin duplicar.

En la Figura 12 se esquematiza el mapa de restricción propuesto para el locus génico *HSP70* de *Leishmania braziliensis*. Debe existir una diana *Pst*I en la región 3'UTR, que no pudo ser secuenciada, próxima al codón de terminación. Las dos dianas *Pst*I

localizadas fuera del locus génico se orientaron de este modo puesto que la secuenciación de los 331 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación no reveló la presencia de ninguna diana *PstI*.



### **3.4 Estudio de la respuesta inmune humoral frente a la Hsp70 de *L. braziliensis*. Mapeo antigénico.**

El hecho de que la Hsp70 sea un antígeno dominante en muchas infecciones parasitarias induciendo una fuerte respuesta humoral y celular durante la infección, ha llevado a su estudio como herramienta para el diagnóstico. Diversos autores han estudiado la antigenicidad de las Hsp70 de tripanosomátidos. Así, MacFarlane y col. (1990), De Andrade y col. (1992), Wallace y col. (1992) y Arora y col., (1995), han analizado la Hsp70 de *L. donovani*; Requena y col. (1993) y Krautz y col. (1998) la de *T. cruzi*; y Quijada y col. (1996<sup>a,b</sup>, 1998) la de *L. infantum*. No obstante, hasta la fecha, la especificidad de este antígeno permanece en controversia.

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral, fue identificar proteínas de *L. braziliensis* con una posible utilidad en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Una vez seleccionada la proteína de choque térmico de 70 kDa y clonado y caracterizado el gen que la codifica, el objeto del presente capítulo fue la expresión de la Hsp70 como proteína recombinante y el análisis de la respuesta inmune humoral mediante ELISA con sueros de pacientes con LMC, LC, LV y Chagas crónico, así como frente a sueros de personas sanas. También se dividió la proteína en cinco fragmentos solapantes, que se expresaron como proteínas recombinantes y se testaron mediante ELISA, para realizar de este modo un mapeo antigénico y localizar la región o regiones donde se localizan los epítopes antigénicos, ya sean específicos o de reacción cruzada.

#### **3.4.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante Hsp70 de *L. braziliensis*.**

##### **a) Subclonaje del gen *HSP70* en el vector de expresión pQE<sub>30</sub>.**

El plásmido pQE<sub>30</sub> es un vector de expresión perteneciente a la serie pQE3X de Quiagen. Estos vectores permiten la sobreexpresión del gen clonado, bajo el control del promotor lacI, como una proteína de fusión con una cola de 6 residuos de histidinas en el extremo amino-terminal. Esta cola permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad en una resina de Ni<sup>2+</sup>.

Mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pBS/Lb70 con los cebadores Hsp70 *sense* y *antisense* (relatados en Materiales y Métodos, 2.8) se obtuvo un fragmento

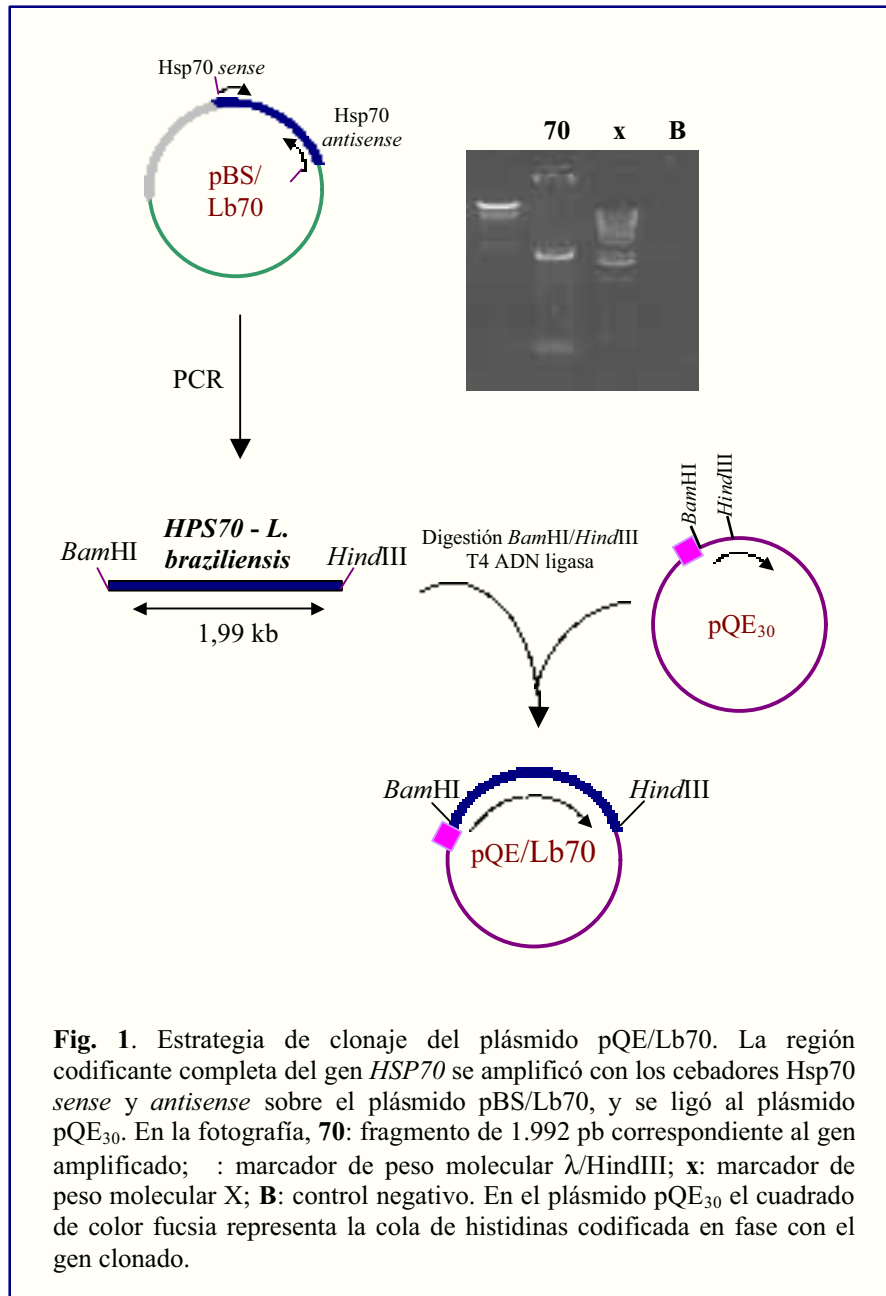


de ADN de 1.992 pb que correspondía a la región codificante completa del gen *HSP70*. El cebador *antisense* contiene el triplete de terminación TAA, contiguo a la diana *SalI* y por tanto no presente en la región clonada en pBS/Lb70. El programa de amplificación incluyó un ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 10 ciclos de: 94°C 1 minuto, 66°C 1 minuto, y 72°C 2 minutos; y de 20 ciclos de: 94°C 1 minuto, 69°C 1 minuto y 72°C 2 minutos; con una elongación final de 72°C 10 minutos. Se utilizaron 40 pmoles de cada cebador y 200 ng del plásmido pBS/Lb70 como molde.

El producto de amplificación se purificó mediante fenolización y precipitación del ADN, y posteriormente se digirió con las enzimas de restricción que se habían incluido en las regiones *linker* de los cebadores: *BamHI* y *HindIII*. La banda de 1.992 pb se purificó a partir de un gel de agarosa (Quiaex II, Quiagen) y se clonó en el vector pQE<sub>30</sub> previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La ligación se realizó utilizando relaciones molares vector:inserto de 1:1 y 1:3, partiendo en ambos casos de 100 ng de vector. Las colonias transformadas se chequearon extrayendo el ADN plasmídico y digiriendo con las mismas enzimas utilizadas en el subclonaje para así liberar el inserto. Al ser un clonaje orientado, la inserción siempre ocurrió en la orientación correcta.

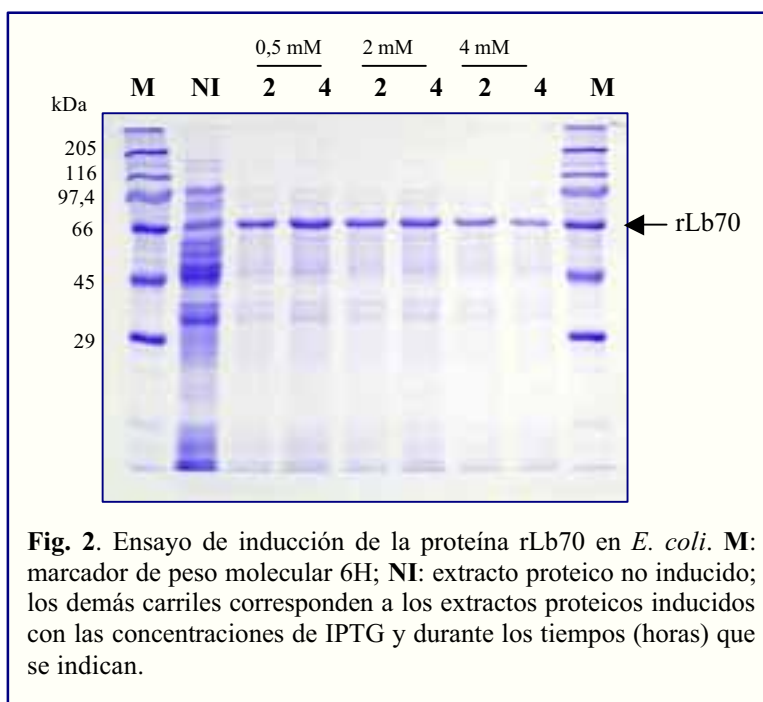
La secuenciación de dos de los clones obtenidos con los cebadores pQE-Type III y pQE-Reverse (Materiales y Métodos, 2.12), reveló que la región codificante del gen *HSP70* de *Leishmania braziliensis* se había clonado en la pauta de lectura adecuada para su expresión como proteína recombinante. La construcción obtenida se denominó pQE/Lb70.

En la Fig. 1 se esquematiza el subclonaje del gen *HSP70* de *L. braziliensis* en el vector de expresión pQE<sub>30</sub>.



### b) Inducción y solubilización de la proteína Hsp70 de *L. braziliensis* en condiciones desnaturalizantes.

Para la expresión de la proteína recombinante, la cepa de *E. coli* Topp 3 se transformó con el plásmido pQE/Lb70. Los ensayos de inducción se realizaron según se describió en el apartado 2.26.1 de Materiales y Métodos, y se determinó que las condiciones óptimas de inducción de la proteína recombinante (rLb70) eran de 4 horas con 0,5 mM de IPTG en medio LB (Fig. 2).



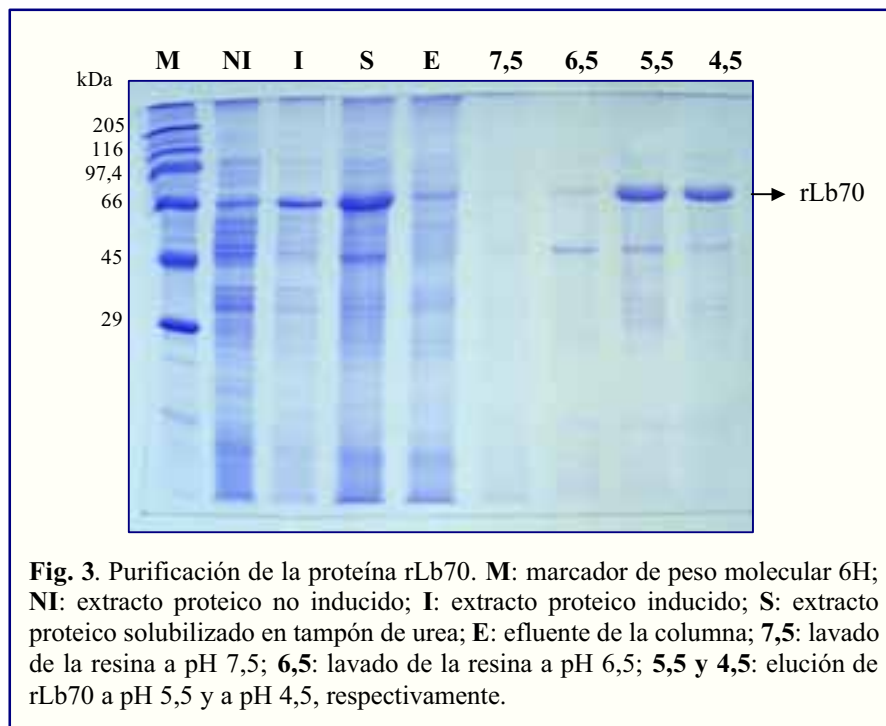
**Fig. 2.** Ensayo de inducción de la proteína rLb70 en *E. coli*. **M:** marcador de peso molecular 6H; **NI:** extracto proteico no inducido; los demás carriles corresponden a los extractos proteicos inducidos con las concentraciones de IPTG y durante los tiempos (horas) que se indican.

La solubilización de la proteína (2.26.2, Materiales y Métodos) se realizó en condiciones desnaturizantes utilizando un tampón de urea 8M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris 10 mM, PMSF 1mM, al que también se añadió Tween-20 al 0,1% (v/v) como detergente no iónico,  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM como agente reductor y glicerol al 10% (v/v) como agente estabilizante. Éstos se añadieron para prevenir la posible asociación y co-purificación, debido a las interacciones hidrofóbicas, de otras proteínas con la proteína recombinante, por su carácter de actividad “chaperona”. El pH del tampón fue de 8, con el que se consiguió mejor resultado que a pH 5,35, correspondiente al punto isoeléctrico teórico de la proteína.

### c) Purificación de rLb70 mediante cromatografía de afinidad a $\text{Ni}^{2+}$ .

La purificación de la proteína recombinante rLb70 en condiciones desnaturizantes se realizó según se describió en el apartado 2.26.4 de Materiales y Métodos. La proteína rLb70 solubilizada se unió a la resina de Ni-NTA agarosa durante 12 horas a 4°C, con agitación suave. La resina se equilibró previamente en el mismo tampón de solubilización. En la Fig. 3 se observan las diferentes fracciones de purificación. La unión de la proteína recombinante a la resina de  $\text{Ni}^{2+}$  fue prácticamente completa, ya que en el efluente de la columna (Fig. 3, E) sólo se detectaron trazas, además la mayoría de las proteínas de *E. coli* quedaron en esta fracción. Los lavados con el tampón de solubilización a pH 7,5 y 6,5 se

realizaron para eliminar otras proteínas contaminantes de *E. coli* que pudiesen estar unidas también a la resina (por poseer residuos de histidinas). Estos lavados se realizaron con grandes volúmenes, por lo que las proteínas contaminantes quedaron muy diluidas. La elución de rLb70 se produjo con el tampón de solubilización a pH 5,5 y 4,5, sin  $\beta$ -Mercaptoetanol. La pureza de esta purificación fue alta, pero debido a la actividad “chaperona” de la Hsp70 co-purificaron algunas proteínas bacterianas que probablemente se encontraban asociadas a la proteína recombinante. Para eliminar las proteínas contaminantes, la proteína purificada rLb70 fue electroeluída desde un gel de SDS-poliacrilamida (2.23 Materiales y Métodos). El rendimiento final de la proteína purificada fue de 4,2 mg por litro de cultivo.



### 3.4.2 Respuesta humoral frente a la proteína recombinante rLb70 de *L. braziliensis*.

La proteína recombinante rLb70 fue analizada como antígeno mediante la técnica de ELISA, tal y como se describió en el apartado 2.27 de Materiales y Métodos. Se emplearon un total de 89 sueros: 20 de pacientes con LMC y 30 de pacientes con LC provenientes de Cuzco, Perú y producidas por *Leishmania braziliensis*; 3 de pacientes con LV producida por *Leishmania infantum* y procedentes de España; 16 de pacientes con la

enfermedad de Chagas crónica procedentes de Brasil; y 10 sueros de personas sanas de Perú y otros 10 sueros de personas sanas de S/C de Tenerife, España, que no han tenido contacto con ninguna de las enfermedades y que se utilizaron como controles negativos. (En el anexo de esta Tesis se detallan las fichas clínicas de los pacientes)

La proteína se diluyó a una concentración de 2 µg/ml en tampón carbonato, y cada pocillo se sensibilizó con 100 µl (0,2 µg de rLb70 por pocillo). Los sueros se emplearon diluidos 1:100 en tampón PBS-Tween-20 0,05% (v/v). Los ensayos de ELISA se realizaron por triplicado y el punto de corte para la positividad se estableció como la media de todos los sueros control negativos más tres desviaciones estándar. Al ser menor de 0,1 (exactamente 0,0228) se tomó aquel valor por exclusión.

Los valores de D.O.<sub>450</sub> por ELISA de todos los sueros frente a la rLb70 se muestran en la Tabla 1.

El estudio de antigenicidad de la proteína recombinante completa Hsp70 de *L. braziliensis* mostró un elevado reconocimiento por los sueros con LMC y LC: 84% (42/50), corroborando que se trata de un antígeno fuertemente inmunogénico, como ocurre para un largo espectro de patógenos intracelulares (Maresca y Kobayashi, 1994). Este elevado reconocimiento también se ha descrito para las Hsp70 de otros tripanosomátidos, como *L. infantum*, con un 78,9% (Quijada y col., 1998) y *L. donovani*, con un 94% (Wallace y col., 1992), causantes de la LV; o *T. cruzi*, en la enfermedad de Chagas, con un 78% (Krautz y col., 1998). A pesar de que los sueros de pacientes con LC presentan un título menor de anticuerpos que los de LMC, como ya se ha comentado, el porcentaje de reconocimiento de los sueros de pacientes con LMC fue similar a la de los sueros de pacientes con LC, con un 85% (17/20) y 83.3% (25/30), respectivamente. Sin embargo, sí se observa que la intensidad de la respuesta humoral de los pacientes con LMC fue algo más elevada que la de los pacientes con LC, probablemente debido a que clínicamente la LMC produce una reacción fuertemente inflamatoria.

En nuestras condiciones de ensayo, la reacción cruzada en el reconocimiento de la Hsp70 de *L. braziliensis* por sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica fue más baja de lo esperado, ya que sólo un 18.75% de éstos (3/16) reconocieron la proteína y con títulos muy bajos. Este hecho fue sorprendente debido a la proximidad evolutiva de ambos tripanosomátidos y al carácter conservado de la Hsp70, presentando ambas proteínas un 85% de identidad.

