

**INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA “LÓPEZ NEYRA”.
C.S.I.C., GRANADA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**"ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE MOLÉCULAS
QUIMÉRICAS FORMADAS POR ANTÍGENOS DE
LEISHMANIA INFANTUM ASOCIADOS O NO AL PÉPTIDO
INMUNOMODULADOR h70T. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD
PROTECTIVA DE LAS MISMAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR
LEISHMANIA"**

Directores de tesis:

Memoria presentada por:

Manuel Carlos López López M^a Carmen Thomas Carazo

M^a Elena Cabrera Cazorla

Granada 29 de Julio de 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Elena Cabrera Cazorla
D.L.: GR.1791-2008
ISBN: 978-84-691-5647-6

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

1

- 1.1. *Leishmania* sp. Características generales
 - 1.1.1. Clasificación filogenético
 - 1.1.2. Ciclo de vida
- 1.2. Leishmaniasis
 - 1.2.1. Epidemiología de leishmaniasis
 - 1.2.2. Manifestaciones clínicas de leishmaniasis en humanos
 - 1.2.2.1. Leishmaniasis cutánea
 - 1.2.2.2. Leishmaniasis mucocutánea
 - 1.2.2.3. Leishmaniasis visceral
 - 1.2.2.4. Coinfección *Leishmania*-SIDA
 - 1.2.3 Diagnóstico y tratamiento
 - 1.2.4 Respuesta inmunológica frente a la infección por *Leishmania*
 - 1.2.4.1 Respuesta inmunológica innata
 - 1.2.4.2 Respuesta inmunológica adquirida
- 1.3. Respuesta en modelo experimental murino
 - 1.3.1. Respuesta inmunológica en ratones BALB/c
 - 1.3.2. Respuesta inmunológica en ratones C57BL/6
- 1.4. Antígenos de *Leishmania* de interés por su capacidad inmunogénica
 - 1.4.1. Metaloproteasa gp63 o leishmanolysin
 - 1.4.2. KMP11
 - 1.4.3. PSA-2
 - 1.4.4. Otras moléculas de interés inmunógeno
 - 1.4.4.1. Cystein proteasas
 - 1.4.4.2. Lipofosfoglicanos
 - 1.4.4.3. Proteofosfoglycanos-PPG
- 1.5. Vacunas frente a *Leishmania*
 - 1.5.1. Vacunas de parásitos vivos
 - 1.5.2. Vacunas de parásitos muertos y atenuados
 - 1.5.3. Vacunas que usan virus recombinantes y microorganismos
 - 1.5.4. Vacunas de proteínas
 - 1.5.5. Vacunas genéticas

- 1.5.5.1. Esqueleto de ADN: secuencias estimuladoras y unidad de transcripción
- 1.5.5.2. Vías de administración
- 1.5.5.3. Presentación de antígenos tras la vacunación genética
- 1.5.5.4. Seguridad de vacunas genéticas
- 1.5.5.5. Vacunas de ADN frente a *Leishmania*
- 1.5.6. Memoria generada por las vacunas frente a *Leishmania*
- 1.6. Proteínas de choque térmico. Capacidad adyuvante
 - 1.6.1. HSP70

2. OBJETIVOS 45

3. MATERIAL Y MÉTODOS 47

- 3.1. Productos químicos y material básico
- 3.2. Tampones y soluciones
- 3.3. Enzimas
- 3.4. Anticuerpos
- 3.5. Oligonucleótidos sintéticos
- 3.6. Medios de cultivo
- 3.7. Cepas bacterianas
- 3.8. Cultivo de líneas celulares de mamífero
- 3.9. Cepas de ratones
- 3.10. Purificación de ADN plasmídico
- 3.11. Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas
- 3.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- 3.13. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa
- 3.14. Clones recombinantes
- 3.15. Construcción de clones recombinantes
- 3.16. Transformación de *E. coli* con los plásmidos de ADN recombinantes
 - 3.16.1. Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes
 - 3.16.2. Selección de colonias recombinantes de *E. coli*
- 3.17. Secuenciación de ADN
- 3.18. Purificación de las distintas proteínas recombinantes a estudio
 - 3.18.1. Purificación de la proteína KMP11Li
 - 3.18.2. Purificación de la proteína PSA-NH₂Li

- 3.18.3. Purificación de la proteína PSA-COO
- 3.18.4. Purificación de la proteína Tgp63Li
- 3.18.5. Purificación de las proteínas recombinantes Q4Li y Q5Li
- 3.18.6. Purificación de las proteínas recombinantes KMP11-HSP70; KMP11-h70T; KMP11-h70TA y KMP11-h70TC
- 3.18.7. Purificación de las proteínas Glía33x2-HSP70 y Glía33-HSP70
- 3.18.8. Purificación de la proteína Glía33-h70T
- 3.18.9. Purificación de la proteína Glía33x2
- 3.18.10. Purificación de las proteínas C-LYT-Glía33, C-LYT-KMP11 y C-LYT
- 3.19. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida: SDS-PAGE
- 3.20. Inmunodetección de proteínas fijadas en membranas ("Western blot")
- 3.21. Expresión de proteínas recombinantes en células eucariotas por los vectores recombinantes de pCMV4
- 3.22. Protocolo de inmunización de ratones con proteínas recombinantes a estudio y plásmidos de ADN
- 3.23. Detección de anticuerpos en suero frente a proteínas recombinantes mediante ELISA
- 3.24. Procesamiento de células de bazo y ganglios linfáticos
- 3.25. Ensayo de linfoproliferación
- 3.26. Inmunodetección de proteínas de la superficie celular mediante citometría de flujo
- 3.27. Determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares
 - 3.27.1. Determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares mediante ELISA
 - 3.27.2. Determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares mediante citometría de flujo
- 3.28. Análisis de actividad citotóxica en esplenocitos de ratones inmunizados
 - 3.28.1. Estimulación de los esplenocitos *in Vitro*
 - 3.28.2. Ensayo de liberación de ⁵¹Cr
- 3.29. Obtención de formas promastigotes metacíclicos de *Leishmania major*
- 3.30. Obtención de formas infectivas de *Leishmania infantum*
- 3.31. Infección de ratones con *Leishmania sp*
- 3.32. Obtención de células de distintos órganos de ratones infectados con *Leishmania sp*

3.32.1. Obtención de células de bazo, hígado y ganglios linfáticos de ratones infectados con *Leishmania sp*

3.32.2. Obtención de células derivadas de médula ósea procedente de ratones infectados con *Leishmania infantum*

3.32.3. Obtención de células dérmicas de las orejas procedentes de ratones infectados con *Leishmania major*

3.33. Extracción de proteínas totales de *L. major* y *L. infantum*

4. RESULTADOS

73

4.1. Capacidad adyuvante de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi* usada como proteína de fusión

4.1.1. Activación de respuesta humoral inducida frente al antígeno KMP11 de *T. cruzi*. Análisis del tipo de inmunoglobulinas inducidas y de la dependencia de haplotipo y edad del ratón

4.1.1.1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes KMP11, KMP11-HSP70 y KMP11-h70T

4.1.1.2. Determinación del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones BALB/c de 7 semanas

4.1.1.3. Determinación del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones BALB/c de 11 semanas

4.1.1.4. Determinación de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones C57BL/6 de 7 semanas

4.1.1.5. Determinación del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones C57BL/6 de 11 semanas

4.1.2. Análisis de la respuesta humoral inducida frente al antígeno KMP11 de *T. cruzi* usado como inmunógeno asociado a otras moléculas no relacionadas con la HSP70

4.1.2.1. Clonaje, expresión y purificación de la proteína C-LYT-KMP11

4.1.2.2. Determinación del nivel de anticuerpos generado en ratones C57BL/6 frente a las moléculas KMP11, C-LYT y HSP70

4.1.3. Activación de la respuesta humoral inducida frente al polipéptido Glía33 asociado como proteína de fusión a la proteína HSP70. Análisis de la especificidad de respuesta y vía de inoculación

4.1.3.1. Expresión y purificación de las correspondientes proteínas recombinantes

4.1.3.2. Determinación del nivel de anticuerpos (IgM e IgG) generado frente a la molécula Glía33 en ratones inmunizados con las distintas proteínas recombinantes

4.1.4. Activación de una respuesta celular (linfocitos T citotóxicos) inducida frente al antígeno KMP11 por la molécula HSP70. Análisis del fragmento de HSP70 que porta tal actividad *carrier*

4.1.4.1. Construcción de vectores recombinantes

4.1.4.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes KMP11-HSP70, KMP11-h70T, KMP11-h70TA y KMP11-h70TC. Ensayo de inmunización

4.1.4.3. Determinación de la presencia de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno.

4.2. Estudio de la respuesta inmune inducida por las proteínas recombinantes quiméricas Q4LiP portando los antígenos de *Leishmania infantum* (KMP11, Tgp63, PSA.NH₂ y PSA-COO) y Q5LiP que incorpora a estos antígenos el fragmento h70T de *T. cruzi*, y de su capacidad de inducir protección frente a la infección por *Leishmania*

4.2.1. Determinación de la capacidad inmunogénica de las moléculas Q4LiP y Q5LiP

4.2.1.1. Inmunización de ratones y obtención de muestras para análisis de respuesta inmunológica

4.2.1.2. Respuesta humoral en ratones inmunizados con Q4LiP y Q5LiP

4.2.1.3. Respuesta celular. Proliferación celular frente a la proteína quimérica Q4LiP y los distintos antígenos que la componen

4.2.1.4. Respuesta citotóxica inducida por las proteínas quiméricas Q4LiP y Q5LiP

4.2.2. Determinación de la capacidad inmunomoduladora de específicos oligonucleótidos conteniendo secuencias CpG asociados a la molécula quimérica Q5LiP