Sueros LMC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros control -	D.O. <sub>450nm</sub>
LM 015	0,5814	LM 017	0,25606667	Try 1	0,32473333	B 01	0,00806667
LM 033	0,16073333	LM 071	0,32173333	Try 4	0,01173333	B 02	0,0034
LM 036	0,06106667	LM 092	0,31573333	Try 7	0,10373333	B 03	0,0034
LM 043	0,0224	LR 385	0,52673333	Try 8	0,0214	B 04	0,0034
LM 119	0,4444	LR 449	0,11473333	Try 10	0,0044	B 05	-0,00026667
LR 470	0,3104	LR 474	0,29273333	Try 12	0,00873333	B 06	0,00473333
LR 482	0,34106667	LR 493	0,0804	Try 14	0,02673333	B 07	0,00506667
LR 517	0,84673333	LR 494	0,16406667	Try 15	0,0514	B 08	0,02006667
LR 536	0,87106667	LR497	0,52073333	Try 16	0,01173333	B 09	0,01073333
LR 538	0,85773333	LR 502	0,0236	Try 19	0,19006667	B 10	0,0184
LR 618	0,6364	LR 511	0,1851	Try 20	0,0124	S/C 1	0,0094
LR 626	0,76473333	LR 515	0,35606667	Try 21	0,02573333	S/C 2	0,0104
LR 628	0,90606667	LR 537	0,5064	Try 22	0,0284	S/C 3	0,00206667
LR 629	0,3754	LR 539	0,0771	Try 26	0,00806667	S/C 4	0,00106667
LR 630	0,68206667	LR 560	0,0936	Try 28	0,01006667	S/C 5	0,0024
LR 631	0,61173333	LR 572	0,45306667	C+Tryp	0,0204	S/C 6	0,00273333
LR 654	0,5724	LR 576	0,49106667			S/C 7	0,0014
LR 661	0,78373333	LR 591	0,6054	HL-42	0,0094	S/C 8	0,0084
LR 667	0,1654	LR 594	0,74506667	HL-77	0,0054	S/C 9	0,00406667
LR 676	0,03406667	LR 620	0,0374	JK-1	0,01873333	S/C 10	0,00906667
		LR 622	0,21306667				
		LR 625	0,59373333			Promedio	0,0064
		LR 632	0,2884			Desv. est	0,00548469
		LR 641	0,48673333			Prom+3 Des	0,02285408
		LR 643	0,32273333			Pto. de corte	0,1
		LR 647	0,4264				
		LR 651	0,2514				
		LR 652	0,47473333				
		LR 656	0,35373333				
		LR 692	0,5034				

**Tabla 1.** Media de las D.O.<sub>450nm</sub> de los 3 ensayos ELISA de la proteína rLb70. Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

Los resultados obtenidos por ELISA con la Hsp70 recombinante de *L. braziliensis* concuerdan con los análisis previos realizados mediante *Western-blot* con la Hsp70 purificada - no recombinante, donde se puso de manifiesto el alto reconocimiento de los sueros con LMC y LC (100%) y la existencia de algo de reacción cruzada con los sueros de pacientes con Chagas (12,5%) (Capítulo 2 de Resultados y Discusión: Fig. 4 y Tabla 1). Por otro lado, los análisis de *Western-blot* que se realizaron con proteínas totales de *T. cruzi*, relatados en el Capítulo 1 de Resultados y Discusión (Fig. 6), mostraron una fracción de aproximadamente 70 kDa que podría ser homóloga a la de *L. braziliensis*, pLb70, y que por lo tanto, podría corresponder a la Hsp70 de *T. cruzi* (pTc70). Esta proteína además de ser reconocida por los sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas, también lo fue por los sueros con LMC/LC. Krautz y col. (1998) también han descrito una elevada reacción cruzada de sueros de pacientes con leishmaniasis hacia las Hsp70 de *T. cruzi*. En concreto, un 70% de los sueros con leishmaniasis cutánea mostraron títulos de anticuerpos por encima del punto de corte con la Hsp70-citoplasmática de *T. cruzi*.

Parece ser, que el hecho de que la Hsp70 de *L. braziliensis* no sea bien reconocida por sueros de pacientes chagásicos no implica que la Hsp70 de *T. cruzi* no sea bien reconocida por sueros de pacientes con LMC/LC. Esto ha sido explicado por diferentes autores de distinta manera. Levin y col. (1990) hacen la observación de que los pacientes con Chagas crónico muestran niveles bajos o moderados de reactividad anti-Hsp70. Además, Yeyati y col. (1991) determinaron que la reactividad anti-Hsp70 de *T. cruzi* por parte de sueros con infección mixta por *T. cruzi* / *L. braziliensis* provenía principalmente de la infección por *L. braziliensis*, ya que los sueros de pacientes chagásicos mostraron niveles muy bajos de anticuerpos anti-Hsp70 de *T. cruzi*, mientras que los individuos afectados sólo por *L. braziliensis* sí reaccionaron con la Hsp70 de *T. cruzi*. Otra explicación distinta ha sido dada por De Andrade y col. (1992), puesto que los epítopes repetitivos GGMP de *T. cruzi* son muy antigénicos (Ibañez y col., 1988; Hoft y col., 1989), postulan que en la infección con *T. cruzi* la respuesta anti-Hsp70 se dirige principalmente hacia estos epítopes, de los que *T. cruzi* tiene 9 repeticiones, mientras que la Hsp70 de *Leishmania donovani* sólo tiene 2. Pero, sin embargo, Requena y col. (1993) mediante el mapeo de los determinantes antigénicos de la Hsp70 de *T. cruzi* encontraron que, por el contrario, esta región carboxi-terminal, rica en GGMP, es muy poco reconocida por los sueros de los pacientes chagásicos, aunque en animales de experimentación sea altamente inmunogénica.

La Hsp70 de *L. braziliensis* no mostró mediante ELISA reacción cruzada con los 3 sueros de LV en las condiciones utilizadas, aún cuando éstos presentaron valores de D.O. elevados tanto frente a proteínas totales como frente a la Hsp70 de *L. infantum*. Este hecho también sorprende debido al alto porcentaje de identidad con la Hsp70 de *L. infantum* (91%). Por contra, Quijada y col. (1998) han descrito que la Hsp70 de *L. infantum* muestra reacción cruzada con sueros de pacientes con LMC (84,6%) y con sueros de pacientes con Chagas crónico (Quijada y col., 1996<sup>a</sup>). Al igual que no se cumple la reciprocidad entre la Hsp70 de *L. braziliensis* y la de *T. cruzi*, parece que tampoco se cumple entre la Hsp70 de *L. braziliensis* y la de *L. infantum*.

Por último, los 20 sueros control sanos, 10 de Perú, procedentes del mismo área geográfica que los sueros de pacientes con LMC y LC, y los otros 10 de S/C de Tenerife, todos de personas sin contacto con la enfermedad, mostraron una reactividad negativa frente a la Hsp70 de *L. braziliensis*.

Son varios los autores que han realizado estudios de antigenicidad con la Hsp70 de diversos tripanosomátidos con fines serodiagnósticos, pero estos estudios han tenido diferentes resultados. Por un lado, la Hsp70 de *L. donovani* ha sido descrita como un marcador específico de enfermedad por MacFarlane y col. (1990), Wallace y col. (1992) y De Andrade y col. (1992), ya que es reconocida de forma específica por el sistema inmune del individuo parasitado. Sólo Arora y col. (1995) describen que los sueros de individuos sanos también presentan anticuerpos frente a la proteína recombinante Hsp70 de *L. donovani*. Por otro lado, a las Hsp70 de *L. infantum* (Quijada y col., 1996<sup>a</sup>) y de *T. cruzi* (Nafziger y col., 1991, Krautz y col., 1998) no se las considera un marcador específico de enfermedad puesto que muestran reacción cruzada. Además, Requena y col. (1993) han descrito que los sueros de personas sanas también muestran reactividad con la Hsp70 de *T. cruzi*. Este estudio se realizó con la proteína completa en conformación no desnaturalizada, resultando que todos los sueros chagásicos y todos los sueros control de personas sanas fueron positivos en el ensayo ELISA. Es decir, los sueros de personas sanas presentaron anticuerpos frente a determinados epítopes conformacionales.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, hay un estudio de Amorim y col. (1996) en el que identifican un fragmento correspondiente a las tres cuartas partes carboxi-terminales de la Hsp70 de *L. braziliensis* (MHOM/BR/M2903) mediante un escrutinio en una genoteca de ADNc con sueros de pacientes infectados con LMC y LC. Estudiaron la antigenicidad de este fragmento dividiéndolo en dos subfragmentos recombinantes: una



región amino-terminal de 288 aminoácidos y una región carboxi-terminal de 225 aminoácidos. Esta última región mostró una fuerte reacción con los sueros de pacientes con LMC, mientras que en ambos casos la reacción con los sueros de pacientes con LC fue débil. No hubo reactividad con los sueros de pacientes chagásicos ni de individuos sanos pero si la hubo con sueros de pacientes con leishmaniasis visceral. No consideran a la Hsp70 de esta cepa de *L. braziliensis* como un marcador específico de enfermedad, sino que sólo proponen el subfragmento carboxi-terminal como útil en los estudios de agravamiento de la enfermedad en su evolución de LC a LMC. Sus resultados no pueden ser comparables a los obtenidos en el presente trabajo ya que el estudio no se realizó con la proteína completa; de todos modos, no se trata de la misma proteína, presentan un 93,7% de identidad por proceder de diferentes cepas, aunque la especie sea la misma.

La respuesta antigénica observada con la Hsp70 de *L. braziliensis* en el desarrollo de esta Tesis Doctoral fue similar a la de *L. donovani* pero, al contrario que ésta, no se la puede considerar como marcador específico de enfermedad debido a la existencia de una baja reacción cruzada con los sueros de pacientes afectados con Chagas crónico. Los sueros de pacientes chagásicos no reaccionan con la Hsp70 de *L. donovani* (MacFarlane y col., 1990, Wallace y col., 1992, De Andrade y col., 1992), mientras que los sueros de leishmaniasis visceral si reaccionan con la Hsp70 de *T. cruzi*. Según Krautz y col. (1998) un 100% de los pacientes con LV, debida a la infección por *L. donovani*, mostraron reacción cruzada con la Hsp70-citoplasmática de *T. cruzi*. Nafziger y col. (1991) determinaron que tras el escrutinio de una librería de ADNc de *T. cruzi* con un suero de un paciente con LV, la proteína más frecuentemente detectada fue la Hsp70.

Respecto a la Hsp70 de *T. cruzi*, Krautz y col. (1998) han realizado un estudio antigénico de las Hsp70 de este parásito, tanto de la citoplasmática, como mitocondrial y del reticulo endoplasmático o grp78. Postulan que la grp78 es el único antígeno Hsp70 con una utilidad potencial para la diagnosis de la infección con *T. cruzi* ya que es la más inmunogénica, con un 90% de sensibilidad, frente a un 78% de la forma citoplasmática, pero con un 13% de reacción cruzada con sueros de pacientes con leishmaniasis. Por este motivo propone la combinación de la grp78 con la proteína flagelar de unión al calcio de 24 kDa (FCaBP) de *T. cruzi*, incrementando la sensibilidad del diagnóstico de un 90% a un 97% aunque la reacción cruzada con sueros de pacientes con leishmaniasis sube de un 3% a un 8%, en comparación con FCaBP sola. En este trabajo, ninguno de los sueros control negativos mostró reactividad con las distintas Hsp70 de *T. cruzi*.

En esta controversia en algunos resultados de las Hsp70, hay que tener en cuenta que todos estos trabajos mencionados se han realizado utilizando diferentes regiones recombinantes de la proteína o bien la proteína recombinante completa, diferentes sueros y una metodología distinta. Independientemente de este hecho, es verdad que a pesar de la elevada conservación de secuencia de las Hsp70 de tripanosomátidos, existen diferencias entre ellas, sobre todo en las regiones carboxi-terminal, que podrían justificar una respuesta antigénica diferente según proceda la proteína de un parásito o de otro, aparte de que la respuesta humoral de los individuos afectados de leishmaniasis depende enormemente del tipo de leishmaniasis que sufra, que por otro lado es distinta de la respuesta humoral de los pacientes chagásicos.

La siguiente Tabla muestra de forma esquemática la antigenicidad de las Hsp70 de estos tripanosomátidos frente a sueros de pacientes afectados con distintos tipos de leishmaniasis, pacientes chagásicos, e individuos sanos.

Hsp70	Sueros LMC/LC	Sueros chagásicos	Sueros LV ( <i>L. donovani</i> )	Sueros LV ( <i>L. infantum</i> )	Sueros personas sanas
<i>L. braziliensis</i>	+	↓↓		-	-
<i>T. cruzi</i>	+	+	+	+	-/+
<i>L. infantum</i>	+	+	+	+	-
<i>L. donovani</i>	-	-	+		-/+

**Tabla 2.** Antigenicidad de las Hsp70 de *L. braziliensis*, *T. cruzi*, *L. infantum* y *L. donovani*.

Atendiendo al objetivo propuesto en esta Tesis Doctoral de identificar antígenos de *L. braziliensis* útiles para su diagnóstico, el estudio de antigenicidad de la proteína recombinante completa rLb70 de *L. braziliensis* mostró que es altamente reconocida por sueros de pacientes con LMC y LC (84%), pero presenta un 18,75% (3/16) de reacción cruzada sólo con los sueros de pacientes con Chagas crónico. Este resultado no validó a la Hsp70 de *L. braziliensis* como posible marcador específico de enfermedad. Por ello, fue necesario realizar el mapeo antigénico de la proteína con el fin de localizar las regiones donde recaen los epítopes antigénicos y determinar si alguno- o algunos- es específico de la patología producida por *L. braziliensis*.

### 3.4.3 Expresión y purificación de cinco fragmentos recombinantes de la Hsp70 de *L. braziliensis*.

#### a) Clonaje de cinco fragmentos de la Hsp70 en vectores de expresión.

El mapeo antigénico se realizó dividiendo la proteína en cinco fragmentos solapantes, de entre 117 y 167 aminoácidos, con los que se hicieron las correspondientes construcciones recombinantes en vectores de expresión de la serie pQE3X. Los cinco fragmentos solapan entre sí en seis aminoácidos (Fig. 4).

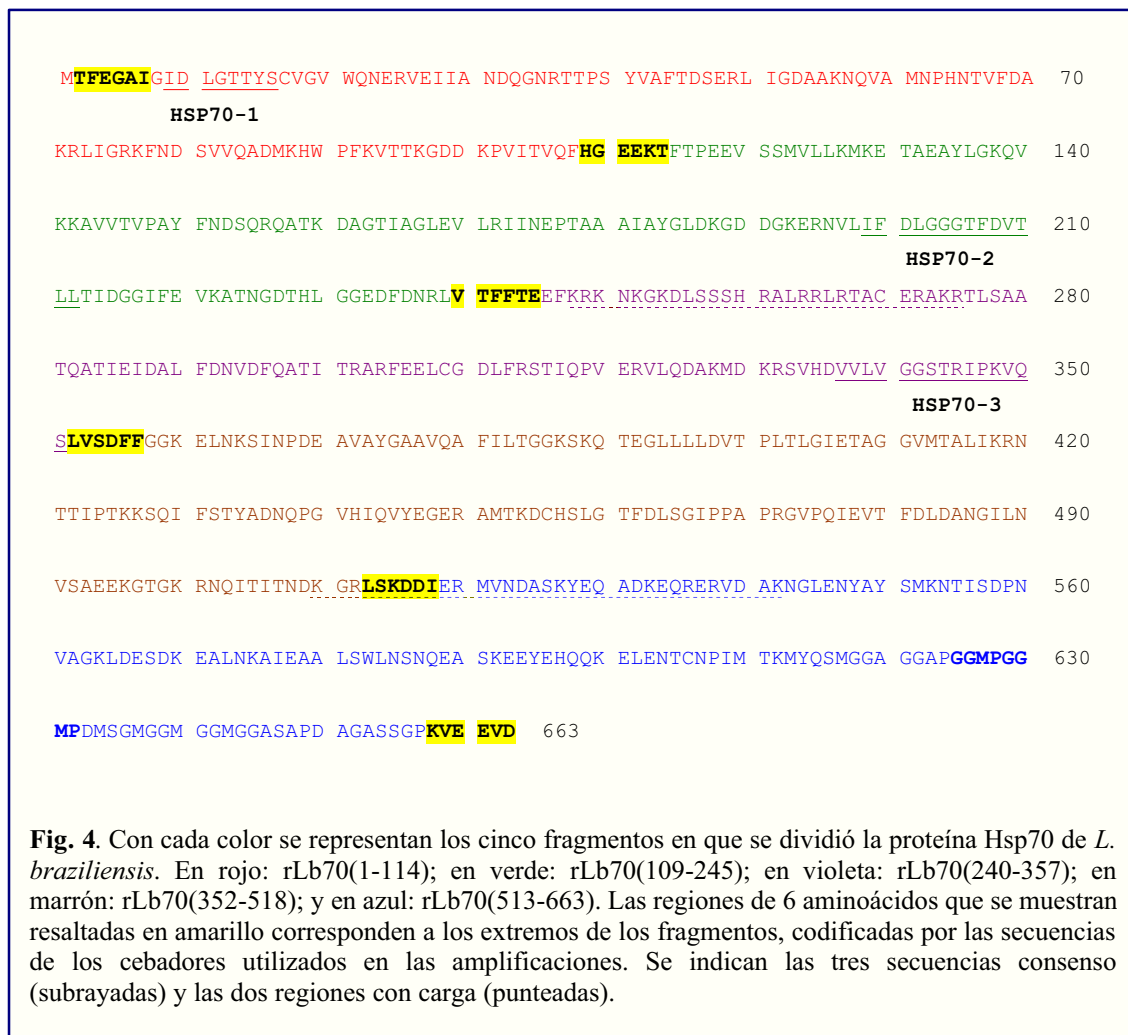
La estrategia de clonaje seguida fue la misma que para la región codificante completa del gen *HSP70*. Cada fragmento se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pBS/Lb70 con la pareja de cebadores *sense* y *antisense* descritos para cada caso en el apartado 2.8 de Materiales y Métodos. Cada pareja de cebadores fue diseñada con regiones *linker* en sus extremos 5' que contienen dianas de enzimas de restricción para facilitar el clonaje del fragmento amplificado en el vector de expresión. Las condiciones de amplificación empleadas fueron de un ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) de cada pareja de cebadores sin la región *linker*, y 1 minuto a 72°C; y de 20 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 69°C, y 1 minuto a 72°C; finalizando con una elongación de 10 minutos a 72°C. Al ser la  $T_m$  de todos los cebadores completos superior a la temperatura de elongación, se estableció en 69°C. Se utilizaron 20 pmoles de cada cebador y entre 20 y 50 ng de plásmido pBS/Lb70 como molde. En la siguiente Tabla se indican los tamaños de los fragmentos amplificados así como las  $T_m$ s empleadas en los ciclos de amplificación:

Fragmento recombinante	Tamaño (pb)	$T_m$ (10 ciclos)	$T_m$ (20 ciclos)
<b>rLb70(1-114)</b>	339	62°C	69°C
<b>rLb70(109-245)</b>	411	56°C	69°C
<b>rLb70(240-357)</b>	354	56°C	69°C
<b>rLb70(352-518)</b>	501	56°C	69°C
<b>rLb70(513-663)</b>	457	58°C	69°C

**Tabla 3.** Amplificación de los fragmentos recombinantes.

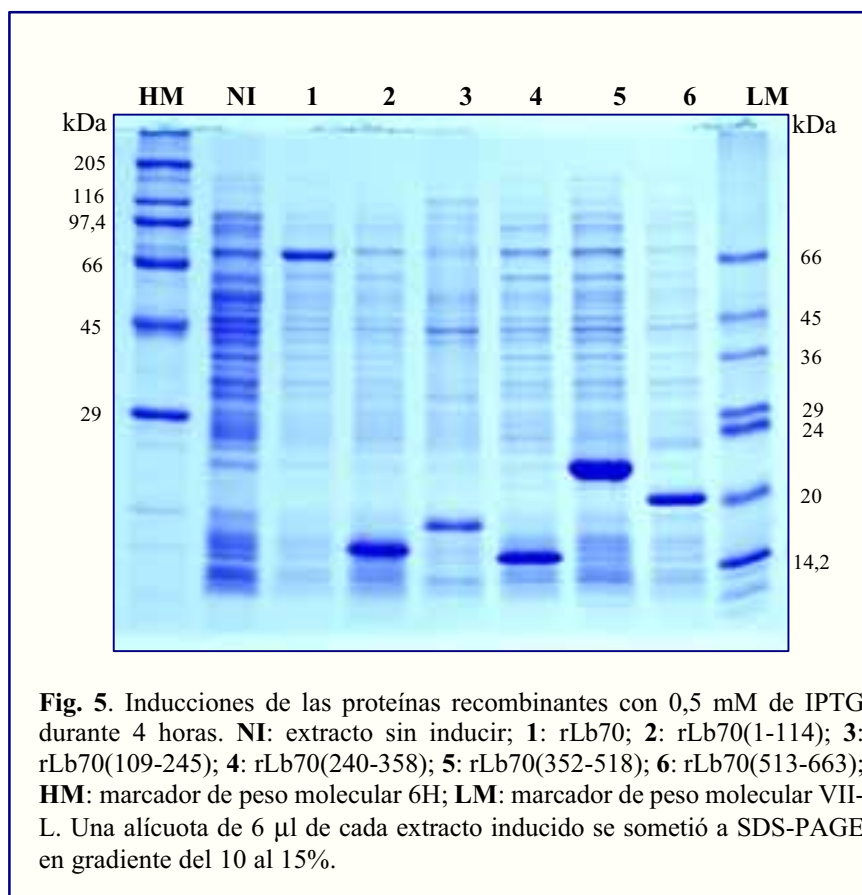
Los productos de amplificación se purificaron y clonaron como se describió para el fragmento completo rLb70. Se utilizó el vector pQE<sub>30</sub> que permitió la inserción en la pauta de lectura correcta, excepto en el caso del fragmento rLb70(513-663) que fue clonado en el vector pQE<sub>31</sub>. Las colonias de *E. coli* (XL-2 Blue) transformadas con la mezcla de ligación se chequearon digiriendo el ADN plasmídico con las enzimas utilizadas en cada clonaje. Se tomaron dos clones de cada construcción obtenida y se secuenciaron con los cebadores pQE-Type III y pQE-Reverse (Materiales y Métodos, 2.12). Todos los fragmentos estaban clonados en la pauta de lectura correcta, y las construcciones se denominaron: pQE/rLb70(1-114); pQE/rLb70(109-245); pQE/rLb70(240-357); pQE/rLb70(352-518) y pQE/rLb70(513-663).

En la Fig. 4 se muestran los cinco fragmentos en que se dividió la proteína Hsp70:



**b) Inducción de los fragmentos recombinantes de la Hsp70 de *L. braziliensis*.**

Se realizaron ensayos de inducción de los fragmentos recombinantes en *E. coli* (Topp 3) como se describió en Materiales y Métodos, 2.26.1. Todos se expresaron a muy altos niveles bajo condiciones de 0,5 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C. Concentraciones mayores del inductor no aumentaron la expresión. En la Fig. 5 se muestran los extractos inducidos y se puede observar la elevada expresión de los fragmentos recombinantes, disminuyendo considerablemente la expresión de las proteínas de *E. coli*.



**Fig. 5.** Inducciones de las proteínas recombinantes con 0,5 mM de IPTG durante 4 horas. NI: extracto sin inducir; 1: rLb70; 2: rLb70(1-114); 3: rLb70(109-245); 4: rLb70(240-358); 5: rLb70(352-518); 6: rLb70(513-663); HM: marcador de peso molecular 6H; LM: marcador de peso molecular VII-L. Una alícuota de 6 µl de cada extracto inducido se sometió a SDS-PAGE en gradiente del 10 al 15%.

En la Tabla 4 se muestran las principales características de cada fragmento recombinante: el número de aminoácidos que codifica cada uno, al que hay que añadirle el codón de iniciación, los aminoácidos R, G y S, la cola de hexahistidinas, donde RGS-HHHH constituye un epítipo del vector para la detección de la proteína expresada y, finalmente, los aminoácidos que vienen codificados por las propias dianas de restricción del *polylinker* del vector. Se indica también el peso molecular y el punto isoeléctrico

teórico según el análisis realizado con el programa “Gene-Runner”, así como los principales motivos que incluye cada uno.

Fragmento recombinante	N° aminoácidos que codifica	Peso molecular teórico	Punto isoelectrico teórico	Motivos
rLb70(1-114)	127 (113 + 14)	14,2 kDa	7,6	HSP70-1
rLb70(109-245)	151 (137 + 14)	16,3 kDa	5,5	HSP70-2
rLb70(240-357)	132 (118 + 14)	15 kDa	9,57	HSP70-3 NLS BP Carga +
rLb70(352-518)	181 (167 + 14)	19,4 kDa	7,08	
rLb70(513-663)	169 (152 + 17)	17,98 kDa	4,95	Carga +/- Repeticiones GGMP

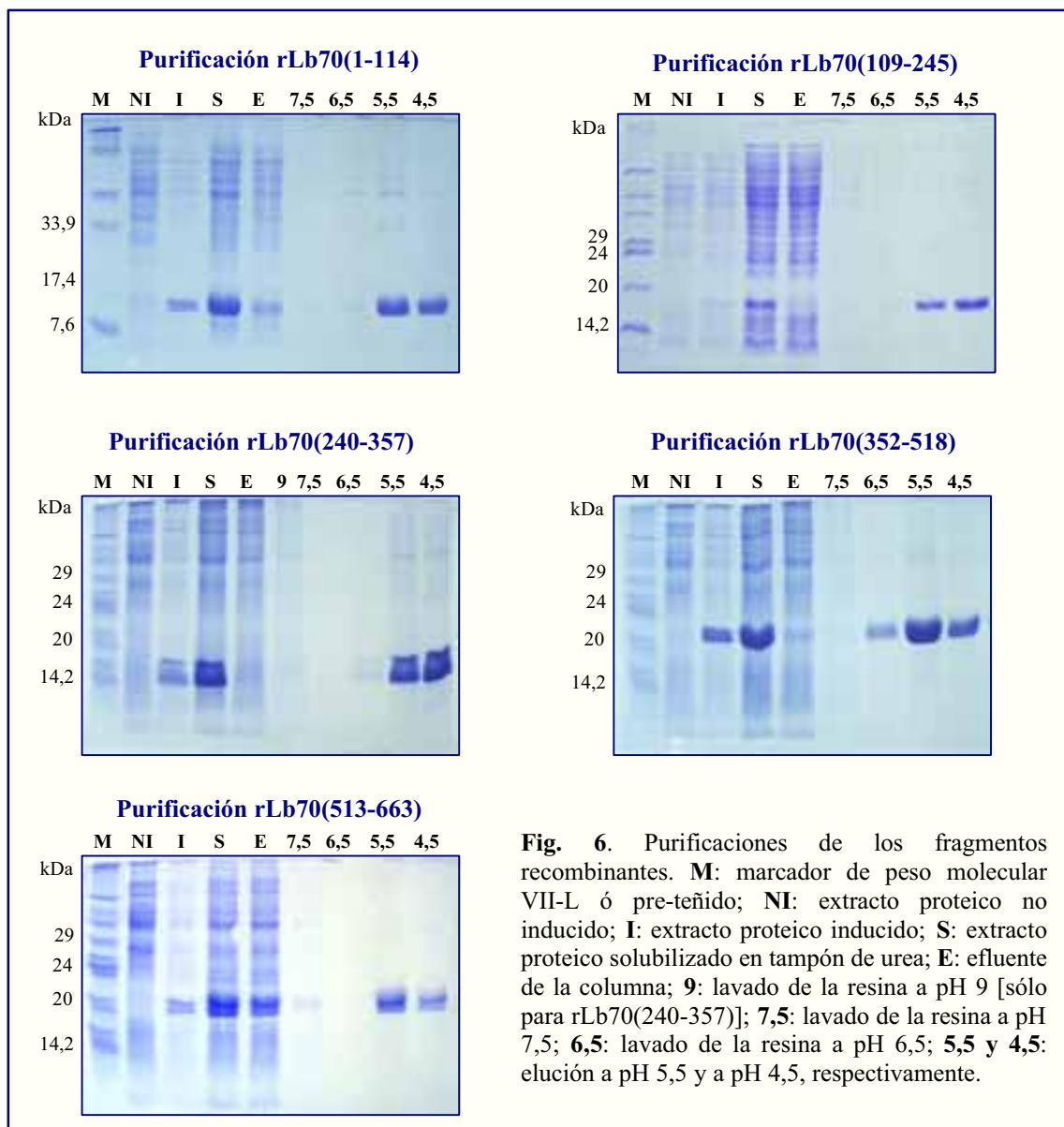
**Tabla 4.** Principales características de los fragmentos recombinantes de la Hsp70 de *L. braziliensis*.

### c) Solubilización y purificación de los fragmentos recombinantes de la Hsp70 de *L. braziliensis* en condiciones desnaturalizantes.

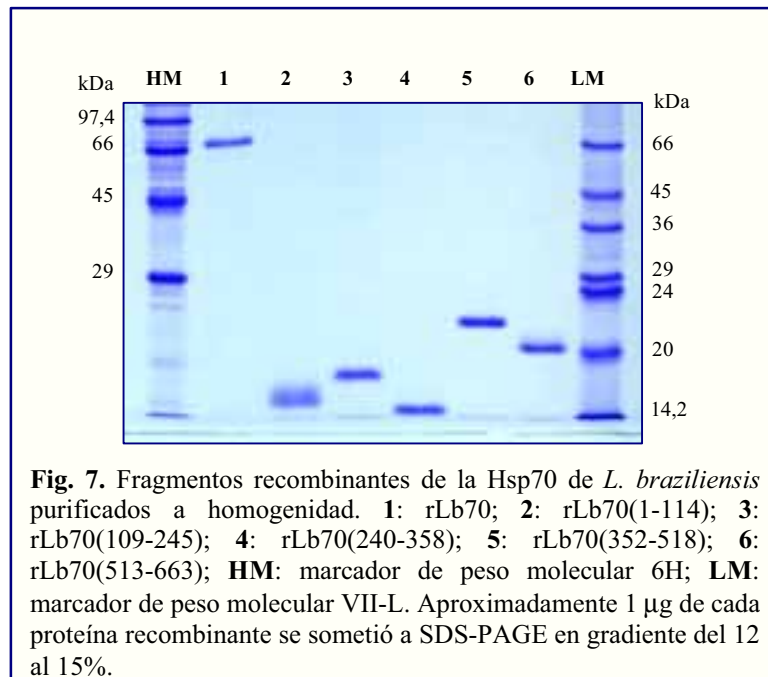
Todos los fragmentos recombinantes fueron solubilizados en condiciones desnaturalizantes (Materiales y Métodos, 2.26.2) resuspendiendo la masa bacteriana en tampón de urea 8M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, PMSF 1 mM, Tween-20 al 0,1 % (v/v), β-Mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10% (v/v), tampón que fue utilizado también en la solubilización de la proteína rLb70. El pH del tampón varió según el fragmento recombinante, utilizando un pH próximo al punto isoelectrico teórico de la proteína. rLb70(1-114) se solubilizó a pH 8; rLb70(240-357) a pH 9,5; rLb70(352-518) a pH 7 y rLb70(513-663) a pH 5,5. Sólo rLb70(109-245) fue solubilizada con tampón a pH 8, ya que a pH 5,5 se obtuvo peor resultado.

Las purificaciones mediante cromatografía de afinidad al Ni<sup>2+</sup> se realizaron según se describió en el apartado 2.26.4 de Materiales y Métodos. La resina de Ni-NTA agarosa, previamente equilibrada con el correspondiente tampón de solubilización, se unió al

fragmento solubilizado mediante agitación suave a 4°C, durante toda la noche. En el caso de rLb70(109-245) fue necesario añadir a la mezcla proteína-resina, así como a las soluciones de lavado a pH 7,5 y pH 6,5, imidazol 10 mM para evitar la co-purificación de otras proteínas de *E. coli*. La unión de las proteínas recombinantes a la resina de Ni<sup>2+</sup> fue casi completa excepto para rLb70(513-663), donde gran parte se quedó en el efluente de la columna, sin embargo, la elevada cantidad de proteína purificada no hizo necesario modificar las condiciones de unión a la resina. La elución de las proteínas recombinantes se produjo en todos los casos tanto a pH 5,5 como a pH 4,5, sólo rLb70(352-518) eluyó parcialmente a pH 6,5. El grado de pureza obtenido en todos los casos fue muy elevado. Las purificaciones de los fragmentos recombinantes se pueden observar en la Fig. 6.



Para obtener una pureza total, los fragmentos recombinantes fueron sometidos a SDS-PAGE al 12% de reticulación y electroeluidos a través de membranas de 3,5 kDa de punto de corte (2.23, Materiales y Métodos). El rendimiento final de las proteínas purificadas fue de aproximadamente 18 mg por litro de cultivo. Tras la electroelución las proteínas recombinantes quedaron purificadas a homogeneidad para ser testadas mediante ELISA (Fig. 7).



#### 3.4.4 Mapeo antigénico de la Hsp70 de *L. braziliensis*. Respuesta humoral frente a los fragmentos recombinantes.

Los cinco fragmentos recombinantes fueron analizados como antígenos mediante ELISA (2.27, Materiales y Métodos) y testados frente a los mismos sueros con los que se ensayó la proteína completa rLb70. Cada fragmento se diluyó a una concentración de 4 µg/ml en tampón carbonato y cada pocillo se sensibilizó con 100 µl (0,4 µg). Los sueros también se emplearon diluidos 1:100 en tampón PBS-Tween-20 al 0,05% (v/v). El punto de corte para la positividad se estableció como la media de todos los sueros control negativos más tres desviaciones estándar. Al ser el punto de corte, en todos los casos, menor que 0,1, se estableció este valor por exclusión. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



Los valores de D.O.<sub>450nm</sub> obtenidos para cada fragmento se muestran en las Tablas 5-9.

Los resultados del mapeo antigénico mostraron que la antigenicidad se localiza en la mitad carboxi-terminal de la proteína, donde el fragmento rLb70(513-663) fue el que mayor antigenicidad mostró. De los cinco fragmentos recombinantes solapados que se construyeron, los tres primeros, localizados en la primera mitad de la proteína, fueron muy poco antigénicos. rLb70(1-114) y rLb70(109-245) fueron reconocidos sólo por un 14% de los sueros de pacientes con LMC y LC, y rLb70(240-357) lo fue sólo por un 10%, pero correspondiente únicamente a sueros con LMC. Con el siguiente fragmento como antígeno, rLb70(352-518), el reconocimiento de los sueros de pacientes con LMC y LC aumentó a un 38% y, por último, el fragmento carboxi-terminal mostró un 70% de positividad para estos sueros.

Respecto a la reactividad con los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral o con Chagas, el fragmento rLb70(352-518) fue el único que presentó epítomos antigénicos que produjeron reacción cruzada, tanto con sueros de pacientes chagásicos (6,25%, 1/16), como con LV (33,3%, 1/3), aunque la intensidad de este reconocimiento fue mucho menor que la obtenida con los sueros con LMC y LC. Al realizar el estudio de identidad de este fragmento con el equivalente en *T. cruzi* y en *L. infantum* (LALING, Myers y Miller, 1988), se obtuvo que fue el que mayor homología presentó en ambos casos, con un 92,2% y un 97,6%, respectivamente. Ninguno de los antígenos recombinantes mostró reactividad con los 20 sueros control negativos utilizados, ni de Perú, ni de Santa Cruz de Tenerife.

Los mejores resultados, por tanto, se obtuvieron con el fragmento recombinante carboxi terminal rLb70(513-663). En esta región se localizan los 10 aminoácidos de más que tiene la Hsp70 de *L. braziliensis* respecto a la de *L. infantum* y de *L. donovani*, y los 9 aminoácidos extra respecto al fragmento de la Hsp70 de *L. braziliensis* obtenido por Amorim y col. (1996), como se puede observar en la Fig. 9 del capítulo 3 de Resultados y Discusión. El fragmento rLb70(513-663) fue el que menor porcentaje de identidad mostró frente al equivalente de *T. cruzi*, *L. infantum* y de la Hsc70 humana, siendo de un 62,5%, 74,2% y 52,3%, respectivamente. Esta alta variabilidad del extremo carboxi-terminal se manifiesta incluso entre distintas cepas de la misma especie, siendo el porcentaje de identidad respecto al fragmento equivalente de la cepa brasileña de un 82,8%. Esto, junto con el hecho de que fuese en esta región donde se localizaron la mayor parte de los epítomos antigénicos lineales, quedó reflejado en los datos obtenidos por ELISA, que

mostraron, como se ha dicho, un reconocimiento de un 70% de los sueros con LMC y LC y un 0% de reconocimiento por sueros de enfermos de Chagas crónico, de leishmaniasis visceral, y por supuesto de personas sanas.

Comparando la antigenicidad de las dos cepas de *L. braziliensis*, la de Perú obtenida en este trabajo y la de Brasil obtenida por Amorim y col. (1996), los resultados obtenidos fueron distintos. Como ya se comentó, la construcción carboxi-terminal obtenida por este autor, denominada 133P-C, mostró una elevada reacción cruzada con los sueros de pacientes con LV (67%). Hay una divergencia en la secuencia de ambas proteínas que justifica esta diferencia pero, además, este fragmento contiene 84 aminoácidos de más respecto a rLb70(513-663), que nosotros incluimos en la región adyacente rLb70(352-518), donde se localizaron los epítopes de reacción cruzada.

En la Tabla 10 se señalan los porcentajes de identidad de los cinco fragmentos en que se dividió la Hsp70 de *L. braziliensis* con los fragmentos equivalentes de *T. cruzi*, *L. infantum* y de la Hsc70 humana. Como se puede observar, como regla general la identidad entre los fragmentos es mayor que entre las proteínas completas, excepto entre los fragmentos carboxi-terminales, donde disminuye alrededor de un 20%.