4.2.2.1. Respuesta humoral frente a los antígenos de *L. infantum* componentes de la molécula quimérica Q5Li

4.2.2.2. Respuesta celular inducida frente a los antígenos de *L. infantum* componentes de la proteína quimérica Q5LiP

4.2.3. Determinación de la capacidad de inducir protección frente a la infección por *Leishmania infantum* de las moléculas Q5LiP y Q5LiP+IPB mod

4.2.4. Respuesta humoral frente a los antígenos Tgp63Li, KMP11Li, PSA-COOLi, PSA-NH₂Li en ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y Q5LiP+IPB mod e infectados con *L. infantum*

4.3. Ensayo de vacunación con la molécula quimérica de ADN que codifica los antígenos KMP11, Tgp63, PSA-NH₂ y PSA-COO de *Leishmania* (pQ4Li) y con dicha molécula fusionada al antígeno h70T, usado como adyuvante (pQ5Li)

4.3.1. Capacidad inmunogénica de las moléculas pQ4Li y pQ5Li

4.3.1.1. Respuesta humoral inducida por las moléculas de ADN pQ4Li y pQ5Li

4.3.1.2. Respuesta celular inducida por las moléculas de ADN pQ4Li y pQ5Li

4.3.1.2.1. Determinación de la capacidad proliferativa antígeno-específica de los esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a ensayo

4.3.1.2.2. Producción de citocinas por esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas pQ4Li y pQ5Li y estimuladas con las proteínas correspondientes a los antígenos de *Leishmania* componentes de las mismas

4.3.1.2.3. Inducción de linfocitos T citotóxicos (CTLs) antígeno específicos

4.4. Determinación de la capacidad de inducir protección frente a la infección con *Leishmania major* de las moléculas de ADN pQ4Li y pQ5Li

4.4.1. Determinación de las lesiones en orejas en los ratones infectados con *L. major*

4.4.2. Determinación de la carga parasitaria en las orejas de los ratones infectados con *L. major*

4.4.3. Respuesta humoral en ratones inoculados con las moléculas a estudio e infectados con *Leishmania major*

4.4.4. Producción de citocinas por esplenocitos de ratones inoculados con las moléculas a estudio e infectados con *L. major*

4.5. Transfección pasiva con células esplénicas procedentes de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *Leishmania major*

4.5.1. Respuesta humoral inducida en los distintos grupos de ratones usados en el ensayo de transfección pasiva de células

4.5.2. Análisis de la capacidad proliferativa antígeno específica de los esplenocitos de ratones usados en el ensayo de transfección pasiva celular e infectados con *L. major*

4.5.3. Determinación de las lesiones subdérmicas ocasionadas por la infección con *Leishmania major* en los distintos grupos de ratones usados en el ensayo de transfección pasiva celular

4.5.4. Determinación de la carga parasitaria en orejas de ratones inoculados por transferencia pasiva con las distintas células a ensayo e infectados con *L. major*

5. DISCUSIÓN **155**

5.1. Determinación de la capacidad adyuvante de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi*

5.2. Capacidad inmunológica y de inducir protección frente a la infección por *Leishmania infantum* de proteínas recombinantes quiméricas portando los antígenos KMP11, fragmentos amino y carboxilo de PSA-2 y Tgp63 de *Leishmania*.

5.3. Capacidad inmunogénica y de inducir protección frente a la infección por *Leishmania major* de los mencionados antígenos de *Leishmania* asociados o no a la h70T y usados como moléculas quiméricas de ADN.

6. CONCLUSIONES **169**

7. BIBLIOGRAFÍA **171**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Leishmania* sp. Características generales

1.1.1. Clasificación filogenética

El género *Leishmania* es un protozoo flagelado perteneciente al orden *Kinetoplastidae*. Este grupo se caracteriza por presentar una sola mitocondria de gran tamaño llamada kinetoplasto situada adyacente al cuerpo basal del flagelo. El ADN del kinetoplasto (kDNA) consistente en miles de copias de minicírculos y algunas copias de maxicírculos interconectados topológicamente formando una red (Simpson 1987). El kDNA supone entre un 10-30% del ADN total dependiendo de la especie, y su replicación se inicia casi simultáneamente a la replicación del ADN nuclear sugiriendo que las fases de síntesis de ADN (S) en el núcleo y en la mitocondria están reguladas coordinadamente (Pasion, Brown et al. 1994). Todos los kinetoplastos examinados comparten otras dos características únicas: compartimentalización de la glucólisis dentro del glicosoma (Michels and Hannaert 1994) y *trans-splicing* de una pequeña secuencia de RNA conservada – spliced leader o miniexon- a todos los RNA mensajeros (Campbell, Thornton et al. 1984). Así, esto sugiere que los kinetoplastos comprenden un único linaje. Además, análisis evolutivos moleculares basados en la comparación de secuencias de genes codificantes del ARN ribosomal, indican que los kinetoplastos son uno de los primeros linajes eucariotas que surgieron tras la adquisición de la mitocondria (Sogin, Elwood et al. 1986).

En este orden se encuadra la familia *Trypanosomatidae* en la que se incluyen especies de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. Los tripanosomátidos tienen un único flagelo y todos los géneros son parásitos de vertebrados, invertebrados, ciliados o plantas. Sin embargo, la familia *Bodonidae* también incluida en este orden, está principalmente constituida por especies de vida libre. De hecho, diversas aproximaciones han sugerido que el ancestro común de todos los kinetoplastos fue de vida libre (Wright, Li et al. 1999).

Dentro de los kinetoplastos se diferencian dos tipos de relaciones parásito-hospedador: kinetoplastos monogénicos, que parasitan un solo hospedador invertebrado, y kinetoplastos digénicos, que parasitan a dos

hospedadores, normalmente uno invertebrado y otro vertebrado. Las especies monogénicas son conocidas como "tripanosomátidos inferiores" pues se postula que los géneros digénicos como *Leishmania* y *Trypanosoma* provienen de un ancestro monogénico (Lake, de la Cruz et al. 1988). Sin embargo, el desarrollo del estilo de vida del parasitismo digénico ha sido objeto de controversia durante el siglo XX. Las dos teorías opuestas pueden resumirse en "primero invertebrado" o "primero vertebrado", dependiendo de cual fue el hospedador original del parasitismo monogénico.

El género *Leishmania* es más homogéneo en cuanto a secuencias repetidas de ADN que el género *Trypanosoma*, según estudios de homología de secuencia basada en secuencias repetitivas de ADN. Así, la diversidad existente dentro del género *Leishmania* es similar a la diversidad que presentan las distintas subespecies de *Trypanosoma cruzi*, parásito para el que se describe una sola especie (Tibayrenc, Neubauer et al. 1993). Además, las diferencias morfológicas entre las especies de *Leishmania* son difíciles de detectar. A pesar de esta homología también encontramos diferencias entre las especies; aproximadamente 30 especies infectan mamíferos (Shaw 1994) y 17 especies infectan reptiles (Telford 1979). Las especies que infectan a mamíferos se dividen en dos subgéneros, *L. Viannia* presente en el nuevo mundo y *L. Leishmania* que se encuentra tanto en el nuevo como en el viejo mundo (Lainson, Shaw et al. 1987). Solamente hay un género que parasite a los reptiles llamado *L. sauroleishmania* y únicamente se encuentra en el viejo mundo (Noyes, Chance et al. 1998).

Aunque exista una alta similitud morfológica entre las distintas especies de *Leishmania*, estas causan diferentes tipos de patologías en humanos, pudiendo provocar lesiones cutáneas, lesiones mucocutáneas y crónicas, y daños viscerales. Cada patología tiende a estar asociada a una especie o grupos de especies de *Leishmania*. Así, *L. trópica*, *L. mexicana*, *L. major* son algunas de las especies responsables de *L. cutánea*. *L. braziliensis* produce la variante mucocutánea y *L. donovani*, *L. infantum* son algunas de las productoras de leishmaniasis visceral.

1.1.2. Ciclo de vida

Leishmania posee un ciclo de vida complejo que incluye un hospedador invertebrado que es un insecto vector y un hospedador vertebrado. Este parásito adopta a lo largo de su ciclo de vida dos estadios morfológicos

principales: promastigote flagelado y amastigote no flagelado. La forma promastigote flagelada es alargada y se da cuando están en la probóscide del insecto vector y en el momento de entrar en macrófagos mamíferos. Dentro de esta fase promastigote hay dos subtipos, el promastigote procíclico que es el subtipo de la fase replicativa y el promastigote matacíclico que es el subtipo en fase infectiva y no replicativa, en la cual el parásito infecta a los macrófagos del hospedador mamífero. La forma amastigote es una forma redondeada y sin flagelo, que se encuentra en el interior de las células.