	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	Humana
<b>rLb70</b>	<b>85%</b>	<b>91%</b>	<b>71,5%</b>
<b>rLb70(1-114)</b>	92,1%	94,7%	72,8%
<b>rLb70(109-245)</b>	92,0%	97,1%	<b>81,8%</b>
<b>rLb70(240-357)</b>	88,1%	93,2%	66,9%
<b>rLb70(352-518)</b>	<b>92,2%</b>	<b>97,6%</b>	80,8%
<b>rLb70(513-663)</b>	<b>62,5%</b>	<b>74,2%</b>	<b>52,3%</b>

**Tabla 10.** Porcentajes de identidad de los fragmentos solapantes de la Hsp70 de *L. braziliensis* respecto a los equivalentes de las Hsp70 de *T. cruzi* (X07083), *L. infantum* (Y08020) y la Hsc70 humana (Y00371) (LALING, Myers y Miller, 1988). En verde se indican los porcentajes de identidad más elevados y en rojo los menos.

## Antigenicidad rLb70(1-114)

Sueros LMC	D.O. <sub>.450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>.450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>.450nm</sub>	Sueros control-	D.O. <sub>.450nm</sub>
LM 015	0,048	LM 017	0,0035	Try 1	0,0365	B 01	-0,0015
LM 033	-0,003	LM 071	0,0005	Try 4	-0,0035	B 02	-0,007
LM 036	0,022	LM 092	-0,004	Try 7	0,002	B 03	0,011
LM 043	0,001	LR 385	0,011	Try 8	-0,007	B 04	-0,001
LM 119	0,269	LR 449	-0,0025	Try 10	0,0045	B 05	-0,0015
LR 470	-0,002	LR 474	0,0015	Try 12	-0,003	B 06	0,002
LR 482	0,0035	LR 493	-0,003	Try 14	-0,003	B 07	-0,0065
LR 517	-0,0055	LR 494	0,105	Try 15	-0,0055	B 08	-0,008
LR 536	0,113	LR497	0,013	Try 16	0,004	B 09	0,015
LR 538	0,3095	LR 502	0,007	Try 19	-0,007	B 10	0,0245
LR 618	0,032	LR 511	-0,002	Try 20	-0,0045	S/C 1	-0,022
LR 626	0,038	LR 515	0,008	Try 21	-0,007	S/C 2	-0,018
LR 628	0,018	LR 537	0,005	Try 22	-0,001	S/C 3	-0,025
LR 629	-0,008	LR 539	0,0095	Try 26	-0,003	S/C 4	-0,026
LR 630	0,0315	LR 560	0,005	Try 28	0,0125	S/C 5	-0,022
LR 631	0,1835	LR 572	0,0025	C+Tryp	0,006	S/C 6	-0,025
LR 654	0,033	LR 576	0,029			S/C 7	-0,016
LR 661	0,2605	LR 591	0,4	HL 42	-0,0075	S/C 8	-0,023
LR 667	0,008	LR 594	-0,0075	HL77	0,0185	S/C 9	-0,003
LR 676	-0,003	LR 620	-0,012	JK 1	-0,001	S/C 10	0,048
		LR 622	0,003				
		LR 625	0,051			Promedio	-0,00525
		LR 632	0,008			Desv. est	0,019023
		LR 641	0,0535			Prom+ 3 Des	0,05182
		LR 643	0,003			Pto. corte	0,1
		LR 647	0,002				
		LR 651	0,011				
		LR 652	0,021				
		LR 656	0,013				
		LR 692	0,0015				

**Tabla 5.** D.O.<sub>.450nm</sub> por ELISA de rLb70(1-114). Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>.450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

## Antigenicidad rLb70(109-245)

Sueros LMC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros control-	D.O. <sub>450nm</sub>
LM 015	0,344	LM 017	0,0245	Try 1	0,011	B 01	0,011
LM 033	0,026	LM 071	0,012	Try 4	0,022	B 02	0,018
LM 036	0,07	LM 092	0,019	Try 7	0,0235	B 03	0,031
LM 043	0,005	LR 385	0,02	Try 8	0,0175	B 04	0,006
LM 119	0,1965	LR 449	0,023	Try 10	0,0135	B 05	0,033
LR 470	0,024	LR 474	0,02	Try 12	0,0195	B 06	0,042
LR 482	0,021	LR 493	0,012	Try 14	0,03	B 07	0,03
LR 517	0,028	LR 494	0,035	Try 15	0,0115	B 08	0,015
LR 536	0,1085	LR497	0,032	Try 16	0,0295	B 09	0,036
LR 538	0,1285	LR 502	0,026	Try 19	0,0125	B 10	0,022
LR 618	0,3235	LR 511	0,022	Try 20	0,008	S/C 1	0,022
LR 626	0,075	LR 515	0,034	Try 21	0,013	S/C 2	0,023
LR 628	0,0375	LR 537	0,073	Try 22	0,0265	S/C 3	0,018
LR 629	0,0135	LR 539	0,0215	Try 26	0,022	S/C 4	0,055
LR 630	0,0485	LR 560	0,0335	Try 28	0,0305	S/C 5	0,008
LR 631	0,067	LR 572	0,03	C+Tryp	0,027	S/C 6	0,021
LR 654	0,015	LR 576	0,031			S/C 7	0,081
LR 661	0,7825	LR 591	0,049	HL 42	0,011	S/C 8	0,032
LR 667	0,0255	LR 594	0,0105	HL77	0,0295	S/C 9	0,042
LR 676	0,037	LR 620	0,0265	JK 1	0,015	S/C 10	0,039
		LR 622	0,0255				
		LR 625	0,0365			Promedio	0,02925
		LR 632	0,046			Desv. est	0,017511
		LR 641	0,188			Prom+ 3 Des	0,081782
		LR 643	0,0135			Pto. corte	0,1
		LR 647	0,087				
		LR 651	0,023				
		LR 652	0,0265				
		LR 656	0,016				
		LR 692	0,0375				

**Tabla 6.** D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA de rLb70(109-245). Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

## Antigenicidad rLb70(240-357)

Sueros LMC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros control-	D.O. <sub>450nm</sub>
LM 015	0,0132	LM 017	0,0057	Try 1	0,0017	B 01	0,0034
LM 033	0,0072	LM 071	0,0032	Try 4	0,0032	B 02	0,0034
LM 036	0,0362	LM 092	0,0012	Try 7	0,0017	B 03	0,0054
LM 043	-0,0008	LR 385	0,014	Try 8	0,0017	B 04	0,0014
LM 119	0,0007	LR 449	0,014	Try 10	0,0067	B 05	-0,0026
LR 470	0,005	LR 474	0,0072	Try 12	0,0012	B 06	0,0384
LR 482	0,0162	LR 493	0,031	Try 14	0,0052	B 07	0,0454
LR 517	0,0307	LR 494	0,018	Try 15	0,0027	B 08	0,0214
LR 536	0,1192	LR 497	0,0107	Try 16	0,0067	B 09	0,0224
LR 538	0,4902	LR 502	0,009	Try 19	0,0007	B 10	0,0054
LR 618	-0,0038	LR 511	0,0127	Try 20	-0,0023	S/C 1	0,0024
LR 626	0,1227	LR 515	0,0227	Try 21	0,0022	S/C 2	0,0024
LR 628	0,3087	LR 537	0,0052	Try 22	0,0067	S/C 3	-0,0036
LR 629	0,1297	LR 539	0,0067	Try 26	0,0082	S/C 4	-0,0016
LR 630	0,0382	LR 560	0,0157	Try 28	0,0137	S/C 5	-0,0016
LR 631	0,0317	LR 572	0,0677	C+Tryp	0,0057	S/C 6	0,0084
LR 654	0,0037	LR 576	0,012			S/C 7	0,0094
LR 661	0,0407	LR 591	0,021	HL 42	0,0007	S/C 8	0,0024
LR 667	0,0102	LR 594	0,0117	HL77	0,0117	S/C 9	0,0234
LR 676	0,0112	LR 620	0,0157	JK 1	0,0077	S/C 10	0,0094
		LR 622	0,0127				
		LR 625	0,0032			Promedio	0,00975
		LR 632	0,0237			Desv. est	0,013601
		LR 641	0,0052			Prom+ 3 Des	0,050552
		LR 643	0,0107			Pto. de corte	0,1
		LR 647	0,0087				
		LR 651	0,0332				
		LR 652	0,0102				
		LR 656	0,0057				
		LR 692	0,0272				

**Tabla 7.** D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA de rLb70(240-357). Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

## Antigenicidad rLb70(352-518)

Sueros LMC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros control -	D.O. <sub>450nm</sub>
LM 015	0,8398	LM 017	0,0588	Try 1	0,141467	B 01	0,034133
LM 033	0,0978	LM 071	0,0558	Try 4	0,0658	B 02	0,072467
LM 036	0,080133333	LM 092	0,0208	Try 7	0,043467	B 03	0,082133
LM 043	0,0758	LR 385	0,0952	Try 8	0,049467	B 04	0,0638
LM 119	0,240133333	LR 449	0,0477	Try 10	0,033133	B 05	0,041467
LR 470	0,0672	LR 474	0,070133	Try 12	0,0458	B 06	0,041467
LR 482	0,082466667	LR 493	0,0227	Try 14	0,0938	B 07	0,059133
LR 517	0,1218	LR 494	0,2117	Try 15	0,030133	B 08	0,032467
LR 536	0,3938	LR497	0,075467	Try 16	0,095467	B 09	0,046133
LR 538	0,705133333	LR 502	0,0902	Try 19	0,041467	B 10	0,052467
LR 618	0,458133333	LR 511	0,0452	Try 20	0,026467	S/C 1	0,0478
LR 626	0,240466667	LR 515	0,047467	Try 21	0,015133	S/C 2	0,041133
LR 628	0,663133333	LR 537	0,2308	Try 22	0,0278	S/C 3	0,011133
LR 629	0,017466667	LR 539	0,0258	Try 26	0,062133	S/C 4	0,016467
LR 630	0,163133333	LR 560	0,0537	Try 28	0,0338	S/C 5	0,0148
LR 631	0,1908	LR 572	0,0497	C+Tryp	0,069467	S/C 6	0,041467
LR 654	0,056133333	LR 576	0,0712			S/C 7	0,037133
LR 661	0,0708	LR 591	0,1107	HL 42	0,014467	S/C 8	0,024467
LR 667	0,090133333	LR 594	0,1597	HL77	0,037133	S/C 9	0,013467
LR 676	0,0808	LR 620	0,079467	JK 1	0,1458	S/C 10	0,0298
		LR 622	0,0958				
		LR 625	0,156133			Promedio	0,040167
		LR 632	0,2158			Desv. est	0,019458
		LR 641	0,316133			Prom+ 3 Des	0,098541
		LR 643	0,0948			Pto. de corte	0,1
		LR 647	0,573467				
		LR 651	0,0678				
		LR 652	0,047467				
		LR 656	0,0578				
		LR 692	0,130133				

**Tabla 8.** D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA de rLb70(352-518). Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

## Antigenicidad rLb70(513-663)

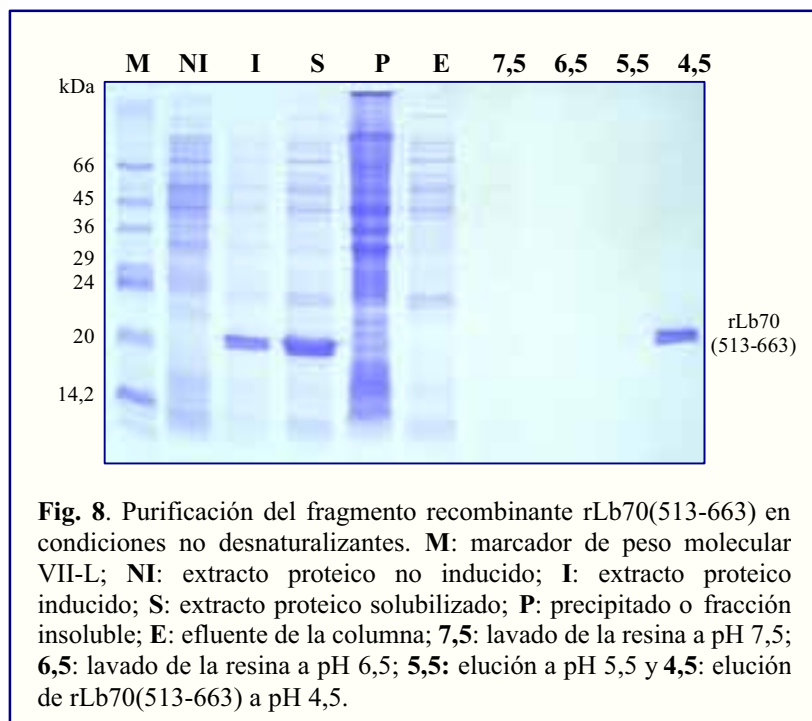
Sueros LMC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros control -	D.O. <sub>450nm</sub>
LM 015	0,672333333	LM 017	0,060333	Try 1	0,073	B 01	0,015
LM 033	0,073666667	LM 071	0,156667	Try 4	0,012	B 02	0,009
LM 036	0,047666667	LM 092	0,152333	Try 7	0,053667	B 03	0,011667
LM 043	0,012	LR 385	0,6565	Try 8	0,025	B 04	0,011333
LM 119	0,028333333	LR 449	0,068	Try 10	0,010333	B 05	0,012
LR 470	0,0455	LR 474	0,116	Try 12	0,006667	B 06	0,012
LR 482	0,199666667	LR 493	0,2035	Try 14	0,048333	B 07	0,019667
LR 517	0,799666667	LR 494	0,108	Try 15	0,011	B 08	0,012333
LR 536	0,699666667	LR497	0,104667	Try 16	0,017333	B 09	0,010333
LR 538	0,73	LR 502	0,017	Try 19	0,009	B 10	0,01
LR 618	0,237333333	LR 511	0,0685	Try 20	0,007667	S/C 1	0,0105
LR 626	0,389	LR 515	0,105	Try 21	0,014333	S/C 2	0,0115
LR 628	0,734	LR 537	0,242333	Try 22	0,017	S/C 3	-0,0005
LR 629	0,102333333	LR 539	0,036667	Try 26	0,005667	S/C 4	-0,002
LR 630	0,395333333	LR 560	0,039	Try 28	0,015	S/C 5	0,0015
LR 631	0,448666667	LR 572	0,305	C+Tryp	0,01	S/C 6	0,001
LR 654	0,228666667	LR 576	0,2925			S/C 7	0,008
LR 661	0,564	LR 591	0,2695	HL 42	0,006333	S/C 8	0,007
LR 667	0,030666667	LR 594	0,3595	HL77	0,012667	S/C 9	0,0035
LR 676	0,036333333	LR 620	0,022	JK 1	0,018	S/C 10	0,0085
		LR 622	0,132				
		LR 625	0,150667			Promedio	0,011017
		LR 632	0,074333			Desv. est	0,004823
		LR 641	0,139333			Prom+ 3 Des	0,025486
		LR 643	0,101			Pto. de corte	0,1
		LR 647	0,274				
		LR 651	0,127333				
		LR 652	0,170333				
		LR 656	0,182667				
		LR 692	0,237667				

**Tabla 9.** D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA de rLb70(513-663). Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

### 3.4.5 Solubilización, purificación y respuesta humoral del fragmento recombinante rLb70(513-663) en condiciones no desnaturizantes.

Pretendiendo aumentar más la sensibilidad del fragmento rLb70(513-663), éste se solubilizó y purificó en condiciones no desnaturizantes para estudiar la respuesta humoral hacia sus determinantes conformacionales.

La inducción del cultivo se realizó en las condiciones ya establecidas: 0,5 mM de IPTG durante 4 horas. La solubilización se realizó en una solución de lisis de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 0,3 M, imidazol 10 mM, Tween-20 al 0,1% (v/v), PMSF 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y glicerol al 10% (v/v), pH 8. Se adicionó  $\text{MgCl}_2$ , puesto que estabiliza la conformación de la proteína nativa, y glicerol, que es un agente estabilizante que previene las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y por tanto la co-purificación de proteínas contaminantes. También se añadió un pequeño porcentaje de detergente no iónico, como es el Tween-20, que evita la formación de agregados favoreciendo la solubilización. Tanto la solubilización como la purificación se realizaron según se describió en Materiales y Métodos, apartados 2.26.3 y 2.26.4 (Fig. 8).



Bajo las condiciones de solubilización utilizadas la proteína recombinante se encuentra por completo en la fracción soluble. La unión a la resina fue total ya que no se



detectó en el efluente de la columna, donde se eliminaron gran parte de las proteínas de *E. coli*. La elución de rLb70(513-663) se produjo en la fracción de pH 4,5. El rendimiento de la purificación, de elevada pureza, fue de 7,6 mg por litro de cultivo, aproximadamente.

Para el ensayo de ELISA se repitieron las mismas condiciones utilizadas con el fragmento en conformación desnaturalizada: 400 ng de proteína por pocillo y una dilución de los sueros de 1:100. Los valores de D.O.<sub>450nm</sub> del ensayo se muestran en la Tabla 11.

Los resultados obtenidos mostraron que el reconocimiento de los sueros de pacientes con LMC y LC disminuyó a un 28%, aunque se mantuvo la especificidad. Los determinantes conformacionales que hay dentro de esta región de la proteína están en menor número que los determinantes lineales y, además, no son complementarios: los sueros que resultaron positivos con el fragmento recombinante purificado en condiciones no desnaturalizantes también lo fueron frente al fragmento purificado en condiciones desnaturalizantes. También hay que considerar que la conformación adoptada por esta proteína procedente del extremo carboxi-terminal puede no ser la misma que la que tiene esta región en el contexto de la proteína completa.

## Antigenicidad rLb70(513-663) - no desnaturalizado

Sueros LMC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros LC	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros Chagas/LV	D.O. <sub>450nm</sub>	Sueros control -	D.O. <sub>450nm</sub>
LM 015	0,145	LM 017	0,029	Try 1	0,0325	B 01	0,013
LM 033	0,037	LM 071	0,046	Try 4	0,01	B 02	0,01
LM 036	0,047	LM 092	0,097	Try 7	0,023	B 03	0,012
LM 043	0,01	LR 385	0,091	Try 8	0,023	B 04	0,022
LM 119	0,017	LR 449	0,0855	Try 10	0,0145	B 05	0,039
LR 470	0,028	LR 474	0,032	Try 12	0,0185	B 06	0,02
LR 482	0,113	LR 493	0,0505	Try 14	0,0195	B 07	0,029
LR 517	0,2215	LR 494	0,04	Try 15	0,0315	B 08	0,019
LR 536	0,399	LR497	0,0695	Try 16	0,028	B 09	0,043
LR 538	0,0905	LR 502	0,018	Try 19	0,0075	B 10	0,01
LR 618	0,0455	LR 511	0,039	Try 20	0,01	S/C 1	0,026
LR 626	0,175	LR 515	0,047	Try 21	0,011	S/C 2	0,035
LR 628	0,4155	LR 537	0,093	Try 22	0,012	S/C 3	0,011
LR 629	0,028	LR 539	0,0305	Try 26	0,0095	S/C 4	0,013
LR 630	0,2015	LR 560	0,0225	Try 28	0,02	S/C 5	0,078
LR 631	0,142	LR 572	0,0885	C+Tryp	0,0225	S/C 6	0,072
LR 654	0,0655	LR 576	0,0815			S/C 7	0,025
LR 661	0,189	LR 591	0,1265	HL 42	0,0205	S/C 8	0,045
LR 667	0,0265	LR 594	0,2125	HL77	0,023	S/C 9	0,034
LR 676	0,0385	LR 620	0,0125	JK 1	0,0555	S/C 10	0,029
		LR 622	0,0455				
		LR 625	0,034			Promedio	0,02925
		LR 632	0,049			Desv. est	0,019145
		LR 641	0,0595			Prom+ 3 Des	0,086684
		LR 643	0,05			Pto. de corte	0,1
		LR 647	0,056				
		LR 651	0,1195				
		LR 652	0,0635				
		LR 656	0,1195				
		LR 692	0,2595				

**Tabla 11.** D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA de rLb70(513-663) no desnaturalizado. Los diferentes tipos de sueros se han distribuido por columnas. Los códigos LR y LM corresponden a sueros de pacientes con LMC/LC causada por *L. braziliensis*; los códigos Try corresponden a sueros de pacientes chagásicos; los sueros HL-42, HL-77 y JK-1 corresponden a sueros de pacientes con LV; los códigos B y S/C corresponden a peruanos y a personas de la provincia de S/C de Tenerife, respectivamente, sin contacto con la enfermedad. Se consideraron positivos aquellos sueros con valores de D.O.<sub>450nm</sub> igual o superior al punto de corte 0,1. En rojo se indican los sueros considerados positivos.

### 3.4.6 Hsp70 y autoinmunidad.

Como ya se ha comentado, las proteínas de choque térmico, y generalmente las Hsp70, están entre los antígenos dominantes reconocidos por el sistema inmune en un gran espectro de parásitos. Aunque el sistema inmune del hospedador es capaz de discriminar entre su propia Hsp70 y la del invasor, se ha encontrado que en un sistema inmune dañado las Hsps pueden causar enfermedades autoinmunes en humanos. Debido a su elevada conservación, la frecuente exposición hacia las Hsps de organismos de baja virulencia podría llevar a la pérdida de tolerancia del sistema inmune (Kaufmann, 1990, Cohen, 1991).

Para analizar si los sueros de los pacientes con LMC y LC que se habían utilizado padecían alguna enfermedad autoinmune se empleó un sistema comercial que detecta autoanticuerpos en suero humano, como es el INNO-LIA ANA de Innogenetics (Materiales y Métodos, 2.28). Según las condiciones del fabricante, ninguno de los sueros fue positivo, es decir, ninguno de ellos presentó anticuerpos contra los antígenos nucleares y citoplasmáticos ensayados y que se consideran marcadores del padecimiento de determinadas enfermedades autoinmunes, como conectivopatías o Lupus Eritematoso Sistémico.

El hecho de que los enfermos de LMC y LC no presentaran autoanticuerpos parece indicar que la parasitación por *L. braziliensis* no induce fenómenos de autoinmunidad. Además, son varios los autores que no han encontrado que la Hsp70 de *L. braziliensis*, en concreto, induzca autoanticuerpos. Así, Skeiky y col. (1995) observaron que el fragmento recombinante de la Hsp70 de *L. braziliensis*, que carecía de los primeros 131 residuos, estimulaba la proliferación de las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) de pacientes con LMC pero no de personas que se habían curado; por otro lado, las PBMC de pacientes con LMC no eran estimuladas por la Hsp70 recombinante humana. De este modo, sugieren que la elevada respuesta de las PBMC de los pacientes con LMC no implica un fenómeno de autoinmunidad puesto que no hay reacción cruzada con la propia Hsp70. Tampoco se ha descrito la inducción de autoanticuerpos anti-Hsp70 durante la infección con *L. infantum* en la LV canina (Quijada y col., 1996<sup>b</sup>). Parece ser que la respuesta inmune desarrollada durante la infección con *Leishmania* se dirige contra epítopes específicos de la Hsp70 del parásito. Del mismo modo, se ha descrito que durante la infección con *T. cruzi* la Hsp70 del parásito no está implicada en los procesos

autoinmunes que se postulan como causantes de la enfermedad de Chagas en su fase crónica (Engman y col., 1990, Requena y col., 1993).

Por otro lado, en gran número de enfermedades autoinmunes se ha encontrado una respuesta inmune humoral hacia las propias Hsps (Kaufmann y Schoel, 1994). Se ha descrito la presencia de anticuerpos anti-Hsp70 en esclerosis múltiple (Birnbaum y Kotilinek, 1993), colitis ulcerativa y enfermedad de Lyme (Jarjour y col., 1991). Por este motivo se determinó si los sueros de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes poseen autoanticuerpos que muestren reacción cruzada con la Hsp70 de *L. braziliensis*, o con alguno de los cinco fragmentos recombinantes. Mediante ELISA se testaron 22 sueros de pacientes diagnosticados con diversas enfermedades autoinmunes. Todos presentaban anticuerpos antinucleares (ANA+), asociados con conectivopatías, aparte de otros autoanticuerpos según cada paciente (detallados en el anexo de la Tesis). Los ensayos se realizaron por duplicado en las mismas condiciones de concentración de antígeno y dilución de suero que las utilizadas en los ensayos anteriores. De los 22 sueros, el 1 y el 10, mostraron anticuerpos frente a rLb70(109-245), rLb70(352-518) y rLb70(513-663), mientras que el suero 11 reaccionó con la proteína completa rLb70. Los sueros 1 y 10 no reaccionaron con rLb70(513-663) en su forma no desnaturalizada (Tabla 12).

El suero 11 corresponde a un paciente con el síndrome de Goodpasture. Es el único suero con este desorden, y fue el único que reconoció a la Hsp70 recombinante de *L. braziliensis*. Los sueros 1 y 10 corresponden a pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Dado que las proteínas de choque térmico Hsp90 y Hsp70-inducible (y no la constitutiva) se sobre-expresan en las PBMC de los pacientes con LES (Twomey y col., 1992, Dhillon y col., 1993), una expresión aberrante de estas proteínas podría contribuir a la formación de autoanticuerpos. Son varios los estudios que han descrito la presencia de autoanticuerpos frente a la Hsp70 en casos de LES (Minota y col., 1988, Ghoreishi y col., 1993, Conroy y col., 1996). Quizás la positividad de los sueros 1 y 10 se deba a una reacción cruzada entre estos autoanticuerpos y los fragmentos de la Hsp70 de *L. braziliensis*. En el caso de rLb70(109-245) y rLb70(352-518) el reconocimiento podría explicarse porque presentan un elevado porcentaje de identidad con los equivalentes en la Hsc70 humana (81,8% y 80,8%, respectivamente) (Ver Tabla 10). Sin embargo, el fragmento carboxi-terminal rLb70(513-663) presenta un porcentaje de identidad bajo, del 52,3%, que no podría explicar esta reacción cruzada y, además, curiosamente en conformación no desnaturalizada no hubo reconocimiento. En este fragmento debe existir

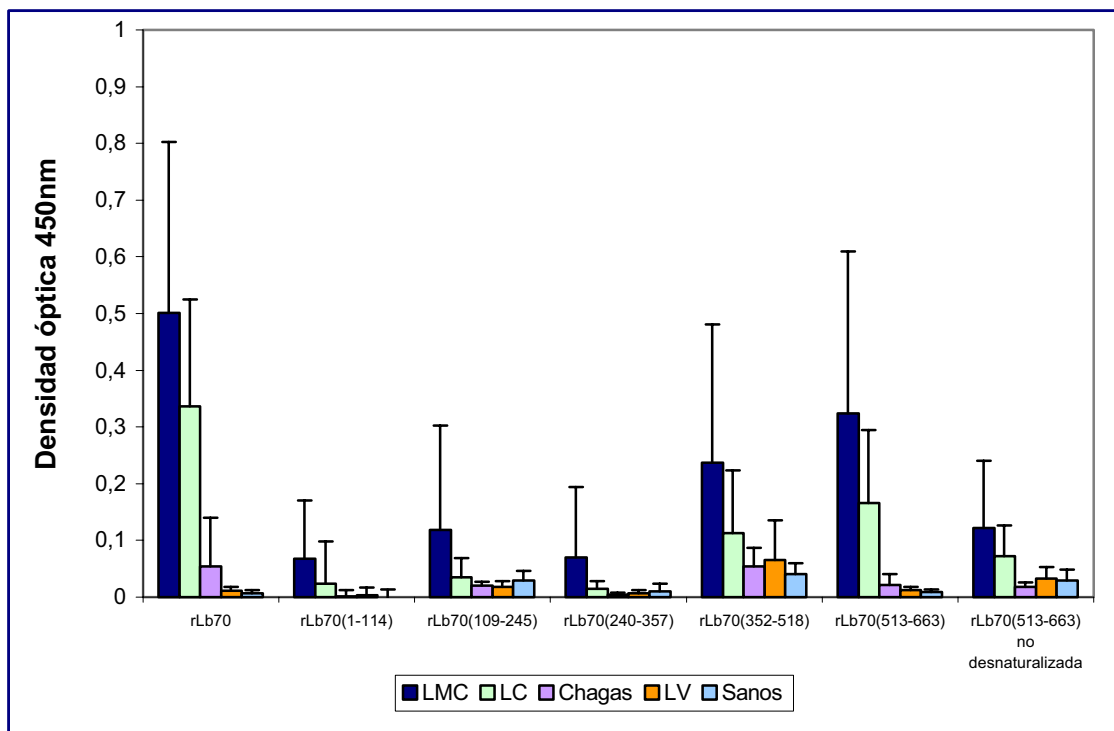
algún determinante lineal que sea reconocido por los autoanticuerpos anti-Hsp70 presentes en algunas personas con desórdenes de autoinmunidad, ya que las personas sanas no mostraron ningún reconocimiento.

Sueros autoinmunidad	rLb70	rLb70 (1-114)	rLb70 (109-245)	rLb70 (240-357)	rLb70 (352-518)	rLb70 (513-663)	rLb70(513-663) no desnaturalizada
1	0,086	0,0255	0,113	0,0365	0,222	0,2265	0,014
2	0,0255	0,013	0,0245	0,0205	0,0525	0,0155	0,007
3	0,025	0,01	0,0335	0,015	0,045	0,027	0,014
4	0,022	0,0215	0,0385	0,034	0,072	0,016	0,012
5	0,022	0,0425	0,046	0,0395	0,089	0,027	0,01
6	0,0515	0,0205	0,039	0,0405	0,0635	0,029	0,012
7	0,0315	0,022	0,0405	0,0285	0,0625	0,0225	0,01
8	0,014	0,0115	0,0355	0,0255	0,096	0,0215	0,009
9	0,0295	0,0215	0,025	0,021	0,0295	0,0215	0,008
10	0,0355	0,0295	0,104	0,0355	0,2685	0,1165	0,018
11	0,134	0,0285	0,042	0,0335	0,06	0,0805	0,02
12	0,041	0,03	0,0425	0,044	0,07	0,0495	-0,003
13	0,037	0,0235	0,0405	0,0385	0,0745	0,0355	0,009
14	0,0355	0,0205	0,0235	0,047	0,053	0,0255	0,013
15	0,024	0,013	0,0165	0,049	0,021	0,0215	0,011
16	0,044	0,026	0,0335	0,0365	0,074	0,0305	0,007
17	0,0345	0,035	0,0385	0,044	0,0915	0,0305	0,013
18	0,0145	0,007	0,043	0,018	0,069	0,035	0,015
19	0,04	0,029	0,0685	0,0355	0,075	0,0505	0,011
20	0,0375	0,0395	0,059	0,044	0,0825	0,0825	0,017
21	0,022	0,0195	0,054	0,0295	0,068	0,054	0,018
22	0,078	0,0605	0,0765	0,0675	0,084	0,066	0,011
<b>Pto. de corte</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

**Tabla 12.** D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA de los 22 sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes frente a las proteínas recombinantes Hsp70 de *L. braziliensis*.

### 3.4.7 Discusión general: respuesta humoral frente a la Hsp70 de *L. braziliensis*.

En el Gráfico 1 se muestran los resultados comparativos de los ensayos por ELISA con la proteína recombinante completa rLb70 y con los cinco fragmentos solapantes de la misma utilizados en el mapeo antigénico. En todos los casos se observa la elevada reactividad de los sueros de pacientes con LMC respecto a los sueros con LC, y cómo va en aumento, formando una escalera, hacia el extremo carboxi-terminal, exceptuando rLb70(240-357).



**Gráfico 1.** Medias de las D.O. por ELISA de las proteínas recombinantes de la Hsp70 de *L. braziliensis* frente a los distintos sueros.

Con la proteína completa rLb70 se observa una gran diferencia de intensidad en la respuesta de los sueros con LMC/LC respecto a los sueros con Chagas, donde la media de las D.O. fue de 0,053 (Tabla 13). A pesar de que la reactividad media de los sueros con LMC (0,501) fue mayor que la de los sueros con LC (0,336), el porcentaje de reconocimiento de la proteína fue similar en ambos casos, con un 85% y 83,3% respectivamente (Tabla 14).

La media de la intensidad de la respuesta de los tres fragmentos localizados en la mitad amino-terminal de la proteína está por debajo del valor considerado como punto de

corte para la positividad, que es 0,1, o es ligeramente superior (0,118). Las secuencias de aminoácidos de estos fragmentos están muy conservadas, como se vio en la Tabla 10. Cada uno de ellos contiene una de las tres secuencias consenso descritas para los miembros de la familia de las Hsp70 y, además, rLb70(240-357) posee la secuencia de localización nuclear (NLS-BP) y una región con carga positiva. Este fragmento fue únicamente reconocido por los sueros con LMC, con un 25% de positividad.

Hsp70	Sueros LMC	Sueros LC	Sueros Chagas	Sueros LV	Sueros control
<b>rLb70</b>	0,501 ± 0,301	0,336 ± 0,188	0,053 ± 0,086	0,011 ± 0,006	0,006 ± 0,005
<b>rLb70(1-114)</b>	0,067 ± 0,102	0,024 ± 0,073	0,001 ± 0,010	0,003 ± 0,013	-0,005 ± 0,019
<b>rLb70(109-245)</b>	0,118 ± 0,184	0,035 ± 0,033	0,019 ± 0,007	0,018 ± 0,009	0,029 ± 0,017
<b>rLb70(240-357)</b>	0,070 ± 0,123	0,014 ± 0,012	0,004 ± 0,003	0,006 ± 0,005	0,009 ± 0,013
<b>rLb70(352-518)</b>	0,236 ± 0,244	0,112 ± 0,111	0,054 ± 0,032	0,065 ± 0,070	0,040 ± 0,019
<b>rLb70(513-663)</b>	0,323 ± 0,286	0,165 ± 0,129	0,021 ± 0,019	0,012 ± 0,005	0,008 ± 0,005
<b>rLb70(513-663) no desnaturalizada</b>	0,121 ± 0,118	0,072 ± 0,05	0,018 ± 0,008	0,033 ± 0,019	0,029 ± 0,019

**Tabla 13.** Media ± Desviación estándar de las D.O. por ELISA de los sueros que se indican frente a cada una de las proteínas recombinantes.

La intensidad de la respuesta humoral aumenta considerablemente en la mitad carboxi-terminal de la proteína, donde se localizan la mayoría de los determinantes antigénicos lineales. Curiosamente, el fragmento rLb70(352-518) fue reconocido por la mitad de los sueros con LMC y por un 30% de los sueros con LC, a pesar de ser el más conservado de los cinco (Tabla 10). Dado el elevado tamaño de los fragmentos recombinantes, en este caso sería necesario realizar un mapeo más fino, mediante péptidos sintéticos, para localizar las regiones antigénicas que contiene y si pertenecen a secuencias conservadas o variables. Por otra parte, la elevada identidad mostrada explicaría que aumentara la reactividad de los sueros de pacientes con Chagas, con LV y de personas sanas, siendo incluso superior a la obtenida con la proteína completa. Fue el único fragmento reconocido por sueros con LV. El hecho de que la proteína completa rLb70 no fuese reconocida por este suero de LV mientras que este fragmento sí, puede deberse a que

la exposición de forma aislada del determinante antigénico de reacción cruzada para la LV mejore el reconocimiento del mismo. Así mismo, hemos visto que tres de los sueros con Chagas crónico reconocieron la proteína completa, pero al realizar el mapeo antigénico sólo uno mostró reactividad, precisamente frente a este fragmento. Quizás al dividir la proteína en varios fragmentos, aunque sean solapantes, se hayan perdido algunos determinantes lineales de reacción cruzada para Chagas, o bien puede ser que la proteína completa adopte alguna conformación “no lineal”, a pesar de estar desnaturalizada, que pudiera contener algún determinante antigénico.

Por último, el fragmento carboxi-terminal rLb70(513-663) de *L. braziliensis* mostró una positividad del 70% y fue con el que se obtuvo la mayor intensidad en la respuesta humoral. Aunque mantiene la regla general de que los sueros con LMC fueron los de mayor reactividad, el porcentaje de reconocimiento fue algo menor para los sueros con LMC que con LC (65% y 73,3%, respectivamente). Al contrario de lo que sucede con el fragmento anterior, éste presentó los menores porcentajes de identidad respecto a los de *L. infantum*, *T. cruzi* y la Hsc70 humana, siendo, por tanto, la región menos conservada de la proteína. Ninguno de los sueros con Chagas o LV reconoció este fragmento. Presenta una región con carga mixta y dos repeticiones GGMP, descritas como altamente inmunogénicas en otros parásitos, como ya se ha comentado. Cuando se realizó el ensayo ELISA de este fragmento en condiciones no desnaturalizantes, se observó que tanto la intensidad de la respuesta como el porcentaje de reconocimiento disminuyó a algo más de la mitad, tanto para los sueros con LMC como con LC. Este resultado indica que la respuesta humoral va dirigida principalmente hacia los determinantes lineales y no hacia los conformacionales del extremo recombinante carboxilo-terminal.

En la Tabla 14 se muestran los resultados del análisis de la respuesta humoral mediante mapeo antigénico de la Hsp70 de *L. braziliensis*.