Todas las especies de *Leishmania* se transmiten por un insecto vector hembra, perteneciente al género *Phlebotomus* en el viejo mundo y al género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y está generalmente aceptado que es un parásito intracelular en macrófagos de mamíferos (Alexander and Russell 1992)

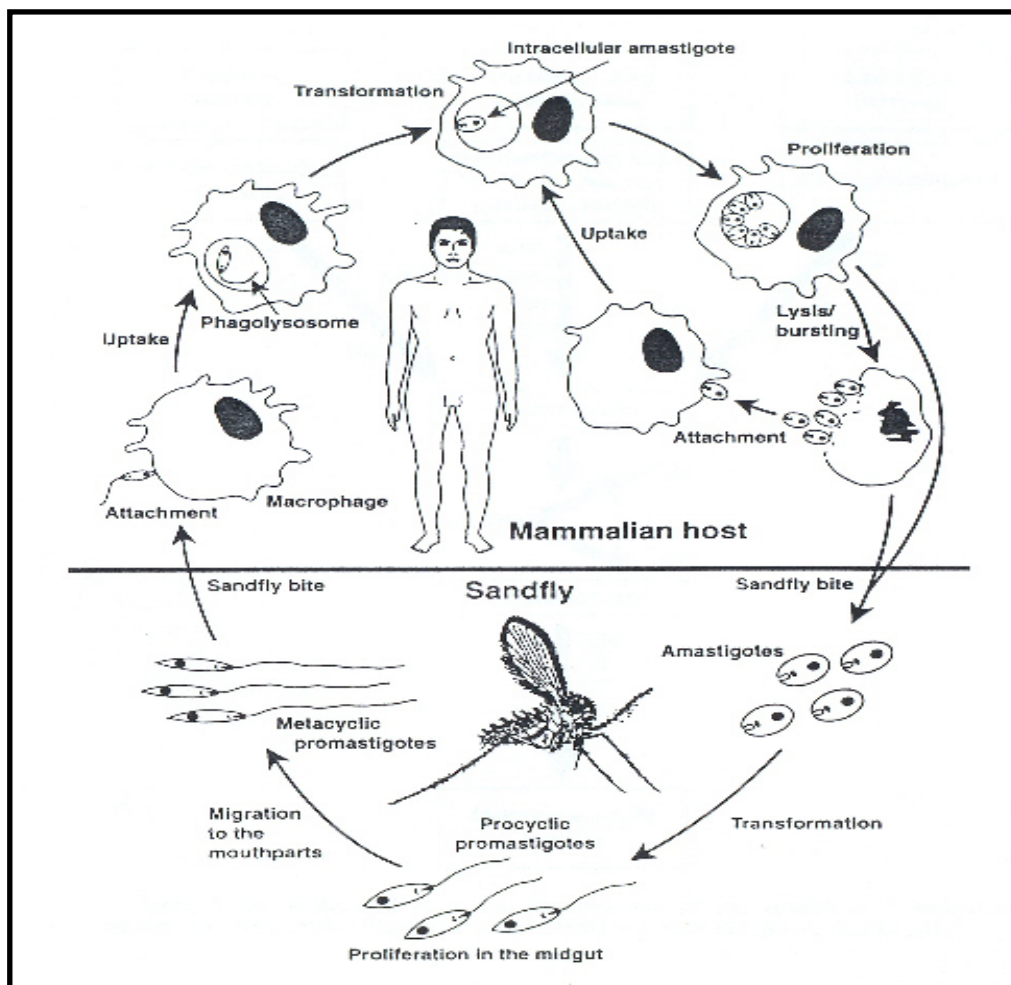


Figura1.- Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Evolución de las distintas formas del parásito según la fase del ciclo. Handman 1999.

El insecto vector tiene en el tracto intestinal los promastigotes procíclicos que se van replicando y avanzan a la probóscide donde pasan a promastigotes metacíclicos, de modo que cuando el insecto pica al hospedador vertebrado, secreta saliva con los promastigotes metacíclicos mientras ingiere sangre del hospedador (Sacks 1989; Schlein 1993). Una vez en el hospedador vertebrado, los promastigotes metacíclicos entran en los macrófagos y se incluyen en fagolisosomas, donde cambian al estadio amastigote. Esta forma redondeada y sin flagelo, es una forma replicativa. El alto número de parásitos intracelulares conlleva a que el macrófago estalle, con lo que estos amastigotes invaden otros nuevos macrófagos. En el momento en que el insecto pica a un hospedador vertebrado infectado, al ingerir la sangre, lleva formas amastigotes que se introducen en el tracto intestinal donde evolucionan a promastigotes procíclicos, iniciando de nuevo el ciclo de vida (Figura 1).

1.2. Leishmaniasis

1.2.1. Epidemiología de leishmaniasis

El conjunto de manifestaciones clínicas producidas por las distintas especies del género *Leishmania* es conocido como leishmaniasis. Esta enfermedad puede afectar tanto a hombres como animales, siendo así una zoonosis. Estas enfermedades son endémicas en 88 países en los que se encuentra el insecto vector y afecta principalmente a los países con recursos limitados, donde la población no se encuentra con el sistema inmunitario totalmente competente (OMS, 2005) Esta enfermedad es endémica en amplias zonas de las regiones tropicales, subtropicales y determinadas áreas de la región mediterránea, ciertas áreas de bosque húmedo de América y zonas desérticas de Asia occidental (Herwaldt 1999) Según la Organización mundial de la salud, se estima que hay 350 millones de personas afectadas por esta enfermedad infecciosa (OMS, 2007). Se estima que se producen 1,5 millones de casos nuevos cada año, siendo 1 millón de leishmaniasis cutánea (OMS, 2007) y 500.000 de leishmaniasis visceral (Chappuis, Sundar et al. 2007). A pesar de estos datos, solo son declarados unos 600.000 casos cada año ya que esta enfermedad sólo es de declaración obligatoria en 40 de los 88 países endémicos. En los últimos 10 años el tamaño de las regiones endémicas se ha extendido y el número de casos se ha visto incrementado (OMS, 2006). Se considera que una décima parte de la población mundial se encuentra en situación de riesgo de ser infectada por *Leishmania*. Por este motivo, la

leishmaniasis ha sido clasificada por la OMS en la categoría I de las enfermedades infecciosas, que son aquellas que están en situación emergente e incontrolada.

1.2.2. Manifestaciones clínicas de leishmaniasis en humanos

Hay 20 especies del género *Leishmania* que infectan a los humanos, causando las distintas manifestaciones patológicas que conforman la leishmaniasis

1.2.2.1. Leishmaniasis cutánea

También conocida como Botón de oriente es la forma más común y menos grave de leishmaniasis. Comienza como una pequeña lesión, conocida como mácula de color rojizo, pruriginosa y del tamaño de la cabeza de un alfiler, que en muchos casos puede pasar desapercibida. A los pocos días aumenta su volumen convirtiéndose en una pápula que en pocos días pasa a ser ulcerada. La lesión se extiende en superficie y profundidad causando más lesiones alrededor de la inicial. Los parásitos pueden invadir los cordones linfáticos, causando linfangitis y linfadenitis regional. En la mayor parte de los casos estas lesiones se curan espontáneamente pasados de tres a seis meses de la aparición de la lesión, pero dejan cicatrices permanentes. El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea se producen en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria (OMS, 2003). Se estima que hay 1 millón de casos nuevos cada año, siendo el 12% de ellos en Maghreb (OMS, 2007).

Hay una forma de leishmaniasis cutánea, conocida como leishmaniasis cutánea difusa que consiste en lesiones cutáneas no ulcerativas diseminadas por todo el cuerpo que cronifican y se relacionan con una falta de respuesta inmunitaria frente a los antígenos del parásito. Las lesiones son similares a las causadas por la Lepra. Este tipo de manifestación suele observarse en América central y la cuenca del Amazonas y está provocada por *Leishmania aethiopica*.

1.2.2.2. Leishmaniasis mucocutánea

Se conoce también como espundida y se caracteriza por lesiones cutáneas que en la mayoría de los casos, evolucionan afectando a distintas zonas mucosas como el tabique nasal, boca, laringe, incluso bronquios y tráquea. En estas lesiones mucosas ya no existe tendencia a la cura

espontánea. La mortalidad es baja pero produce graves mutilaciones desfigurantes y puede llegar a causar la pérdida de algunos sentidos como el olfato o el oído. El 90 % de los casos se dan en Bolivia, Brasil y Perú (OMS, 2003).

1.2.2.3. Leishmaniasis visceral

Es conocida como Kala-azar y consiste en la infección de órganos viscerales debido a un fallo del sistema inmunitario (Kaye, Svensson et al. 2004). No se suelen producir lesiones en el punto de infección y las primeras manifestaciones se dan tras un periodo de incubación de 4 a 10 meses. Estas manifestaciones consisten en cefaleas, hepatomegalia, esplenomegalia, fiebre, astenia, diarrea, anemia, dolor abdominal, leucopenia, caquexia, trombocitopenia, hipergammaglobulinemia, hipoalbuminemia y activación policlonal de células B (Herwaldt 1999; Kaye, Svensson et al. 2004; Chappuis, Sundar et al. 2007). Esta activación de células B provoca la existencia de inmunocomplejos circulantes que, a veces, se depositan en los riñones causando glomerulonefritis. Existe linfadenopatía generalizada que afecta principalmente a los ganglios mesentéricos. Otra de las características de esta grave afección es la falta de respuesta celular frente a los antígenos del parásito. La leishmaniasis visceral ocasiona la muerte del paciente si no es tratado a tiempo. Esta es la leishmaniasis con mayor índice de mortalidad. El 90% de los casos se producen en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán (OMS, 2003). La cuenca mediterránea es endémica de leishmaniasis visceral. Se estima que hay 500.000 nuevos casos cada año, con más de 50.000 muertes al año (Chappuis, Sundar et al. 2007). En algunos casos los enfermos curados sufren luego una leishmaniasis dérmica conocida como post Kala-azar responsable de lesiones deformantes y con necesidad de un largo y costoso tratamiento (Desjeux 2004). El país con mayor frecuencia de este tipo de afección es la India. En España, los casos de leishmaniasis suelen ser leishmaniasis visceral provocada por *Leishmania infantum*. El perro es el principal reservorio en la Península Ibérica, al menos de *L. infantum* (Zimodema I), siendo así la leishmaniasis canina una enfermedad endémica. No todos los perros infectados manifiestan patología y el periodo asintomático es largo aunque posteriormente desarrolle la patología, siendo un reservorio de la enfermedad. En el perro, la leishmaniasis visceral suele tener manifestaciones cutáneas. Se ha descrito una cierta correlación entre la

incidencia de la infección canina y la incidencia de la misma en humanos (Nakhaee, Taheri et al. 2004).

1.2.2.4. Coinfección *Leishmania*-Sida

Esta coinfección se ha incrementado enormemente en los últimos años debido al aumento de los casos de SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Los dos organismos causantes de ambas enfermedades actúan de modo sinérgico, favoreciendo la infección recíproca, causando una mayor inmunosupresión y una progresión más rápida de ambas enfermedades (Wolday, Akuffo et al. 1999; Desjeux 2004). La manifestación clínica consiste en una patología similar a la leishmaniasis visceral. El SIDA incrementa el riesgo de sufrir leishmaniasis visceral de 100 a 1000 veces en las regiones endémicas. Los casos de coinfección se dan con alta frecuencia en Brasil y en el sudeste europeo donde se localizaban 1440 casos de los 1700 primeros casos descritos, siendo 835 de ellos, en España.

Según la especie de *Leishmania* que infecta al hospedador, este desarrolla una patología diferente, ya que cada una de las patologías está provocada por determinadas especies de *Leishmania*. Se ha visto que las especies que provocan leishmaniasis cutánea o mucocutánea pueden visceralizar (Handman 2001). El estado de salud del hospedador está muy relacionado con la manifestación que se produce. Así, un estado de malnutrición, de estrés o de inmunodeficiencia es el que conlleva una mayor patología. La predisposición genética del hospedador también influye en el desarrollo de la enfermedad (Lipoldova and Demant 2006).

Los casos de leishmaniasis visceral han incrementado mucho en los últimos años debido a la aparición del SIDA, sufriendo un aumento alarmante a principio de los años 90 que posteriormente ha sido reducido por el uso de medicamentos antirretrovirales (Pascual, Monasterio et al. 2007).

1.2.3. Diagnóstico y tratamiento

La leishmaniasis se ha identificado desde hace décadas de forma directa mediante la identificación de los amastigotes en tinciones hematológicas de punciones esplénicas, de médula ósea y de ganglios linfáticos o procedentes de cultivos generados a partir de tejidos infectados. Dada la dificultad de estos diagnósticos, se han desarrollado métodos de diagnóstico indirectos, como el método de ELISA (Desjeux 2004). Para estos diagnósticos se emplean

proteínas totales del parásito o proteínas recombinantes para reducir el riesgo de falsos positivos. Otra técnica muy sensible y específica consiste en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero tiene el inconveniente de ser más costosa y solo disponible en laboratorios especializados (Riera, Fisa et al. 2005).

En España se ha descrito el caso de un paciente con obstrucción pulmonar crónica, hospitalizado por hipotensión, astenia y ausencia de fiebre, al que se le realizó una punción de médula ósea, observándose leucocitopenia y un alto contenido de amastigotes. Se inició tratamiento con Antimoniato de meglumina, el paciente entró en shock y murió 6 horas después. Este caso ha hecho que el tratamiento de pacientes inmunodeprimidos e infectados con *Leishmania* sea discutido (García-Córdoba, Ortuno et al. 2005).

El tratamiento clásico consiste en derivados antimoniales pentavalentes como es el Estibogluconato sódico (Pentostam®) y Antimoniato de meglumina (Glucantime®) que son efectivos frente a las distintas formas clínicas inhibiendo enzimas que participan en la glicólisis y β -oxidación. Los fármacos de segunda generación son la Anfotericina B, Pentamidina, Alopurinol, Azoles e inmunomoduladores como el interferón- γ (IFN- γ) recombinante. Estos tratamientos son efectivos en la mayor parte de los casos pero resultan costosos y conllevan inconvenientes por su forma de administración, por provocar efectos adversos como fatiga, dolor corporal, etc. y porque se han descrito numerosos casos de resistencia.

Por otra parte, el control vectorial también es muy importante para reducir el número de casos de nueva infección. Este control se basa en el uso de mosquiteras y de insecticidas para evitar la picadura por parte del insecto vector. Otro modo de prevención es el control de los reservorios, como es el perro. Para esto es necesario un diagnóstico rápido, que no siempre es posible debido al periodo variable de incubación, y el empleo de insecticidas caninos (Desjeux 2004).

1.2.4. Respuesta inmunológica frente a la infección por *Leishmania*

1.2.4.1. Respuesta inmunológica innata

Cuando el parásito entra en el hospedador mamífero, a lo primero que se enfrenta es a las proteínas del complemento. Estas proteínas constituyen una defensa del organismo frente a los microorganismos, sin embargo, algunos agentes patógenos como *Leishmania*, han desarrollado mecanismos

para escapar de este sistema de defensa del organismo hospedador. La activación de las proteínas séricas del complemento tiene como finalidad la lisis del parásito mediante la formación de poros en la membrana. Los parásitos activan la producción de C3b que, al depositarse en la membrana del parásito, favorece que este sea fagocitado por macrófagos. Los promastigotes metacíclicos tienen resistencia al complemento debido a que C3b, no se une a la membrana del parásito, ya que no puede acceder a la misma debido a la densa capa de lipofosfoglicanos de esta y a que la glicoproteína de superficie, gp63, con actividad metaloproteasa, escinde C3b a su forma inactiva C3bi. Esta forma inactiva C3bi es incapaz de reclutar el complejo C5b-C9, de modo que se detiene la cascada lítica del complemento.

En el proceso de infección, la fagocitosis del parásito por parte de los macrófagos es el paso más importante ya que la entrada del parásito es el principal elemento que puede acabar con la infección mediante la lisis del parásito o, en caso contrario, permitir el establecimiento de la infección. Son varios los receptores que intervienen en esta unión parásito-macrófono. Por una parte, las formas C3b y C3bi asociadas a la membrana del parásito, interaccionan con los receptores del complemento RC1 y RC3. El receptor de fibronectina y los receptores de manosa y fructosa del macrófono se unen tanto a promastigotes como amastigotes. Los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas-Fc γ R- se unen a las inmunoglobulinas de la superficie de los amastigotes. Una vez dentro del macrófono, los parásitos se engloban en vacuolas a las que se unen lisosomas que acidifican el medio a pH de 4,5 y vierten enzimas proteolíticas que digieren y lisan al parásito. Sin embargo, *Leishmania* y otros parásitos han desarrollado mecanismos para evadir el efecto lítico de los macrófagos y poder evolucionar a amastigotes y dividirse en su interior hasta que este explota y los nuevos amastigotes se introducen en los macrófagos circundantes. Estos mecanismos de evasión consisten en que los lipofosfoglicanos (LPG) y la proteasa de superficie gp63 protegen al promastigote del pH ácido y de la presencia de enzimas líticas (Cunningham 2002).

Las proteínas liberadas por parte del parásito se asocian al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que actúa como transportador de antígenos a la superficie del macrófono. Si los antígenos son presentados por MHC I, son reconocidos por células T CD8⁺ (Tc). La activación de estas células lleva a la lisis del parásito y a la activación de los macrófagos.

Otro mecanismo de defensa del hospedador consiste en la producción por parte de los macrófagos de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. La producción de óxido nítrico por parte de la enzima Óxido nítrico sintasa es un mecanismo destacado para la destrucción del parásito pero, aún así, *Leishmania* es capaz de evadir el efecto citotóxico de estos intermediarios reactivos de oxígeno antes citados. Los lipofosfoglicanos (LPG) forman una barrera capaz de captar los radicales libres de oxígeno y enzimas como la catalasa y superóxido dismutasa son capaces de eliminarlos, de modo que el parásito puede superar este ataque.

Los macrófagos actúan como células presentadoras de los antígenos a las células T, activando la diferenciación a Th1, con la consiguiente producción de citocinas como IFN- γ , que es la respuesta necesaria para la destrucción del parásito. Sin embargo, *Leishmania* inhibe la diferenciación de células T CD4+ hacia Th1 y la producción de citocinas como IL-12 e IFN- γ . En esta inhibición intervienen lipofosfoglicanos y glicoinositolfosfolípidos que inhiben la transcripción del gen codificante de IL-12p40. Otro factor que interviene en esta inhibición es la unión de amastigotes opsonizados con IgG a Fc γ R, activando la producción de IL-10 por parte del macrófago (Kane and Mosser 2001).

Otro mecanismo de evasión de *Leishmania* consiste en la alteración de la señalización intracelular del macrófago. Los lipofosfoglicanos (LPG) son capaces de inhibir la fosforilación mediada por proteína quinasa K (PKC), la cual interviene en la transducción de señales extracelulares que permiten la activación del macrófago.

1.2.4.2. Respuesta inmunológica adquirida

La respuesta inmunológica que permite acabar con el parásito y que no se desarrolle patología, consiste en una respuesta de activación de macrófagos. Para esta respuesta es necesaria la activación de células T CD4+ y la diferenciación al subtipo Th1, induciendo una respuesta inflamatoria y citotóxica fundamental para la destrucción del parásito. La respuesta inflamatoria es debida a la producción de las citocinas IL-12, IFN- γ y TNF- α (Kaye, Svensson et al. 2004). La respuesta citotóxica es debida a la activación de células CD8+. Las citocinas TNF- α e IFN- γ intervienen en la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) responsable de la producción de óxido nítrico (NO). El óxido nítrico tiene alta capacidad para la destrucción del

parásito mediante la desaminación de bases de ADN dando lugar a diferentes mutaciones y a la oxidación de grupos sulfhidrilo y lípidos al reaccionar el óxido nítrico con aniones superóxido.

Los parásitos destruidos por los macrófagos liberan proteínas antigénicas que una vez procesadas, se asocian al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que actúa como presentador de antígenos a las células T. Si se asocian a MHC de clase I, se activa una respuesta citotóxica por parte de células CD8⁺. Si se asocian a moléculas de clase II son reconocidas por las células T CD4⁺ que pueden ser tipo Th1 o Th2 generando respuesta celular y humoral en el caso de Th1 y respuesta humoral en el caso de Th2.