Un hecho interesante que debe ser comentado es que, 6 de los sueros con LMC/LC eran de pacientes previamente diagnosticados de leishmaniasis cuyo examen parasitológico convencional no reveló la presencia ni de formas amastigotas (por examen directo de frotis de la lesión), ni de formas promastigotas (por cultivo de biopsias). Los códigos de estos sueros son: LR-625, LR-629, LR-631, LR-641, LR-651 y LR-654, y 3 son de pacientes con LC y los otros 3 con LMC (ver anexo sueros). Todos presentaron D.O. por ELISA frente a proteínas totales de *L. braziliensis* altos, entre 0,52 y 0,88, y todos ellos fueron



Proteínas recombinantes Hsp70	Sueros LMC/LC	Sueros Chagas	Sueros LV	Sueros sanos
<b>rLb70</b>	84% (42/50) 85% LMC (17/20) 83.3% LC (25/30)	18.75% (3/16)	0%	0%
<b>rLb70(1-114)</b>	14% (7/50) 25% LMC (5/20) 6.6% LC (2/30)	0%	0%	0%
<b>rLb70(109-245)</b>	14% (7/50) 30% LMC (6/20) 3.3% LC (1/30)	0%	0%	0%
<b>rLb70(240-357)</b>	10% (5/50) 25% LMC (5/20) 0% LC (0/30)	0%	0%	0%
<b>rLb70(352-518)</b>	38% (17/50) 50% LMC (10/20) 30% LC (9/30)	6.25% (1/16)	33.3% (1/3)	0%
<b>rLb70(513-663)</b>	70% (35/50) 65% LMC (13/20) 73.3% LC (22/30)	0%	0%	0%
<b>rLb70(513-663) no desnaturalizada</b>	28%(14/50) 45% LMC (9/20) 16.6% LC(5/30)	0%	0%	0%

**Tabla 14.** Antigenicidad de las proteínas recombinantes Hsp70 de *L. braziliensis*.

positivos sólo frente a la proteína completa rLb70 y al fragmento carboxi-terminal rLb70(513-663).

El examen directo del frotis es una prueba de certeza, pero tiene como limitantes tanto la experiencia del observador como la posibilidad de que el parásito no se encuentre en la muestra obtenida. El cultivo del parásito requiere condiciones especiales, y tiene un riesgo de contaminación alto con microorganismos que pudieran estar presentes en la muestra de tejido. Por esto, el fragmento carboxi-terminal también podría tener validez en aquellos casos en los que el diagnóstico parasitológico haya resultado negativo. Por otro lado, no se ha testado la respuesta de personas que hayan sufrido LMC o LC y que estén curadas, con o sin tratamiento, frente a rLb70(513-663). Carvalho y col. (1995), al caracterizar la respuesta inmune de personas que se han curado espontáneamente de una LC debida a *L. braziliensis*, encontraron que estas personas presentan una fuerte respuesta celular T, pero un título nulo o bajo de anticuerpos frente a los antígenos totales de

*Leishmania*. Sería interesante averiguar si el fragmento carboxi-terminal de la Hsp70 discrimina o no entre una enfermedad presente y pasada. No obstante, el hecho de no disponer de este tipo de sueros nos ha impedido realizar este estudio.

En los estudios de antigenicidad de las Hsp70 de otros tripanosomátidos también se han realizado mapeos antigénicos mediante el empleo de péptidos sintéticos, con el fin de identificar aquellos con un uso potencial en la serodiagnos de la leishmaniasis y tripanosomiasis. Esto sucede con la Hsp70 de *L. donovani* (Wallace y col., 1992), *L. infantum* (Quijada y col., 1998), *T. cruzi* (Requena y col., 1993), así como con las de otros organismos como *Chlamydia trachomatis* (Zhong y Brunham., 1992), *Mycobacterium tuberculosis* (Elsaghier y col., 1992) y *Mycobacterium leprae* (Davenport y col., 1992).

El mapeo antigénico realizado con la Hsp70 de *T. cruzi* (Requena y col., 1993) llevó a la identificación de 4 péptidos reconocidos por todos los sueros de pacientes chagásicos empleados. Estos péptidos cubren las regiones: 93-107, 135-155, 160-181 y 587-601, y se localizan tanto en las regiones altamente conservadas como en las menos conservadas de la proteína. Determinaron, por el contrario, que el tercio carboxi-terminal es el menos inmunogénico, a pesar de ser el menos conservado. Los sueros de personas sanas también tuvieron reactividad contra un gran número de péptidos. Marañón y col. (2000), empleando la misma batería de péptidos, encontraron que el suero de ratones inoculados con la Hsp70 recombinante de *T. cruzi* reconoce en su mayoría los péptidos del extremo carboxi-terminal, que son los más divergentes entre las Hsp70 del parásito y del ratón.

Quijada y col. (1998) obtuvieron un péptido de la Hsp70 de *L. infantum* (70-P2), que cubre la región 554-603, con una sensibilidad del 57% y que no mostró reacción cruzada con los sueros chagásicos. Los estudios de antigenicidad realizados por MacFarlane y col. (1990) y De Andrade y col. (1992) con la Hsp70 de *L. donovani* se realizaron precisamente con fragmentos recombinantes conteniendo la mitad carboxi-terminal de la proteína, resultando en ambos casos, como ya se comentó, que eran reconocidos específicamente por los sueros de pacientes con LV. Wallace y col. (1992) realizaron estudios de antigenicidad tanto con fragmentos de la Hsp70 de *L. donovani*, obtenidos tras delecciones seriadas de la proteína, como con una serie de péptidos solapantes. Identificaron la región carboxi-terminal (438-637) como el sitio

inmunodominante, y el hexámero EADDRA como el epítoto inmunodominante de los linfocitos-B.

Por otro lado, en otros organismos, como *M. leprae* (Davenport y col., 1992) y *M. tuberculosis* (Elsagher y col., 1992), también se ha descrito que la región carboxi-terminal de la Hsp70 es la mejor reconocida por los sueros de pacientes leprosos y tuberculosos, respectivamente. Siendo esta región la que muestra la mayor divergencia respecto a la Hsp70 humana.

En conclusión, los resultados obtenidos tras el mapeo antigénico de la Hsp70 de *L. braziliensis* mostraron que la respuesta humoral se dirige fundamentalmente hacia la región menos conservada de la proteína, que corresponde al fragmento recombinante carboxi-terminal. El fragmento anexo, rLb70(352-517), mostró una antigenicidad destacable (38%), a pesar de ser el más conservado, pero también ofrece reacción cruzada. El fragmento carboxi-terminal **rLb70(513-663)** se puede considerar como un marcador específico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea, presentando una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100% con los sueros de pacientes con infecciones por diversos tripanosomátidos que hemos utilizado. Este fragmento, en combinación con fragmentos antigénicos específicos de otras proteínas de *L. braziliensis*, podría ser utilizado en un *test* de diagnóstico inmunológico de la LMC y LC.

#### **4. ANEXO SUEROS**

---



## 4. ANEXO. SUEROS UTILIZADOS.

### 4.1 Respuesta humoral de los sueros de pacientes con LMC y LC frente a antígenos totales de *L. braziliensis*.

Para los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se ha contado con una colección de sueros de pacientes con LC y LMC causada por *L. braziliensis*. Estos sueros fueron recolectados por la Dra. Rosa Luz Pacheco, del Departamento de Microbiología de la Universidad San Antonio Abad de Cuzco, Perú, de pacientes que presentaban lesiones cutáneas y/o mucosas con previo diagnóstico clínico de leishmaniasis.

En Perú se observan dos especies distintas del complejo *L. braziliensis*: *L. (Viannia) peruviana*, que causa la leishmaniasis cutáneo andina o “Uta” y *L. (Viannia) braziliensis*, que produce la leishmaniasis cutánea y, por metástasis de los amastigotas hacia la mucosa naso-orofaríngea, su evolución hacia la forma mucocutánea o “Espundia” tropical. Su distribución epidemiológica es diferente, la Uta está presente en la vertiente occidental andina, entre los 600 y 3.000 metros de altitud, y se manifiesta como una úlcera cutánea que se puede localizar en cualquier parte del cuerpo, principalmente en brazos y piernas. Por otra parte, la Espundia se localiza en la vertiente oriental, por debajo de los 2.000 metros de altitud en la selva alta y en la cuenca amazónica de la selva baja, manifestándose como un proceso destructivo progresivo.

El muestreo de los sueros de leishmaniasis causada por *L. braziliensis* se realizó en la provincia de La Convención, que es una zona endémica con una alta incidencia de leishmaniasis. Se localiza en la región de la Selva Alta ocupando la zona sur-oriental del departamento de Cuzco.

En la Tabla 1 se muestran las fichas clínicas de todos los pacientes. Se indica la fecha de recepción del suero; la fecha de nacimiento; el lugar de contagio de la leishmaniasis; el tipo, tiempo y localización de la lesión; si ha recibido tratamiento; y el diagnóstico parasitológico tanto directo, como es el examen microscópico a partir de frotis de la lesión, como por cultivo de parásitos, a partir de aspirados y biopsias de las lesiones. También se indican las D.O.<sub>450nm</sub> por ELISA con proteínas totales de *L. braziliensis*.



**Tabla 1.** Fichas clínicas de los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea procedentes de Perú. M. superior: miembros superiores; M. inferior: miembros inferiores; SOP: se observan promastigotes; SOA: se observan amastigotes; NOP: no se observan promastigotes; NOA: no se observan amastigotes. Se indica la D.O. <sub>450nm</sub> por ELISA frente a proteínas totales de *L. braziliensis* (500 ng de antígeno, dilución de suero de 1:400).

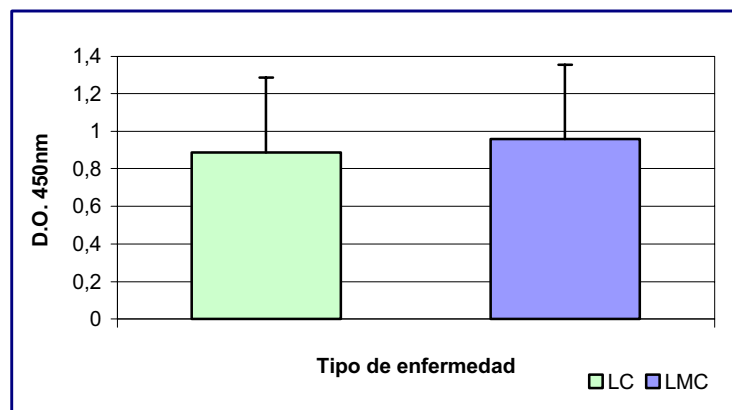
Como ya hemos indicado, la respuesta inmune de los individuos afectados de leishmaniasis va a depender enormemente del tipo de leishmaniasis que sufra, de la especie y cepa del parásito y del estado general del paciente. La leishmaniasis cutánea se caracteriza por un balance entre las respuestas celulares Th1 y Th2, aunque los niveles de IFN- $\gamma$  y de IL-2 son algo más elevados que los de las citoquinas Th2 IL-4 e IL-10 (Skeyki y col., 1995). La enfermedad resulta más leve cuanto más se inclina este balance hacia una respuesta Th1 (Kharazmi y col., 1999). Durante la LC la producción de anticuerpos no es muy importante (Pedrosa y col., 1999) por lo que hasta el momento ha resultado difícil el desarrollo de diagnósticos inmunológicos para esta enfermedad. Por otra parte, la LMC, que es una secuela de la LC por metástasis de los parásitos hacia las mucosas, presenta algunas características intermedias entre la LC y la LV, como puede ser un título de anticuerpos anti-*Leishmania* superior a los de LC (Herwaldt, 1999), o una respuesta celular muy importante (Pedrosa y col., 1999).

La respuesta humoral de estos sueros frente a las proteínas totales del parásito fue determinada por ELISA obteniéndose en todos los casos valores de D.O. muy altos: el valor medio de la D.O. de todos los sueros fue de 0,915, con una desviación estándar de 0,396. Cuando agrupamos los sueros en función del tipo de enfermedad (LC o LMC) se observa que la media de las D.O. de los sueros con LMC es algo superior a la de los sueros con LC, tal y como se espera para este tipo de enfermos (Herwaldt, 1999), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 2). Es sorprendente la alta reactividad que los sueros con LC muestran frente a las proteínas totales de *Leishmania*, cuando diversos autores encuentran que durante la LC la producción de anticuerpos contra el parásito no es muy importante (Pedrosa y col., 1999, Ashford y col., 2000) (Gráfico 1).

Tipo de leishmaniasis	Media	Desviación estándar
L. cutánea	0,88578333	0,40149758
L. mucocutánea	0,96005	0,39612139

**Tabla 2.** Media y desviación estándar de las D.O. de los sueros frente a proteínas totales de *L. braziliensis* en función del tipo de enfermedad.





**Gráfico 1.** Media de la D.O. por ELISA frente a proteínas totales de *L. braziliensis* en función del tipo de enfermedad.

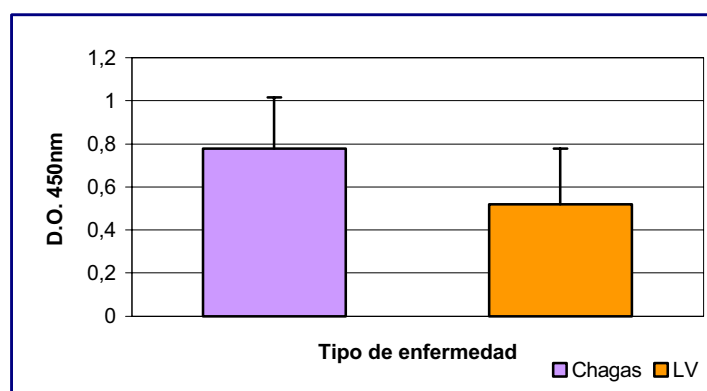
Aplicando en análisis estadístico Rho de Spearman, que establece la significación estadística de correlaciones bilaterales, no se encontró correlación estadísticamente significativa entre el título de anticuerpos del suero frente a las proteínas totales de *Leishmania*, y ningún otro parámetro recogido en la Tabla 1, como puede ser la edad del paciente o el tiempo que éste ha presentado la lesión ( $p < 0,01$ ). Este hecho descarta que la elevación del título de anticuerpos de los sueros con LMC sea debida a una mayor duración de la enfermedad, tal como sugieren Pedrosa y col. (1999).

#### **4.2 Respuesta humoral de los sueros de pacientes con Chagas crónico y LV frente a antígenos totales de *L. braziliensis*.**

La enfermedad de Chagas mantiene niveles altos de anticuerpos tanto durante su fase aguda como en la crónica, por ello, el diagnóstico inmunológico en este caso es muy utilizado por su rapidez y facilidad (Saez-Alquézar y col., 2000). La activación policlonal de linfocitos T y B produce un aumento de la producción de anticuerpos y de linfocitos T, tanto citotóxicos como *helper* (Minoprio y col., 1989). Por otro lado, la LV también presenta títulos elevados de anticuerpos. Durante la LV activa se detecta una supresión de la reactividad de las células T frente a antígenos de *Leishmania*, se elevan los niveles de IL-4 y hay una importante hipergammaglobulinemia debido a la activación policlonal de las células B. También es característica la producción de IL-10 (Kharazmi y col., 1999). Todos estos parámetros se asocian con el establecimiento de una respuesta celular Th2 marcada, y con el agravamiento de la enfermedad.

Para evaluar la reacción cruzada de antígenos de *L. braziliensis*, como la proteína Hsp70, contamos con 16 sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica positivos por fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA. Estos sueros fueron cedidos por la Dra. Geny Aparecida, proceden de Brasil y no tienen infección mixta con *L. braziliensis*. Mostraron una elevada reactividad cruzada por ELISA frente a antígenos totales de *L. braziliensis*, siendo la media de 0,778 con una desviación estándar de 0,239 (Gráfico 2).

También empleamos sueros de pacientes con leishmaniasis visceral causada por *L. infantum*, cedidos por el Dr. J. M. Requena, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid. Lamentablemente, debido a las dificultades que supone la obtención de los sueros, sólo disponíamos de tres. Los valores por ELISA frente a proteínas totales de *L. infantum* eran muy altos: 2,7, 1,9 y 2,6. Frente a *L. braziliensis* la media también fue alta: 0,522, con una desviación estándar de 0,25.



**Gráfico 2.** Media de la D.O. por ELISA frente a proteínas totales de *L. braziliensis* de los sueros con Chagas y con LV.

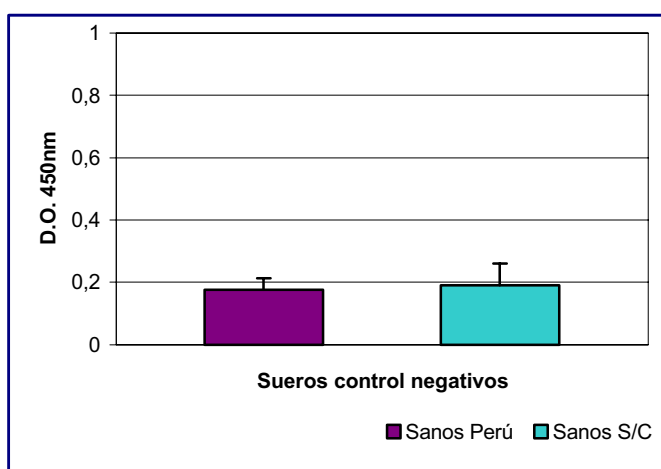
En la Tabla 3 se muestran las D.O.<sub>450nm</sub> obtenidas con ambos tipos de sueros:

Chagas	D.O. <sub>450nm</sub>	Chagas	D.O. <sub>450nm</sub>	LV	D.O. <sub>450nm</sub>
Try 1	1,044	Try 20	0,896	HL 42	0,803
Try 4	0,985	Try 21	0,439	HL 77	0,297
Try 7	0,769	Try 22	0,935	JK 1	0,468
Try 8	0,964	Try 26	0,931		
Try 10	0,737	Try 28	0,199	Promedio	0,52266667
Try 12	0,903	C+Tryp	0,66	Desv. est	0,2573914
Try 14	0,706				
Try 15	0,952	Promedio	0,7783125		
Try 16	0,435	Desv. est	0,23932731		
Try 19	0,898				

**Tabla 3.** D.O. por ELISA de los sueros chagásicos y con LV frente a proteínas totales de *L. braziliensis*.

### 4.3 Respuesta humoral de los sueros control negativos frente a antígenos totales de *L. braziliensis*.

Como controles negativos se emplearon sueros de personas sanas. Los 10 sueros de Perú proceden del mismo área geográfica que los sueros con LC y LMC, y no tienen antecedentes de contacto con *Leishmania*. Los 10 sueros de Santa Cruz de Tenerife son de personas sanas que nunca han viajado a zonas endémicas de la enfermedad. Los valores de D.O. de todos los sueros frente a proteínas totales de *L. braziliensis* fueron inferiores a la media más dos desviaciones estándar (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Media de la D.O. por ELISA frente a proteínas totales de *L. braziliensis* de los sueros de personas sanas.

### 4.4 Sueros de pacientes con desórdenes de autoinmunidad.

Los 22 sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes fueron cedidos por las Dras. A. Jurado y M<sup>a</sup> J. Herrera de la Sección de Inmunología del Hospital Universitario de Canarias. Todos son positivos por IFI a anticuerpos antinucleares, y cada uno presenta distintas positividades frente a los antígenos ensayados en el test INNO-LIA ANA, así como a otros antígenos. En la Tabla 4 se indican los antígenos para los que se encontraron autoanticuerpos en cada paciente.