Como previamente se ha dicho, la respuesta Th1 es la respuesta asociada a la superación de la infección (Sacks and Anderson 2004). Por el contrario, los casos en los que se sufre la patología están relacionados con una temprana activación de respuesta tipo Th2 que lleva a la producción de las citocinas IL-10 e IL-4, interviniendo también las células T reguladoras (Treg). Esta activación suprime el desarrollo de respuesta Th1 y facilita la invasión por parte del parásito (Sacks and Anderson 2004). Recientemente se ha descrito en pacientes de leishmaniasis cutánea, una temprana producción de IL-4 e IL-10. Pasados 60 días de la infección esta respuesta evoluciona hacia respuesta tipo Th1 con un incremento de IFN- γ , TNF- α y altos niveles en plasma de nitritos y nitratos. La evolución a una respuesta tipo Th1, siendo esta mayor que la respuesta tipo Th2, previene el crecimiento de los parásitos y el desarrollo de las lesiones (Baratta-Masini, Teixeira-Carvalho et al. 2007).

1.3. Respuesta en modelo experimental murino

El modelo murino es muy empleado en la investigación de la respuesta inmunológica frente a la infección por las distintas especies de *Leishmania*. En las investigaciones se emplean ratones de distintos haplotipos, unos que resultan resistentes a la infección y otros susceptibles a ella.

1.3.1. Respuesta inmunológica en ratones BALB/c

Este haplotipo de ratón se caracteriza por ser susceptible a la infección por *Leishmania*. Tras la infección se produce una rápida respuesta tipo Th2 caracterizada por la liberación de IL-4, IL-13 e IL-10. Empleando ratones *knock out* (ko) para cada una de estas citocinas, se produce mejoría pero no

cura total. El receptor de IL-4 e IL-13 es el mismo, de modo que ratones ko para este receptor y para IL-10, no sufren la enfermedad, así como ratones ko para el receptor de IL-4 e IL-13 y tratados con anti IL-10. Esto denota el papel de la respuesta Th2 en la manifestación de la patología tras la infección. Hay otro tipo de células implicadas, que son las células T reguladoras, CD4⁺CD25⁺, que activan la producción de IL-10 y suprimen las funciones efectoras de las células T favoreciendo la persistencia del parásito. Este tipo de células supone de un 5 a un 10% de la población de células T. Este tipo celular también está presente en humanos, donde también secretan alta cantidad de IL-10 y TGF- β suprimiendo la respuesta protectora *in vitro*. Si se tratan los ratones con anti CD25⁺, la respuesta Th2 se ve realmente comprometida, lo que implica el alto grado de importancia de estas células en la susceptibilidad a la infección en los ratones BALB/c (Sacks and Anderson 2004). La protección de estos ratones requiere la generación de respuesta tipo Th1 (Badiee, Jaafari et al. 2007). Todos estos datos han sido vistos principalmente en la infección por *Leishmania major*.

1.3.2. Respuesta inmunológica en ratones C57BL/6

Este haplotipo de ratón se considera resistente a la infección. En los casos con lesiones no curadas, se observa que no hay respuesta elevada de tipo Th2 y que la respuesta Th1 no se encuentra suprimida, pero aún así, existen lesiones. Estas lesiones se deben a la activación de células T reguladoras y a la producción por su parte de IL-10. En este haplotipo de ratón, parece que las células T reguladoras no comprometen la activación de respuesta Th1, lo que hace, junto con la ausencia de respuesta Th2, que las lesiones en estos ratones sean mucho más leves que en los ratones BALB/c.

En la infección con lesiones persistentes por *Leishmania major* se ha visto que, en caso de reinfección, los ratones C57BL/6 no sufren patología en el lugar de la nueva infección, ya que las células T reguladoras permanecen en el sitio inicial y no acuden al nuevo, permitiendo que sean las células tipo Th1 las que actúen y no permitan la implantación de los parásitos. Esto se conoce como inmunidad concomitante (Sacks and Anderson 2004).

1.4. Antígenos de *Leishmania* de interés por su capacidad inmunogénica

Leishmania presenta una alta variedad de moléculas que le permiten la infección de las células hospedadoras. Mediante estas moléculas de

Leishmania consigue evadir los primeros sistemas de defensa del organismo hospedador, alcanzando las células diana e internalizándose en ellas con la colaboración de algunas de estas moléculas que también participan en superar los elementos de lisis de dentro de la célula. Entre estas moléculas se encuentran las metaloproteasas como gp63, también conocida como leishmanolysin, presente en la superficie celular; los lipofosfoglicanos; proteofosfoglicanos; las cisteín proteasas; etc.

1.4.1. Metaloproteasa gp63 o leishmanolysin

La proteína gp63 es una glicoproteína de superficie con actividad proteasa. Esta proteína se localiza en la superficie del parásito en una gran densidad y está muy conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. gp63 se une a la membrana mediante anclaje GPI (Glicosilfosfatidilinositol). Esta molécula se identificó primero en el estadio promastigote del parásito y posteriormente se vió que también se encontraba presente en el estadio amastigote en el interior de los macrófagos. La actividad de la proteína varía entre los distintos estadios. En el estadio amastigote, la actividad de la misma es un 1% menor que la del estadio promastigote. La proteína es también procesada de distinta forma según el estado del ciclo: en promastigotes se localiza en la superficie celular, mientras que en amastigotes se encuentra mayoritariamente en el bolsillo flagelar aunque una pequeña parte esté presente en la membrana celular, pudiendo encontrarse también en la fracción lisosomal. La actividad proteolítica en el estadio promastigote es máxima con pH básico y en el caso de amastigotes intracelulares, es máxima a pH ácido. gp63 se caracteriza por hidrolizar la albúmina, hemoglobina, C3, IgG y péptidos sintéticos con tyrosina, residuos hidrofóbicos y aminoácidos.

En la mayoría de las especies de *Leishmania* estudiadas, la proteína gp63 está codificada por una serie de genes en tandem localizados en un único cromosoma. Entre especies existe un 70% de homología en cuanto a la secuencia aminoácida. La existencia de diferentes genes y el control post-transcripcional de la expresión de la proteína es lo que hace que la producción de la misma sea diferente según el momento del ciclo de vida del parásito. Se ha visto que gp63 contiene sitios de unión a residuos de Zinc, que son fundamentales para la actividad proteasa y para la estabilidad de la proteína. Tiene también tres sitios de glicosilación de asparragina que contribuyen a la estabilidad y un aminoácido Asn-577, que actúa como sitio de unión a glicosil-

fosfatidilinositol (GPI), por lo que es requerido para la unión de la proteína a la membrana.

La función de gp63 no es del todo conocida, pero se sabe que es un factor de virulencia muy importante de *Leishmania*. Es una proteína de superficie abundante en promastigotes, suponiendo un 1% de las proteínas totales. Participa en la unión del parásito al macrófago debido a la interacción con el receptor CR3, siendo esta función independiente de la actividad proteolítica. Distintos estudios sugieren que gp63 permite al parásito utilizar la capacidad de opsonización del complemento para entrar en el macrófago evitando los efectos líticos de este. Los amastigotes intracelulares se encuentran en presencia de elementos cuya función es lisar al parásito, pero estos sobreviven ya que gp63 degrada estas proteínas líticas previniendo la degradación intracelular del parásito. Parásitos deficientes para gp63, presentan una supervivencia mucho menor dentro de los macrófagos que los parásitos sin esta mutación (Kulkarni, McMaster et al. 2006).

La proteína presenta estructuralmente tres dominios diferenciados. El dominio I, compuesto por los 100 aminoácidos amino terminales, contiene el péptido señal y la región de la proenzima. El dominio II contiene la secuencia de la proteína madura y es el responsable de la actividad enzimática. El dominio III corresponde al extremo carboxilo terminal donde tiene lugar la unión del GPI en las formas de membrana. En la gp63 del amastigote la secuencia carboxilo terminal varía con lo que se pierde la capacidad de unión al GPI. En la región central de la proteína se ha descrito una región que está directamente implicada en la interacción con el macrófago (Puentes, Guzman et al. 1999).

1.4.2. KMP11

KMP11 (kinetoplastid membrane protein 11kDa) es una proteína de la membrana de kinetoplastidos de 11 kDa. Es una glicoproteína que se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito, siendo más abundante en el estadio promastigote en el momento en que se encuentra en el insecto vector. Se caracteriza por tener un alto grado de homología y conservación entre todos los kinetoplastidos. Se encuentra asociada tanto a membrana como al citoesqueleto y al flagelo y tiene una alta capacidad inmunogénica (Goel, Vohra et al. 1999; Thomas, Garcia-Perez et al. 2000; Thomas, Longobardo et al. 2001; Passos, Carvalho et al. 2005). Todas estas

características sugieren que tenga un papel importante en la biología de tripanosomátidos y que sea un punto interesante en la búsqueda de inmunoterapia frente a la leishmaniasis.

Los primeros estudios sobre esta proteína se hicieron con promastigotes de *Leishmania donovani* donde se aisló asociada a lipofosfoglicano (LPG). Esta proteína de 92 aminoácidos, se encontró, por tanto, asociada a la membrana del promastigote. Hay entre 1 y 2×10^6 copias del gen codificante de KMP11 por parásito. La proteína se encuentra glicosilada mediante enlaces O-glicosídicos. Se encontró la presencia de galactosamina, galactosa, glucosa y residuos de manosa. Se observó la presencia de un residuo N⁶-monometil-arginina en la posición 45 que parece estar implicado en la supervivencia del parásito dentro de la vacuola fagolisosómica ya que la monometil-arginina es un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa. Posteriormente se describió que presenta un motivo conservado de hélice-vuelta-hélice en su estructura secundaria con un fuerte carácter anfipático y que se encuentra asociada a la bicapa lipídica de la membrana del parásito.

KMP11 de *Leishmania infantum* porta una lisina en lugar de una arginina en la posición 45 (Ramirez, Berberich et al. 1998). KMP11 presenta elevada resistencia a condiciones desnaturalizantes. Se ha visto que es estable en un amplio rango de pH (de 2 a 7), su estructura conformacional se conserva hasta 50°C y a medida que aumenta la temperatura, va perdiendo progresivamente la estructura de α hélice hasta que a 85°C se encuentra totalmente enrollada. Sin embargo, cuando vuelve a la temperatura normal, recupera su conformación nativa (Fuertes, Berberich et al. 1999).

KMP11 se asocia con lipofosfoglicanos interactuando con la bicapa lipídica, regulando así la presión e incrementando la consistencia de la membrana al contribuir a la estabilidad de estas proteínas. Debido a su carácter anfipático puede estar insertada dentro de la membrana lipídica. La presencia de KMP11 en las formas tanto infectivas como no infectivas sugiere que tenga funciones que la implican en la interacción del parásito con el vector y con el hospedador durante la infección. Estudios de inmunofluorescencia reflejan que KMP11 se encuentra localizada a lo largo del flagelo y en la base flagelar del parásito. En el caso de *Leishmania infantum* se encuentra principalmente en el bolsillo flagelar mientras que en *Leishmania donovani* se encuentra dispersa por todo el parásito. KMP11 tiene capacidad de unión al Ca²⁺ y esta unión modifica la estructura secundaria y terciaria de

la proteína de modo dependiente de pH y temperatura pudiendo alterar las propiedades de solubilidad de la misma.

El gen KMP11 de *T. cruzi* está organizado en un cluster formado por 4 unidades génicas que están formando un tandem con orientación cabeza-cola localizado en un cromosoma de 1900 Kb. Ensayos de *Northern blot* pusieron de manifiesto que el mensajero de KMP11 es un transcrito muy abundante y estable, con una vida media de 16 horas. En cambio, el nivel de mensajeros KMP11 decae cuando el parásito alcanza la fase estacionaria de crecimiento. La secuencia de KMP11 de *T. cruzi* posee homología con la región terminal de la proteína CIP1 de *Arabidopsis thaliana*, proteína asociada a citoesqueleto. Estudios de *western blot* y microscopía electrónica, empleando anticuerpos generados frente a KMP11, evidencian que esta proteína se encuentra asociada al citoesqueleto del parásito. Existen también evidencias experimentales que sugieren la existencia de un control de expresión de la proteína a nivel de traducción (Thomas, Garcia-Perez et al. 2000). En *Trypanosoma rangeli*, el gen codificante de KMP11 presenta una similitud del 97% a nivel de secuencia de nucleótidos con su homólogo de *T. cruzi*. La organización génica en ambas especies también se mantiene conservada. Así el locus KMP11 en *T. rangeli* está formado por 4 copias repetidas en tandem (Diez, Thomas et al. 2005). La localización de la proteína KMP11 de *T. rangeli*, determinada por microscopía electrónica evidencia que la misma se acumula en la membrana celular, en el flagelo y en el bolsillo flagelar pudiendo, al igual que la KMP11 de *T. cruzi*, estar asociada al citoesqueleto del parásito (Diez, Sarmiento et al. 2008).

Una característica fundamental de esta proteína es que desempeña funciones inmunológicas muy importantes en la infección. Estas funciones son: inmunoestimulación de células B (Planelles y col. 2002), inducción de proliferación celular y respuesta citotóxica (Maranon, Thomas et al. 2001) e inmunoprotección (Planelles, Thomas et al. 2001) en modelos animales.

Interesantemente, los epítopes de células T y B de la proteína KMP11 de *T. cruzi*, están conservados en otras proteínas de trypanosomátidos, como es el caso de KMP11 de *T. rangeli* (Diez, Thomas et al. 2005). La inmunización de ratones transgénicos A2K^b con la proteína de fusión KMP11-HSP70 induce una respuesta de CTLs frente a células humanas expresando el antígeno KMP11 de *T. cruzi*. Esto ha permitido la identificación de 2 epítopes citotóxicos restringidos a A2 (K1 y K3) (Maranon, Thomas et al. 2001). Interesantemente,

estos resultados son extrapolables al humano ya que el péptido K1 de *T. cruzi* ha mostrado ser eficientemente procesado, presentado y reconocido por linfocitos T CD8+ durante el curso natural de la enfermedad de Chagas) (Cuellar, Santander et al. 2008). Estas funciones hacen que sea una proteína muy importante a la hora de desarrollar inmunoprotección frente a la infección por *Leishmania*.

1.4.3. PSA-2

El antígeno de superficie de promastigotes o PSA-2 (parasite surface antigen) es una glicoproteína que presenta su máxima expresión cuando el promastigote procíclico pasa a promastigote metacíclico (metaciclogénesis). Esta proteína está unida a la membrana celular del parásito mediante anclaje por Glicosilfosfatidilinositol (GPI) lo que confiere mayor capacidad de difusión por la membrana, facilitando así la interacción con la célula huésped. El estar anclada por GPI hace que PSA-2 forme una barrera defensiva que confiere resistencia frente a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que es a lo primero que se enfrenta el promastigote al entrar en el hospedador. En la fase promastigote se encuentra presente en la membrana del parásito y en la fase amastigote la expresión es tanto superficial como citoplasmática pero no se encuentra presente en todos los parásitos, al contrario de lo que sucede en promastigotes. Esto hace pensar en dos poblaciones, con o sin PSA-2, con diferente capacidad infectiva. Durante la fase amastigote, estas proteínas presentan mayor resistencia al ataque de PI-fosfolipasa C, lo que podría ser una adaptación al ambiente lítico del fagolisosoma (Kedzierski, Montgomery et al. 2004). Es en la fase estacionaria (promastigote metacíclico) en la que el parásito es más resistente al MHC, con un porcentaje de supervivencia de 90-100%, sin embargo, en la fase logarítmica (promastigote procíclico) el porcentaje de supervivencia baja a 25-50% (Lincoln, Ozaki et al. 2004). La unión de la proteína al macrófago se lleva a cabo a través de receptores CR3, Mac-1 del complemento, por lo que si bloqueamos esta vía mediante anticuerpos frente a CR3 o Mac-1, bloqueamos la unión de PSA-2 al macrófago (Kedzierski, Montgomery et al. 2004).

PSA-2 se caracteriza por poseer múltiples repeticiones de leucina, conteniendo cada una entre 24 y 26 residuos aminoácidos, lo que le da a la región amino-terminal la capacidad de unirse a distintas proteínas. En *Leishmania infantum* hay 15 repeticiones y en el resto de especies, 3 (Jimenez-

Ruiz, Boceta et al. 1998; Kedzierski, Montgomery et al. 2004) que les permiten llevar a cabo la invasión de macrófagos. Próxima a la región carboxilo-terminal se encuentra una zona rica en treonina y serina.

La inmunización con PSA-2 de ratones de distintas cepas hace que las lesiones sean de menor tamaño y la parasitemia también sea menor en los ratones que recibieron dicha proteína respecto a los ratones control tras la posterior infección con el parásito (Handman, Symons et al. 1995). En humanos se ha descrito la activación de células T CD4⁺, con altos niveles de producción de IFN- γ y bajos niveles de IL-4, características de respuesta tipo Th1, que como ya hemos mencionado anteriormente es el tipo de respuesta adecuada para controlar la infección (Kemp, Handman et al. 1998). La respuesta humoral se caracteriza por la producción mayoritaria de anticuerpos de subtipo IgG2a, siendo algo menor la producción de IgG1 (Boceta, Alonso et al. 2000). Los anticuerpos se dirigen principalmente a la región central de la proteína, formada exclusivamente por repeticiones ricas en leucina. El suero de perros y humanos infectados con *L. infantum* reconocen en un 100% y 40% respectivamente esta región de la proteína PSA (Boceta, Alonso et al. 2000).

1.4.4. Otras moléculas de interés inmunógeno

1.4.4.1. Cystein proteasas

Se han identificado distintas actividades cystein proteasas dentro del género *Leishmania*. Esta actividad reside en unos orgánulos de la forma amastigote conocidos como megasomas (Galvao and Shayman 1990). Existen diferentes genes que codifican para estas proteínas según la fase del ciclo en que se encuentre el parásito. Estos genes se conocen como *lmcpa*, *lmcpb1*, *lmcpb2* y *lmcpc* (Mottram, Robertson et al. 1992; Souza, Waugh et al. 1992; Bart, Frame et al. 1997).

La región carboxilo terminal de cystein proteasas de Trypanosomátidos no tiene mucha similitud a nivel de secuencia. Otras regiones de estas proteínas comparten zonas ricas en cisteína que son importantes en la determinación de la estructura secundaria. La función de la zona carboxilo terminal es desconocida.