Código	ANA (IFI)	Autoantígenos
SAI 1	+	RNP-70, RNP-A, RNP-C, ADNn
SAI 2	+	Ro52, Ro60, La, ADNn
SAI 3	+	ADNn
SAI 4	+	La
SAI 5	+	Cenp-B
SAI 6	+	RNP-70, RNP-A, RNP-C, Factor reumatoide
SAI 7	+	Ro52
SAI 8	+	Scl-70
SAI 9	+	Ro52, ADNn, Factor reumatoide
SAI 10	+	RNP-A, RNP-C, Ro52, Ro60, La, ADNn
SAI 11	+	Membrana basal glomerular, p-ANCA (Mpo)
SAI 12	+	Factor reumatoide
SAI 13	+	SmB, RNP-C, Histonas, ADNn
SAI 14	+	-
SAI 15	+	Factor reumatoide
SAI 16	+	Scl-70
SAI 17	+	Ro52, Ro60, La, Factor reumatoide
SAI 18	+	RNP-A, Ro52, La, ADNn
SAI 19	+	Ro52, Ro60, ADNn
SAI 20	+	SmB, SmD, RNP-70, RNP-A, RNP-C, Ro60, Ribosomal, Factor reumatoide
SAI 21	+	Cenp-B, Antimitocondrial
SAI 22	+	SmB, SmD, RNP-C, ADNn

**Tabla 4.** Fichas de pacientes con desórdenes de autoinmunidad. **ADNn:** ADN nativo; **SmB y SmD:** proteínas nucleares no histonas; **RNP-70K, RNP-A, RNP-C:** ribonucleoproteínas nucleares; **Ro52 (SS-A) y Ro60 (SS-A):** proteínas de 52 y 60 kDa, respectivamente, asociadas a moléculas de ARN; **La (SS-B):** fosfoproteína de 48 kDa asociada a transcritos de la ARN polimerasa III; **Cenp-B:** proteínas del kinetocoro ligadas al ADN centromérico; **Scl-70 (Topo-I):** proteína básica no histona de 70 kDa, producto de degradación de la forma nativa de la enzima ADN topoisomerasa I; **Ribosomal:** fosfoproteínas P0, P1 y P2; **Histonas:** mezcla de las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 humanas; **p-ANCA (Mpo):** mieloperoxidasa de neutrófilos; **Membrana basal glomerular:** cadena  $\alpha 3$  del colágeno IV de la membrana basal glomerular; **Antimitocondrial:** antígenos mitocondriales.



## **5. CONCLUSIONES**

---



## 5. CONCLUSIONES.

1.- La preabsorción de los sueros de pacientes con LC con proteínas totales de *T. cruzi* homogeniza y clarifica el *Western-blot*, facilitando la diferenciación de las bandas antigénicas.

2.- Las fracciones pLb70, pLb87 y pLb99 de *L. braziliensis* son candidatas a ser utilizadas en el serodiagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea causadas por la infección por dicho parásito. Presentan un porcentaje de reconocimiento del 100, 66,6 y 60% de los sueros con LMC y LC, y una reacción cruzada del 12,5, 6,25 y 6,25% con los sueros chagásicos, respectivamente. Ninguna de ellas es reconocida por los sueros de personas sanas.

3.- La fracción pTc40 de *T. cruzi* es reconocida sólo por los sueros de pacientes chagásicos. La fracción pLb30, a pesar de ser de *L. braziliensis*, es reconocida por los sueros chagásicos con mucha mayor intensidad que por los sueros de los pacientes con LMC y LC.

4.- La secuencia de aminoácidos de un fragmento de pLb70, junto con su peso molecular aproximado, muestra que corresponde a la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) de *L. braziliensis*, no caracterizada hasta ahora.

5.- El gen *HSP70* de *L. braziliensis* consta de 1.992 pb y, al contrario de lo que sucede en otros tripanosomátidos, es de copia única. Su secuencia de nucleótidos está muy conservada, igual que sucede con los demás miembros de esta familia.

6.- Según la secuencia de aminoácidos deducida de la pauta abierta de lectura del gen *HSP70*, éste codifica una proteína de 663 aminoácidos, con un punto isoelectrónico teórico de 5,35 y un peso molecular teórico de 71,95 kDa. Codifica la forma citosólica de la Hsp70 y presenta los motivos característicos de esta familia.

7.- Los análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos de la Hsp70 de *L. braziliensis* con las Hsp70 de otros tripanosomátidos muestran que también presenta una elevada conservación de secuencia, manteniendo la observación general de que las dos terceras partes amino-terminales de la proteína están más conservadas que la región carboxi-terminal.



8.- Las diferencias existentes entre la región carboxi-terminal de la Hsp70 de *L. braziliensis* obtenida por nosotros y la del fragmento obtenido por Amorin y col. (1996), indican que esta región no sólo es divergente entre las Hsp70 de diferentes especies, sino también entre cepas de la misma especie, de distinta procedencia geográfica.

9.- La Hsp70 de *L. braziliensis* es una proteína altamente antigénica, con un 84% de reconocimiento por los sueros de los pacientes con LMC y LC. No obstante, la reacción cruzada que presenta con los sueros chagásicos (18,77%) la invalida como un posible marcador específico de enfermedad.

10.- La antigenicidad de la Hsp70 de *L. braziliensis* recae en la mitad carboxi-terminal de la proteína. En esta región se localiza el fragmento de mayor identidad, rLb70(352-518), y el de mayor divergencia, rLb70(513-663), en comparación con las secuencias estudiadas de otras Hsp70 de eucariotas. Dado el tamaño de estos fragmentos, sería conveniente realizar un mapeo antigénico más fino mediante péptidos sintéticos solapantes.

11.- Los determinantes antigénicos de reacción cruzada, tanto con sueros chagásicos (6,25%) como con sueros de pacientes con LV (33,3%), se localizan en el fragmento rLb70(352-518).

12.- El fragmento carboxi-terminal rLb70(513-663), además de ser el que presenta mayor sensibilidad (70%), tiene una especificidad del 100%, ya que no es reconocido por los sueros chagásicos ni por los sueros de pacientes con LV.

13.- Los determinantes conformacionales del fragmento carboxi-terminal rLb70(513-663) están en menor número que los lineales, ya que el reconocimiento disminuye a un 28% de los sueros con LMC/LC. Además, ambos tipos de determinantes no se complementan.

14.- El fragmento carboxi-terminal de *L. braziliensis* rLb70(513-663) podría considerarse marcador específico de enfermedad. Este fragmento, en combinación con otros fragmentos antigénicos específicos de otras proteínas de *L. braziliensis*, podría ser utilizado en un *test* de diagnóstico inmunológico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

---



## 6. BIBLIOGRAFÍA.

**Afonso, L. C. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G. and Scott, P.** (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*, **263**: 235-237.

**Ali, A. and Ashford, R. W.** (1994). Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relationship between infection and disease in an endemic area. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, **88**: 289-293.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**: 3389-3402.

**Alvar, J. P.** (1994). Leishmaniasis and AIDS-coinfection: the Spanish example. *Parasitol. Today*, **10**: 160-163.

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

**Amorim, A. G., Carrington, M., Miles, M. A., Barker, D. C. and Cardoso de Almeida, M. L.** (1996). Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones*, **1(3)**: 177-187.

**Angel, S. O., Requena, J. M., Soto, M., Criado, D. and 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.

**Aragón, Z.** (1999). Elaboración de una genoteca de expresión. Aislamiento y caracterización de un gen codificante para la histona H1 de *Leishmania braziliensis*. Tesis Doctoral. Departamento de Parasitología, Ecología y Genética. Universidad de La Laguna.

**Ardeshir, F., Flint, J. E., Richman, S. J. and Reese, R. T.** (1987). A 75 kd merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum* which is related to the 70 kd heat-shock proteins. *EMBO J.*, **6**: 493-499.

**Arora, S. K., Melby, P. C. and Sehgal, S.** (1995). Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein of *Leishmania donovani*. *Immunol. Cell. Biol.*, **73**: 446-451.

**Ashford, D. A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J. C., Sherlock, I., Eulalio, C., López, U., Fernández, O., Degraeve, W. and 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.** (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, **30**: 1269-1281.

**Ashford, R. W. and Bettini, S.** (1987). En: *Ecology and Epidemiology: Old World*. Eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick., p. 365-424. Academic Press, London, 1.

**Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. and Srivastava, P. K.** (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70 and calreticulin. *Immunity*, **14(3)**: 303-313.

**Becker, J. and Craig, E. A.** (1994). Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.*, **219**: 11-23.

**Beere, H. M. and Green, D. R.** (2001). Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell. Biol.*, **11(1)**: 6-10.

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

**Benaroudj, N., Fouchaq, B. and Ladjimi, M. M.** (1997). The COOH-terminal peptide binding domain is essential for self-association of the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.*, **272(13)**: 8744-8751.

**Berman, J. D.** (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.*, **24**: 684-703.

- Berman, J. D.** (1999). Editorial response: U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, **28**: 49-51.
- Birnbaum, G. and Kotilinek, L.** (1993). Antibodies to 70-kD heat shock protein are present in CSF and sera from patients with multiple sclerosis. *Neurology*, **43**: A162.
- Birnboim, H. C.** (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzimol.*, **100**: 243-255.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1513-1523.
- Bock, H. J. and Langer P. J.** (1993). Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **62**: 187-198.
- Boothroyd, J. C. and Cross, J. A.** (1982). Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene*, **20**: 281-289.
- Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C. S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, B. and Bukau, B.** (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.*, **8(5)**: 427-432.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B. E. and Karlin, S.** (1992). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 2002-2006.
- Brito, M. E. F., Mendonça, M. G., Gomes, Y. M., Jardim, M. L. and Abath, F. G. C.** (2000). Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, **7(2)**: 318-321.
- Burns, J. M., Shreffler, W. J., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R. and 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. U.S.A.*, **90**: 775-779.

**Cabrera, M., Shaw, M. A., Sharples, C., Williams, H., Castes, M., Convit, J. and Blackwell, J. M.** (1995). Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, **182**: 1259-1264.

**Campos-Neto, A., Porrozi, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Skeiky, Y. A. W., Reed, S. G. and Grimaldi, G. Jr.** (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infec. Immun.*, **69**(6): 4103-4108.

**Cardeñosa, N., Riera, C., Cortés, P., March, F., Muñoz, C., Potús, M. and Prats, G.** (1995). Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic *Leishmania infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, **17**: 509-516.

**Carmelo, E., Martínez, E., Zurita, A., Piñero, J. E., Pacheco, R., del Castillo, A. and Valladares, B.** (2001). Caracterización génica, expresión y estudio de antigenicidad de la KMP-11 de *Leishmania braziliensis*. *Rev. Ibérica de Parasitología*. En prensa.

**Carmelo, E., Pérez, J. A., Zurita, A. I., Piñero, J. E., de Armas, F., del Castillo, A. and Valladares, B.** (2000). Small-scale isolation of high molecular weight DNA from *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.*, **86**(4): 844-846.

**Carvalho, E. M., Barral, A., Badaro, R. and Barral-Netto, M.** (1987) Immunology of human visceral leishmaniasis and perspectives of the use of immuno modulators. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Río de Janeiro, **82**: 137-146.

**Carvalho, E. M., Filho, D. C., Bacellar, O., Almeida, R. P., Lessa, H and Rocha, H.** (1995). Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **53**(3): 273-277.

**Chang, K. P.** (1985). Leishmaniasis. Eds. Chang, K. P. y Bray, R. S. Elsevier, Amsterdam.

**Chen, J., Rauch, C. A., White J. H., Englund, P. T. and Cozzarelli, N. R.** (1995). The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell*, **80**: 61-69.

- Chiaromonte, M. G., Zwirner, N. W., Caropresi, S. L., Taranto N. J. and Malchiodi E. L.** (1996). *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* human mixed infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **54**: 271-273.
- Chiller, T. M., Samudio, M. A. and Zoulek, G.** (1990). IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43(6)**: 650-656.
- Chomczynsky, P.** (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.*, **201**: 134-139.
- Chopp, M.** (1993). The roles of heat shock proteins and immediate early genes in central nervous system normal function and pathology. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.*, **6**: 6-10.
- Cohen, I. R.** (1991). Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *A. Rev. Immun.*, **9**: 567-589.
- Comeau, A. U., Miller, S. I. and Wirth, D. F.** (1986). Chromosome location of four genes in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **21**: 161-169.
- Conroy, S. E., Tucker, L., Latchman, D. S. and Isenberg, D. A.** (1996). Incidence of anti Hsp90 and Hsp70 antibodies in children with SLE, juvenile dermatomyositis and juvenile chronic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **14(1)**: 99-104.
- Curotto de Lafaille, M. A., Laban, A. and Wirth, D. F.** (1992). Gene expression in *Leishmania*: Analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 2703-2707.
- Davenport, M. P., McKenzie, K. R., Basten, A. and Britton, W. J.** (1992). The variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein is the target for humoral immune responses. *Infect. Immun.*, **60(3)**: 1170-1177.
- Davidoff, A. M., Iglehart, J. D. and Marks, J. R.** (1992). Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 3439-3442.



- Davis, J. E., Voisine, C. and Craig, E.** (1999). Intragenic suppressors of Hsp70 mutants: Interplay between the ATPase- and peptide-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 9269-9276.
- De Andrade, C. R., Kirchhoff, L. V., Donelson, J. E. and Otsu, K.** (1992). Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 330-335.
- Demand, J., Lüders, J. and Höfeld, J.** (1998). The carboxi-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperones cofactors. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 2023-2028.
- DeNagel, D. C. and Pierce, S. K.** (1992). A case of chaperones in antigen processing. *Immunol. Today*, **13**: 86-89.
- Dhillon, V. B., McCallum, S., Norton, P., Twomey, B. M., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Isenberg, D. A. and Latchman, D. S.** (1993). Differential heat shock protein overexpression and its clinical relevance in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, **52(6)**: 436-442.
- Dworniczak, B. and Mirault, M. E.** (1987). Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids. Res.* **15(13)**: 5181-5197.
- Ellis, R. J. and Hartl, F. U.** (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**: 102-110.
- Elsaghier, A., Lathigra, R. and Ivanyi, J.** (1992). Localization of linear epitopes at the carboxi-terminal end of the mycobacterial 71 kDa heat shock protein. *Mol. Immunol.*, **29**: 1153-1156.
- Englund, P. T., Guilbride, D. L., Hwa, K. Y., Johnson, C. E., Li, C., Rocco, L. J. and Torri, A. F.** (1996). Kinetoplast DNA: structure and replication. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Frontiers in Molecular Biology, 13). Eds. D. F. Smith y M. Parsons.
- Engman, D. M., Dragon, E. A. and Donelson, J. E.** (1990). Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, **144**: 3987-3991.

- Engman, D. M., Fehr, S. C. and Donelson, J. E.** (1992). Specific functional domains of mitochondrial hsp70s suggested by sequence comparison of the trypanosome and yeast proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **51**: 153-155.
- Engman, D. M., Kirchoff, L. V. and Donelson, J. E.** (1989). Molecular cloning of mt70, a mitochondrial member of the hsp70 family. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 5163-5168.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. H.** (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**: 2606-2617.
- Fargeas, C., Hommel, M., Maingon, R., Dourado, C., Monsigny, M. and Mayer, R.** (1996). Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **34(2)**: 241-248.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**: 6-13.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C. and McKay, D. B.** (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70k heat-shock cognate protein. *Nature*, **346**: 623-628.
- Flinn, H. M., Rangarajan, D. and Smith, D. F.** (1994). Expression of a hydrophilic surface protein in infective stages of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **65**: 259-270.
- Freeman, B. C., Myers, M. P., Schumacher, R. and Morimoto, R. I.** (1995). Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.*, **14(10)**: 2281-2292.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K. and Hartl, F. U.** (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, **370**: 111-117.
- Georgopoulos, C., Liberek, D. and Zylicz, M.** (1990). Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage lambda grow. En: *Stress proteins in Biology and Medicine*. Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières, y C. Georgopoulos, p. 191-221. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

**Gething, M. J. and Sambrook, J.** (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, **355**: 33-45.

**Ghoreishi, M., Katayama, I., Yokozeki, H. and Nishioka, K.** (1993). Analysis of 70 kD heat shock protein (HSP70) expression in the lesional skin of lupus erythematosus (LE) and LE related diseases. *J. Dermatol.*, **20(7)**: 400-405.

**Greene, L. E., Zinner, R., Naficy, S. and Eisenberg, E.** (1995). Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.*, **270(7)**: 2967-2973.

**Hames, B. D.** (1987). An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. En: *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Eds. B. D. Hames y D. Rickwood, pp. 1-91. IRL Press, Oxford, England.

**Harlow, E. and Lane, D.** (1988). Antibodies: a Laboratory manual. C.S.H.Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**Hartl, F. U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**: 571-580.

**Hartl, F. U., Hlodan, R. and Langer, T.** (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends. Biochem. Sci.*, **19**: 21-25.

**Havlir, D. V., Wallis, R. S., Bomm, W. H., Daniel, T. M., Chervenak, K. and Ellner, J.** (1991). Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immun.*, **59**: 665-670.

**Hedstrom, R., Culpepper, J., Harrison, R. A., Agabian, N. and Newport, G.** (1987). A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein hsp70. *J. Exp. Med.*, **165**: 1430-1435.

**Helmbrecht, K., Zeise, E. and Rensing, L.** (2000). Chaperone in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.*, **33**: 341-365.

**Herwaldt, B. L.** (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, **354**: 1191-1199.

**Herwaldt, B. L. and Berman, J. D.** (1992). Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **46**: 296-306.

- Hoft, D. F., Kim, K. S., Otsu, K., Moser, D. R., Yost, W. J., Blumin, J. H., Donelson, J. E. and Kirchhoff, L. V.** (1989). *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect. Immun.*, **57**: 1959-1967.
- Hsu, K. F., Hung, C. F., Cheng, W. F., He, L., Slater, L. A., Ling, M. and Wu, T. C.** (2001). Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by linking *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to an antigen. *Gene Ther.*, **8(5)**: 376-383.
- Huang, J. and Van der Ploeg, L. H. T.** (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' acceptor site. *EMBO J.*, **10**: 3877-3885.
- Huang, P. L., Roberts, B. E., McMahon-Pratt, D. M., David, J. R. and Miller, J. S.** (1984). Structure and arrangement of the beta-tubuline genes of *Leishmania tropica*. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 1372-1383.
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizamon, S., Camargo, M. E., Aslund, L., Petterson, U. and Frasch, A. C.** (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **30**: 27-33.
- Jarjour, W. N., Jeffries, B. D., Davis, J. S. 4th., Welch, W. J., Minura, T. and Winfield, J. B.** (1991). Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. *Arthritis Rheum.*, **34**: 1133-1138.
- Jensen, A. T. R., Gaafar, A., Ismail, A., Christensen, C. B. V., Kemp, M., El Hassan, A. M., Kharazmi, A., and Theander, T. G.** (1996). Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from Gene B protein. *Am. J. Med. Hyg.*, **55(5)**: 490-495.
- Jones, D. E., Elloso, M. and Scott, P.** (1998). Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. *Front. Biosci.*, **3**: 1171-1180.
- Karlin, S.** (1995) Statistical significance of sequence patterns in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**: 360-371.

- Karlin, S. and Brocchieri, L.** (1998). Heat shock protein 70 family: Multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J. Mol. Evol.*, **47**: 565-577.
- Kaufmann, S. H. E.** (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today*, **11**: 129-136.
- Kaufmann, S. H. E. and Schoel, B.** (1994). Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. En: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos, p. 495-531. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Kharazmi, A., Kemp, K., Ismail, A., Gasim, S., Gaafar, A., Kurtzhals, J. A. L., El Hassan, A. M., Theander, T. G. and Kemp, M.** (1999). T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol. Lett.*, **65**: 105-108.
- Krautz, G. M., Peterson, J. D., Godsel, L. M., Krettli, A. U. and Engman, D. M.** (1998). Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat shock proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**(2): 137-143.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-687.
- Laguna, F., López-Vélez, R., and Pulido, F.** (1999). Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. *AIDS*, **13**: 1063-1070.
- Laird, P. W.** (1989). Trans-splicing in trypanosomes-archais or adaptation?. *Trends Genet.*, **5**: 204-208.
- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rushe, L. and Beverly, S. M.** (1993). Coupling of poli(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.*, **7**: 996-1007.
- Lee, M. G.-S. and Van der Ploeg, L. H. T.** (1990). Transcription of the heat shock 70 locus in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **41**: 221-232.
- Lee, M. G.-S., Atkinson, B. L., Giannini, S. H., and Van der Ploeg, L. H. T.** (1988). Structure and expression of the hsp70 gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 9567-9585.

- Levin, M. J., Levitus, G., Kerner, N., Mesri, E., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Finkelstein, C., Chiale, P., Schejtman, D. and Hontebeyrie-Joskowicz, M.** (1990). Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85(4)**: 539-543.
- Lichtenstein, A., V., Moiseev, V. and Zaboikin, M. M.** (1990). A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening. *Anal. Biochem.*, **191**: 187-191.
- Liew, F. Y., Wei, X. Q. and Proudfoot, L.** (1997). Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Phil. Soc. Trans. Roy. Soc. Lond.*, **352**: 1311-1315.
- Lighthall, G. K. and Gianni, S. H.** (1992). The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitol. Today*, **8**: 192.
- Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**: 1151-1191.
- Lindquist, S.** (1992). Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganism. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**: 755-784.
- López-Buesa, P., Pfund, C. and Craig, E. A.** (1998). The biological properties of the ATPase activity of a 70 kDa heat shock protein (HPS70) are governed by the C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 15253-15258.
- MacFarlane, J., Blaxter, M. L., Bishop, R. P., Miles, M. A. and 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. and 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(12)**: 1685-1693.
- Maresca, B. and Carratu, L.** (1992). The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol. Today*, **8**: 260-266.
- Maresca, B. and Kobayashi, G. S.** (1994). Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia*, 1067-1074.

**Martínez, E., Thomas, M. C., Alonso, V., Carmelo, E., González, A. C., del Castillo, A. and Valladares, B.** (2001). Cloning and molecular characterization of the cDNA encoding histone H1 from *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.* En prensa.

**Matsudaira, P.** (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, **26**: 10035-10038.

**Matthews, R. C. and Bournie, J.** (1992). The role of hsp90 in fungal infection. *Immunol. Today*, **13**: 345-348.

**Medina-Acosta, E. and Cross, G.** (1993). Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **59**: 327-330.

**Melnick, J. and Argon, Y.** (1995). Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. *Immunol. Today*, **16**: 243-250.

**Melnick, J., Dul, J. L. and Argon, Y.** (1994). Sequential interaction of chaperonin Bip and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, **370**: 373-375.

**Minoprio, P., Itohara, S., Heusser, C., Tonegawa, S. and Coutinho, A.** (1989). Immunobiology of *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-non-specific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol. Rev.*, **112**: 183-207.

**Minota, S., Cameron, B., Welch, W. J. and Winfield, J. B.** (1988). Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*, **168(4)**: 1475-1480.

**Minowada, G. and Welch, W. J.** (1995). Clinical implications of the stress response. *J. Clin. Invest.*, **95**: 3-12.

**Montalbán, C., Calleja, J. L., Erice, A., Laguna, F., Clotet, B., Podzamczar, D., Cobo, J., Mallolas, L., Yebra, M. and Gallego, A.** (1990). Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Cooperative 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.

- Moroi, Y., Mayhew, M., Trcka, J., Hoe, M. H., Takechi, Y., Hartl, F. U., Rothman, J. E. and Houghton, A. N.** (2000). Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97(7)**: 3485-3490.
- Morrisey, J. H.** (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, **117**: 307-310.
- Mosier, D. and Sieburg, H.** (1994). Macrophage-tropic HIV: critical for AIDS pathogenesis?. *Immunol. Today*, **15**: 332-339.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I. and Massie, B.** (2000). The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, **20(19)**: 7146-7159.
- Muhich, M. and Boothroyd, J.** (1988). Polycistronic transcripts in Trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor in mRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 3837-3846.
- Murphy, W. J., Watkins, K. P. and Agabian, N.** (1986). Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome RNA processing: evidence for trans-splicing. *Cell*, **47**: 517-525.
- Myers, E. W. and Miller, W.** (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.*, **4(1)**: 11-17.
- Nafziger, D. A., Recinos, R. F., Hunter, C. A. and Donelson, J. E.** (1991). Patients infected with *Leishmania donovani chagasi* can have antibodies that recognize heat shock and acidic ribosomal proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **49**: 325-328.
- Oka, M., Sato, S., Soda, H., Fukuda, M., Kawabata, S., Nakatomi, K., Shiozawa, K., Nakamura, Y., Ohtsuka, K. and Kohno, S.** (2001). Autoantibody to heat shock protein hsp40 in sera of lung cancer patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, **92(3)**: 316-320.



**Pedrosa Valli, L. C., Azaredo Passos, V. M., Callahan, H. L., Berman, J. D. and Grogl, M.** (1999). Humoral immune responses among humoral mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.*, **85**: 1076-1083.

**Pelham, H. R. B.** (1990). En: *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos, p. 287-299. Cold Spring Harbor, New York.

**Piller, K. J., Decker, C. J., Rusche, L. N. and Sollner-Webb, B.** (1995). *Trypanosoma brucei* mitochondrial guide RNA-mRNA chimera-forming activity cofractionates with an editing-domain-specific endonuclease and RNA ligase and is mimicked by heterologous nuclease and RNA ligase. *Mol. Cell. Biol.*, **15**(6): 2925-2932.

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

**Planelles, L., Thomas, M. C., Alonso, C. and López, M. C.** (2001). DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP-11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect. Immun.*, **69**: 6558-6563.

**Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M. and Alonso, C.** (1998). Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immunol. Lett.*, **63**: 169-174.

**Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M., Gómez, L. C., Guzman, F., Patarroyo, M. E. and Alonso, C.** (1996<sup>a</sup>). Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* Hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol. Lett.*, **52**: 73-79.

**Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M. and Alonso, C.** (1996<sup>b</sup>). During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology*, **112**: 277-284.

**Quijada, L., Soto, M., Alonso, C. and Requena, J. M.** (1997). Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *J. Biol. Chem.*, **272** (7): 4493-4499.

- Ramírez, J. R., Berberich, C., Jaramillo, A., Alonso, C. and Velez, I. D.** (1998). Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**: 247-254.
- Reed, S. G., Badaro, R. and Lloyd, R. M. C.** (1987). Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *J. Immunol.*, **138(5)**: 1596-1601.
- Reiner, S. L., Fowell, D. J., Moskowitz, N. H., Swier, K., Brown, D. R., Brown, C. R., Turk, C. W., Killeen, N. and Locksley, R. M.** (1998). Control of *Leishmania major* by monoclonal alpha beta T cell repertorie. *J. Immunol.*, **160**: 884-889.
- Requena, J. M., Alonso, C. and Soto, M.** (2000). Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol. Today*, **16**: 246-250.
- Requena, J. M., López, M. C., Jimenez-Ruiz, A., de la Torre, C. and Alonso, C.** (1988). A head- to tail tandem organization to hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic. Acids Res.*, **16**: 1393-1406.
- Requena, J. M., López, M. C., Jimenez-Ruiz, A., Morales, G. and Alonso, C.** (1989). Complete nucleotide sequence of the hsp70 gene of *T. cruzi*. *Nucl. Acids Res.*, **17**: 797.
- Requena, J. M., Soto, M., Guzman, F., Maekelt, A., Noya O., Patarroyo, M. E. and Alonso, C.** (1993). Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* Hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol. Immunol.*, **30**: 1115-1121.
- Rey-Ladino, J. A., Joshi, P. B., Sing, B., Gupta, R. and Reiner, N. E.** (1997). *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxi terminal peptide sequences. *Exp. Parasitol.*, **85**: 249-263.
- Rico, A. I., Angel, S. O., Alonso, C. and Requena, J. M.** (1999). Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol. Immunol.*, **36**: 1131-1139.
- Ridley, D. S.** (1987). Pathology. En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick, p. 655-702. Academic Press.

- Roberts, J., Menoret, A., Basu, S., Cohen, N. and Srivastava, P. R.** (2001). Phylogenetic conservation of the molecular and immunological properties of the chaperones gp96 and hsp70. *Eur. J. Immunol.*, **31(1)**: 186-195.
- Rolland-Burger, L., Rolland, X., Grieve, C. W. and Monjour, L.** (1991) Immunoblot analysis of the humoral immune response to *L. dovonani infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **29(7)**: 1429-1435.
- Roman, E., Moreno, C. and Young, D.** (1994). Mapping of Hsp70-binding sites on proteins antigens. *Eur. J. Biochem.*, **222**: 65-73.
- Rothstein, N. M., Higashi, G., Yates, J. and Rajan, T. V.** (1989). *Onchocerca volvulus* heat shock protein 70 is a major immunogen in amicrofilaremic individuals from a filariasis-endemic area. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **33**: 229-236.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. and Rhoads, R. E.** (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl. Acids Res.*, **18**: 6409-6412.
- Saez-Alquézar, A., Sabino, E. C., Salles, N., Chamone, D. F., Hulstaert, F., Pottel, H., Stoops, E. and Zrein, M.** (2000). Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen Line Immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 851-854.
- Samaras, N. and Spithill, T. W.** (1987). Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **25**: 279-291.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. C. S. H. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Böhm, W. and Reimann, J.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 2016-2023.
- Scharton-Kersten, T., Afonso, L. C. C., Wysocka, M., Trinchieri, G. and 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**: 5320-5330.

- Schild, H., Arnold-Schild, D., Lammert, E. and Rammensee, H. G.** (1999). Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Op. Immunol.*, **11**: 109-113.
- Schirmbeck, R., Böhm, W. and Reimann, J.** (1997). Stress protein (hsp73)-mediated, TAP-independent processing of endogenous, truncated SV 40 large T antigen for D<sup>b</sup>-restricted peptide presentation. *Eur. J. Immunol.*, **27**: 2016-2023.
- Scholler, J. K., Reed, S. G. and Stuart, K.** (1986). Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **36**: 161.
- Schueller, G., Paolini, P., Friedl, J., Stift, A., Dubsky, P., Bachleiter-Hofmann, T., Jakesz, R. and Gnant, M.** (2001). Heat treatment of hepatocarcinoma cells: increased levels of heat shock proteins 70 and 90 correlate with cellular necrosis. *Anticancer Res.*, **21(1A)**: 295-300.
- Searle, S., McCrossan, M. V. and Smith, D.** (1993). Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Cell Sci.*, **104**: 1091-1100.
- Selkirk, M. E., Denham, D. A., Patorno, F. and Maizels, R. M.** (1989). Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in Brugian filariasis. *J. Immunol.*, **143**: 299-308.
- Shapira, M., McEwen, J. G. and Jaffe, C. L.** (1988). Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.*, **7**: 2895-2901.
- Shinnick, T. M.** (1991). Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **167**: 145-160.
- Silva, L. H. P. and Nussenzweig, V.** (1953). Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, **23**: 197-203.
- Simpson, L.** (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**: 363-382.
- Skeiky, Y. A. W., Benson, D. R., Guderian, J. A., Whittle, J. A., Bacelar, O., Carvalho, E. M. and Reed, S. G.** (1995). Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infec. Immun.*, **63**: 4105-4114.

- Sogin, M. L., Elwood, H. J. and Gunderson, J. H.** (1986). Evolutionary diversity of eukariotic small subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 1383-1387.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L. and 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., Angel, S. O., Gómez, L. C., Guzmán, F., Patarroyo, M. E. and Alonso, C.** (1995<sup>a</sup>). 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., Guzmán, F., Patarroyo, M. E. and Alonso, C.** (1995<sup>b</sup>). Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol. Lett.*, **48**: 23-28.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **98**: 503-517.
- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E. and Li, Z.** (1994) Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, **39**: 93-98.
- Stuart, K.** (1991). RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**: 327-344.
- Stuart, K. and Feagin, J. E.** (1992). Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int. Rev. Cytol.*, **141**: 65.
- Sturm, N. R. and Simpson, L.** (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell*, **61**: 879-884.
- Suzue, K. and Young, R. A.** (1996). Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *J. Immunol.*, **156**: 873-879.
- Swindle, J. and Tait, A.** (1996). Trypanosomatid genetics. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Frontiers in Molecular Biology, 13). Eds. D.F. Smith y M. Parsons.

- Tabor, S. and 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. U.S.A.*, **92(14)**: 6339-6343.
- Thomas, M. C., Longobardo, M. V., Carmelo, E., Marañón, C., Planelles, L., Patarroyo, M. E., Alonso, C. and López, M. C.** (2001). Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin. Exp. Immunol.*, **123**: 1-8.
- Tissières, A., Mitchell, H. T. and Tracy, U. M.** (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, **84**: 389-398.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 4350-4354.
- Trujillo, C., Ramírez, R., Vélez, I. D. and Berberich, C.** (1999). The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol. Lett.*, **70**: 203-209.
- Twomey, B., McCallum, S., Dhillon, V., Isenberg, D. and Latchman, D.** (1992). Transcription of the genes encoding the small heat shock protein ubiquitin is unchanged in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, **13(3)**: 197-200.
- Ullu, E. K., Matthews, K. R. and Tschudi, C.** (1993). Temporal order of RNA processing reaction in trypanosomes: rapid trans-splicing precedes polyadenylation of newly synthesised tubulin transcripts. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 720-725.
- Van der Ploeg, L. H. T., Gianni, S. H. and Cantor, C. R.** (1985). Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*, **228**: 1443-1446.
- Vegara, P. R.** (1992). Aislamiento y caracterización del gen codificante para la Hsp70 de *Leishmania mexicana*. Tesis Doctoral. Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, C.S.I.C., Universidad de Granada.

- Velázquez, J. M., DiDomenico, B. J. and Lindquist, S.** (1980). Intracellular localization of heat shock proteins in *Drosophila*. *Cell*, **20**: 679-689.
- Wallace, G. R., Ball, A. E., MacFarlane, J., el Safi, S. H., Miles, M. A. and Kelly, J. M.** (1992). Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infec. Immun.*, **60**: 2688-2693.
- Welch, W. J.** (1992). Mammalian cell stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.*, **7**: 1063-1081.
- WHO** (1995). Report on the consultative meeting on *Leishmania*/HIV coinfection. WHO/Leish/95.35. Ginebra, Suiza.
- WHO** (1998). Communicable Disease Surveillance and Response (CSR).
- WHO** (1998). *Leishmania*/HIV co-infections in south-western Europe, 1990-1998, retrospective analysis of 965 cases.
- WHO** (2000). Leishmaniasis Fact Sheet, 116.
- Wilde, H. M. and Kaderbhai, M. A.** (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucl. Acids Res.*, **18**: 1660.
- Williams, D. B. and Watts, T. H.** (1995). Molecular chaperones in antigen processing. *Curr. Opin. Immunol.*, **7**: 77-84.
- Yeyati, P. L., Bonnefoy, S., Mirkin, G. Debrabant, S. L., Panebra, A., González-Cappa, E., Dedet, J. P., Hontebeyrie-Joskowicz, M. and Levin, M. J.** (1991). The 70-kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. *Immunol. Lett.*, **31**: 27-34.
- Young, D. B.** (1992). Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **4**: 396-400.
- Young, D. B., Mehlert, A. and Smith, D. F.** (1990). Stress proteins and infectious diseases. En: *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Eds. R. I. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos, p. 131-165. C. S. H. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Young, D. B., Garbe, T. and Lathigra, R.** (1991). En: *Heat Shock*. Eds. B. Maresca y S. Lindquist, p. 203-208. Springer-Verlag.

**Zhong, G. and Brunham, R. C.** (1992). Antigenic analysis of the chlamydial 75-kilodalton protein. *Inf. Immun.*, **60**: 1221-1234.

**Zügel, U. and Kaufmann, S. H. E.** (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**: 19-39.





## **ABREVIATURAS**

---



## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ANA: “*anti-nuclear antibodies*” o anticuerpos antinucleares

APC: célula presentadora de antígenos

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BCIP: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil

bp: pares de bases

CK2: casein kinasa II

DMSO: dimetil sulfóxido

DNAsa: desoxirribonucleasa

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

DO<sub>x</sub>: densidad óptica a una longitud de onda de x nm.

EDTA: ácido etilenendiaminotetracético

ELISA: ensayo inmunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)

Hsc: proteína de choque térmico “*cognate*” o no inducible por estrés

Hsp: “Heat shock protein” o proteína de choque térmico

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN- $\gamma$ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

kADN: ADN del kinetoplasto

kb: kilobases

kDa: kilodaltons

LC: leishmaniasis cutánea

LCD: LC difusa

LDPK: leishmaniasis dérmica post-Kala azar

LES: lupus eritematoso sistémico

LMC: leishmaniasis mucocutánea

LV: leishmaniasis visceral

M: molar

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NBT: cloruro de nitroblue-tetrazolium

NK: célula “*natural killer*” o asesina natural

NLS BP: secuencia de localización nuclear de tipo bipartito

nm: nanómetros

ORF: pauta abierta de lectura

p/v: peso/volumen

PBMC: células mononucleares sanguíneas periféricas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PKC: protein kinasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RNAsa: ribonucleasa

SDS: dodecil sulfato sódico

TAP: transportador asociado con el procesamiento de antígenos

Th: célula T colaboradora

Tm: temperatura de anillamiento

Tris: trihidroximetil aminometano

Tyr K: tirosina kinsa

U: unidad

ufc: unidades formadoras de calvas

UPR: “*upstream region*” o región corriente arriba

UTR: “*untranslated region*” o región no traducida

v/v: volumen/volumen

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

x g: fuerza centrífuga relativa