1.4.4.2. Lipofosfoglicanos

Los Lipofosfoglicanos (LPG) son un complejo glicolipídico presente en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*, expresándose en menor nivel en la fase amastigote. Los mismos forman un denso glicocalix alrededor de todo el parásito, incluido el flagelo. Estas moléculas participan en la interacción del parásito con el macrófago (Handman and Goding 1985). En cuanto a la estructura, se ha reportado que los lipofosfoglicanos contienen 4 dominios básicos: anclaje lipídico, núcleo de naturaleza oligosacáridica, estructura formada por repeticiones de fosfosacáridos y una estructura terminal de oligosacáridos. Los dos primeros dominios están muy conservados en las distintas especies de *Leishmania*, sin embargo las estructuras terminal y sacarídica varían significativamente entre las distintas especies debido a la presencia o ausencia de repeticiones de cadenas de oligosacáridos en el esqueleto proteico (McConville, Thomas-Oates et al. 1990; Turco and Descoteaux 1992). LPG de *L. tropica* son los más complejos con más de 19 cadenas diferentes de oligosacáridos (McConville, Schnur et al. 1995), le sigue *L. major* (McConville and Ferguson 1993) y el menos complejo es *L. donovani* con un esqueleto de disacáridos y ausencia de cadenas (Turco, Hull et al. 1987). Hay una gran diversidad en el nivel de expresión de LPG en las distintas especies (McConville and Blackwell 1991; Bahr, Stierhof et al. 1993).

LPG es un factor de virulencia esencial para la supervivencia del parásito tanto en el vector de transmisión de la enfermedad como en el hospedador. En el insecto vector está implicado en la protección frente a la acción de las enzimas hidrolíticas del flebotomo y en la unión del promastigote a la pared del tubo digestivo (Sacks, Saraiva et al. 1994; Beverley and Turco 1998). Durante la metacicloogénesis se producen cambios estructurales en el LPG que pueden ser la causa de la liberación del parásito del tubo digestivo permitiendo así el paso a la probóscide. En el hospedador vertebrado, el LPG actúa como molécula aceptora de la proteína C3 del MHC en algunas especies de *Leishmania* y como molécula protectora frente a la lisis del promastigote metacíclico por parte del hospedador. Los cambios de LPG durante la metacicloogénesis evitan la inserción del complejo C5b-C9 en la membrana del parásito. El LPG interviene en la supervivencia del promastigote en el interior del macrófago inhibiendo la respuesta oxidativa del macrófago y las enzimas lisosomales, desacoplado los mecanismos de transducción y activando

respuesta humoral y celular en el hospedador vertebrado. Esta última función parece que es debida a las proteínas que van asociadas al LPG.

Existen dos formas de LPG, una forma anfipática unida a la membrana y la forma hidrofílica que se encuentra en el sobrenadante celular. El fragmento soluble se conoce como fosfoglicano (PG) y es liberado al sobrenadante por el promastigote (Handman and Goding 1985). No se sabe si PG es producto de la lisis de LPG o si se sintetizan por separado.

1.4.4.3. Proteofosfoglicanos- PPG

Estas proteínas tienen características similares a LPG y PG. Además, PPG comparte similitud a nivel de secuencia de aminoácidos con miembros de la familia de glicoproteínas PSA-2. Esta similitud está restringida al motivo repetido rico en leucinas o LRR (Montgomery, Ilg et al. 2000). Tiene dos formas, una forma soluble y otra forma unida a la membrana mediante GPI (Piani, Ilg et al. 1999). Contiene una región con numerosas repeticiones de 12-15 aminoácidos ricos en serina, alanina y prolina (Ilg, Stierhof et al. 1996). La región soluble tiene un papel importante en la interacción del parásito con el insecto vector (Stierhof, Bates et al. 1999). PPG participa en la unión al macrófago, favorece la internalización y el ser reconocido por los lisosomas (Piani, Ilg et al. 1999). PPG solo se encuentra en amastigotes y en parásitos no incluidos en vesículas en el interior del macrófago.

LPG y PPG son dos polímeros con las mismas funciones y la misma estructura de cadenas y la única variable es el esqueleto fosfodiéster unido a azúcares (LGP) o aminoácidos (PPG) (Handman 1999).

1.5. Vacunas frente a *Leishmania*

El concepto de vacunación apareció hace 200 años cuando Jenner mostró que la exposición al virus *vaccinia* podía prevenir la infección de la viruela. En el último siglo se han conseguido vacunas frente a distintas enfermedades infecciosas, lo que ha supuesto un gran avance para la medicina. En el caso de *Leishmania* es conocido desde antiguamente que quien sufría leishmaniasis cutánea es inmune frente a la reinfección. Así, los primeros estudios para el desarrollo de vacunas frente a *Leishmania* se centraron en la protección frente a las especies causantes de leishmaniasis cutánea (Handman 2001).

Según Kedzierski (Kedzierski, Zhu et al. 2006) las características de una vacuna ideal frente a la leishmaniasis deben ser:

1. Ser segura
2. Genere respuesta de células T CD4⁺ y CD8⁺ y respuesta memoria
3. El número de inoculaciones necesarias sea el mínimo
4. Debe ser efectiva en protección y/o inmunoterapia
5. Menor coste posible

1.5.1. Vacunas de parásitos vivos

Las primeras vacunas empleadas frente a leishmaniasis consistían en la inoculación de parásitos vivos, causando una infección controlada que genera una respuesta de células T memoria, impidiendo que sufra la patología en caso de reinfección. Se empleaban parásitos modificados genéticamente, que tenían la propiedad de causar respuesta inmune pero no causaban enfermedad en el hombre (Kedzierski, Zhu et al. 2006; Palatnik-de-Sousa 2008). Sin embargo, este tipo de inmunización con organismos vivos tuvo que ser abandonada por no considerarse ético su uso en humanos, ya que ocasionaba en muchos casos una patología descontrolada y porque la infección de modo artificial no presenta factores que sí presenta la natural como, por ejemplo, la saliva del mosquito (Palatnik-de-Sousa 2008). Recientemente se ha vuelto a emplear en algunas regiones endémicas debido a ser la única vacuna frente *Leishmania* que ha mostrado alguna eficacia en humanos (Kedzierski, Zhu et al. 2006). La inoculación de parásitos *L. major* junto con CD40L, genera respuesta inmunitaria Th1 y protección a los ratones inmunizados. El empleo de parásitos *L. major* transgénicos que expresan y secretan la porción extracelular de CD40L, inoculado en ratones BALB/c y C57BL/6 genera lesiones más leves y con menor número de parásitos en dichas lesiones que aquellas ocasionadas tras la infección con parásitos *wild type* e induce protección frente a la reinfección con *L. major wild type*. Además, la inoculación en ratones C57BL/6 con pequeñas dosis de estos parásitos transgénicos genera una mayor protección que la generada por altas dosis de parásitos *wild type*, lo que muestra una mejor capacidad protectora de los parásitos que expresan CD40L (Field, Wagage et al. 2007).

1.5.2. Vacunas de parásitos muertos y atenuados

Así mismo, se ha empleado la inoculación de parásitos muertos usados como vacuna profiláctica y terapéutica, en presencia o ausencia del adyuvante BCG (bacilo Calmette-Guerin). Este tipo de vacuna se comenzó a emplear en 1930 por un científico brasileño. Así se ha llevado a cabo la inmunización con promastigotes de *L. amazonensis* muertos como tratamiento frente a leishmaniasis cutánea (Sharples, Shaw et al. 1994) dando lugar a un 95% de curación, asociada a respuesta Th1 (Cabrera, Blackwell et al. 2000; Convit, Ulrich et al. 2003). Los resultados obtenidos son variables y un porcentaje bajo de efectividad en la mayoría de los casos. Esta vacunación produce respuesta inmune de tipo Th1 en ratones y monos, pero aún así no protege frente a la infección con *L. major*, lo que sugiere que esta respuesta tipo Th1 es necesaria pero no suficiente para proteger frente a la leishmaniasis cutánea causada por *L. major* (Sjolander, Baldwin et al. 1998; Gicheru, Olobo et al. 2001; Sacks and Anderson 2004). El empleo de promastigotes pasteurizados de *L. braziliensis* y BCG vivo fue efectivo en el tratamiento de leishmaniasis mucocutánea y casos tempranos de leishmaniasis cutánea difusa (Convit, Ulrich et al. 2004). Se ha descrito que la infección con parásitos muertos de *L. major* induce una cierta protección frente a leishmaniasis visceral provocada por *L. donovani* (Zijlstra, el-Hassan et al. 1994), produciendo una significativa activación de la producción de IFN- γ en mono, perro y hámster (Titus, Gueiros-Filho et al. 1995; Kedzierski, Zhu et al. 2006).

Las vacunas de parásitos atenuados, emplean parásitos infectivos pero no patogénicos (Kedzierski, Zhu et al. 2006). Se han obtenido buenos resultados, pero resulta muy arriesgado el empleo de estos en humanos, además de ser altamente costoso y difícil de realizar a gran escala (Handman 2001). La administración de oligonucleótidos CpG junto a estos parásitos atenuados resultó necesaria para la protección frente a la infección por *L. major*. Sorprendentemente, la protección inducida no está relacionada con una respuesta Th1 significativa, lo que pone de manifiesto que no siempre es esencial la respuesta celular tipo Th1 para que exista inmunidad protectora frente a la infección con *L. major* (Kedzierski, Zhu et al. 2006). Este tipo de vacunas dan lugar a una protección limitada ya que los parásitos son eliminados de modo rápido de la célula hospedadora.

1.5.3. Vacunas que usan virus recombinantes y microorganismos

El uso de vectores bacterianos vivos como vacuna que expresan antígenos de interés, tiene aplicaciones prácticas limitadas (Requena, Iborra et al. 2004). En el caso de *Leishmania*, la primera vacuna de este tipo empleada fue *Salmonella typhimurium* mutante transformada con gp63 de *L. major* (Yang, Fairweather et al. 1990; Xu, McSorley et al. 1995). Este mismo antígeno fue empleado en BCG observándose una significativa protección tras la infección con *L. major* y *L. mexicana* (Connell, Medina-Acosta et al. 1993). Una alternativa a estas vacunas es el empleo de *Toxoplasma gondii* atenuado. La vacunación de ratones BALB/c con este expresando KMP11 de *L. major* da lugar a una significativa protección frente *L. major* (Ramirez, Gilchrist et al. 2001). La vacunación con *Vaccinia* expresando la proteína LACK de *L. infantum* protege ratones frente *L. major* (Gonzalo, del Real et al. 2002) y perros frente *L. infantum* (Ramiro, Zarate et al. 2003).

1.5.4. Vacunas de proteínas

Las vacunas de segunda generación consisten en el empleo de determinados antígenos del parásito. No todos los antígenos son adecuados para generar protección, por eso hay que llevar a cabo una selección de los más adecuados. Los estudios se llevan a cabo empleando proteínas de la membrana celular. Lo ideal es el empleo de proteínas muy conservadas en distintas especies y que se expresen abundantemente cuando el parásito está en el hospedador. El empleo de proteínas recombinantes presenta ventajas como la estandarización, la disponibilidad y el costo.

Frente a *Leishmania*, el modelo más estudiado es leishmaniasis cutánea y la protección consiste en una modulación del sistema inmunitario ocasionando una respuesta de tipo Th1, con activación de células T CD4⁺ y la consiguiente producción de citocinas IFN- γ , IL-2 y TNF (Darrah, Patel et al. 2007). Se postula que las proteínas candidatas para vacuna son aquellas que se encuentran localizadas en superficie y expresadas en sueros de humanos y de ratones infectados. Entre ellas están las proteínas gp63, gp46, PSA-2, Histona H1, etc. (Coler and Reed 2005). Recientemente se ha propuesto a las proteínas conservadas nucleares y citoplasmáticas del tipo histonas y proteínas ribosomales como adecuadas para inducir protección frente a la infección por *Leishmania* (Iborra, Soto et al. 2004; Chenik, Louzir et al. 2006; Carrion, Folgueira et al. 2008).

Una de las proteínas de superficie más estudiada como candidata para vacuna anti-leishmaniasis es la glicoproteína gp63 o leishmanolysin, muy abundante en la superficie del promastigote, ampliamente utilizada en estudios de vacunación e inmunológicos, tanto en ratón como en mono (Russell and Alexander 1988; Mendonca, Russell et al. 1991; Russo, Burns et al. 1991; Olobo, Anjili et al. 1995; Handman 2001). Cuando se usa la proteína recombinante expresada en *E. coli* no protege los ratones frente a la infección por *L. major* y en monos únicamente genera una protección parcial. Sin embargo, la inmunización con la proteína nativa purificada de *L. major*, proporciona protección al ratón frente *L. major* y *L. mexicana*. La vacunación con células dendríticas (CD) cargadas con gp63, hace que se controle la infección con *L. major* y el grado de protección está directamente relacionado con los niveles de expresión de IL-12 y la respuesta Th1. En otros estudios se ha visto que la inmunización con gp63 junto con CD40L humano, potencia la producción de IL-12 y protege especialmente a los ratones C57BL/6 contra *L. amazonensis*. La proteína gp63 forma parte de la vacuna *Leishvacin* testada en voluntarios sanos en Brasil, produciéndose activación linfocitaria, producción de IgM e IgG, siendo la producción de IgM bastante más elevada que la de IgG y se desarrolla hipersensibilidad haciendo que estos individuos estén protegidos frente a una posible infección (Nascimento, Mayrink et al. 1990).

La proteína PSA-2 se encuentra en la superficie del parásito y administrada junto con LPG protege a ratones BALB/c susceptibles. Entre otros antígenos empleados se encuentra la proteína LACK (p36) expresada en ambos ciclos del parásito (Mougneau, Altare et al. 1995). Los ratones BALB/c inmunizados con esta presentan la capacidad de disminuir la respuesta Th2 temprana y favorecer el desarrollo de la respuesta Th1, controlando la infección (Pinto, Pinheiro et al. 2004). En perros también produce respuesta mayoritaria tipo Th1 dando lugar a protección (Ramiro, Zarate et al. 2003; Ramos, Alonso et al. 2008). La inmunización con cistein proteasa del amastigote induce una alta producción de IFN- γ , activación de células T CD8⁺ y proporciona protección parcial frente a *L. major*. (Gonzalo, Rodriguez et al. 2001; Gonzalo, del Real et al. 2002). Recientemente se han llevado a cabo inmunizaciones en ratones BALB/c con la proteína rLmSTI1 encapsulada en liposomas, generando protección frente a la infección por *L. major*, ocasionando escasas lesiones y un alto nivel de anticuerpos IgG, principalmente de subtipo IgG2a (Badiiee, Jaafari et al. 2007).

Frente a la leishmaniasis visceral se postula que es muy importante la inducción de una respuesta Th1 con alta producción de IFN- γ , así como respuesta humoral, por lo que la vacuna empleada debe generar tanto respuesta celular como humoral. Los mejores modelos animales son el perro con *L. infantum* o *L. chagasi* y el hamster con *L. donovani* ya que muchos síntomas y características de la infección son muy similares a las producidas en humanos. Sin embargo, el modelo murino es el más empleado para ensayos de vacunación frente a la leishmaniasis visceral debido al gran número existente de tipos de ratones transgénicos con distintas deficiencias inmunológicas que permiten llevar a cabo estudios que aportan mucha información, aunque no refleja totalmente lo que sucede en humanos. Uno de los antígenos ensayados es LCR1, polipéptido flagelar, que al ir junto con BCG genera protección. Dicha protección es variable dependiendo del sitio de inmunización, siendo esta más efectiva si se produce por vía subcutánea que por vía intraperitoneal (Streit, Recker et al. 2000). Otros antígenos empleados son la proteína de superficie B1 expresada en el estadio amastigote y promastigote metacíclico, el antígeno PapLe22 de función desconocida y presente en el núcleo de promastigotes, el antígeno ORFF de función desconocida, junto con secuencias CpG, etc. (Stager, Smith et al. 2000; Suffia, Ferrua et al. 2000; Tewary, Sukumaran et al. 2004). La vacunación de ratones BALB/c con la lipoproteína OprI (L-OprI) de *Pseudomonas aeruginosa* fusionada a un fragmento de 32 kDa de la glicoproteína gp63, induce respuesta inmune Th1, dando lugar a la producción de TNF- α , IFN- γ y anticuerpos de subtipo IgG2a frente a dicha glicoproteína y protege frente a la infección por *L. major* (Cote-Sierra, Bredan et al. 2002). La vacunación con antígenos exógenos de promastigotes de *L. major* (LmSEAgS) protege a ratones BALB/c frente a la infección por *L. donovani*, observándose una escasa carga parasitaria en bazo y generando un incremento significativo en la producción de IFN- γ y baja producción de IL-4 e IL-10, lo que implica el desarrollo de respuesta inmunológica tipo Th1 (Tonui and Titus 2007).

1.5.5. Vacunas genéticas

El uso del ADN en vacunas es una nueva estrategia utilizada para inducir respuesta a un antígeno proteico expresado *in vivo*. Estas vacunas, llamadas de tercera generación, están basadas en la introducción por distintas vías, como inyección intramuscular, bombardeo con partículas de oro (“gene

gun” o pistola de genes) o aerosoles, de un plásmido de ADN purificado que codifica para una secuencia polipeptídica de un determinado antígeno. Este tipo de vacunas presenta una serie de ventajas respecto a las vacunas proteicas clásicas como son:

- menor coste
- mayor estabilidad
- plasticidad, con posibilidad de combinar distintos antígenos o incluir moléculas de coestimulación en estos plásmidos
- mayor especificidad
- generan respuesta humoral y celular CD4⁺ y CD8⁺, siendo esta última más fuerte y con memoria a más largo plazo que las vacunas de proteína
- inducen respuesta de CTLs y respuesta Th1

La efectividad de las vacunas de ADN ha sido demostrada en distintos modelos animales y así se ha podido comprobar que utilizando estos plásmidos se puede generar respuesta humoral y celular. Aunque cabe mencionar que la generación de células B productoras de anticuerpos es generalmente menor que la que se induce cuando se utilizan vacunas clásicas (generalmente proteicas)

El gen codificante de gp63 fue el primero en usarse como vacuna de ADN, produciendo una fuerte respuesta Th1 generando significativa resistencia a la infección por *L. major* (Xu and Liew 1994). El antígeno PSA-2 ha sido empleado como vacuna de ADN dando lugar a la inducción de una respuesta inmune que da lugar a la reducción del tamaño de las lesiones generadas en la infección posterior con *L. major*, pero no consigue reducir la carga parasitaria (Sjolander, Baldwin et al. 1998). La vacuna genética más estudiada está compuesta por el gen LACK, ensayada como vacuna genética tanto frente a leishmaniasis cutánea, dando lugar a una rápida y duradera protección con alta producción de IFN- γ (Pinto, Pinheiro et al. 2004) como frente leishmaniasis visceral dando lugar a la producción de IFN- γ e IL-4, reducción de la producción de IL-10, producción de respuesta humoral tipo IgG y reducción del número de parásitos presentes en hígado y bazo (Gomes, Pinto et al. 2007).

1.5.5.1. Esqueleto de ADN: secuencias estimuladoras y unidad de transcripción

El plásmido utilizado para la inoculación consta de dos subunidades básicas. Por una parte, la maquinaria necesaria para su transcripción en la que se incluye un promotor eucariota fuerte (el más utilizado es el del citomegalovirus-CMV) y una señal de poliadenilación para estabilizar el mRNA del antígeno. Por otra parte, se distingue una unidad con carácter mitogénico o adyuvante en la que se encuentran un número variable de secuencias inmunoestimuladoras ó ISS. Estas secuencias no son más que motivos citosina-guanina no metilados, flanqueados por dos purinas en su extremo 5' y por dos pirimidinas en el extremo 3'.

En el genoma de mamíferos la existencia de motivos CpG es menos frecuente y estos además están en su mayoría metilados.

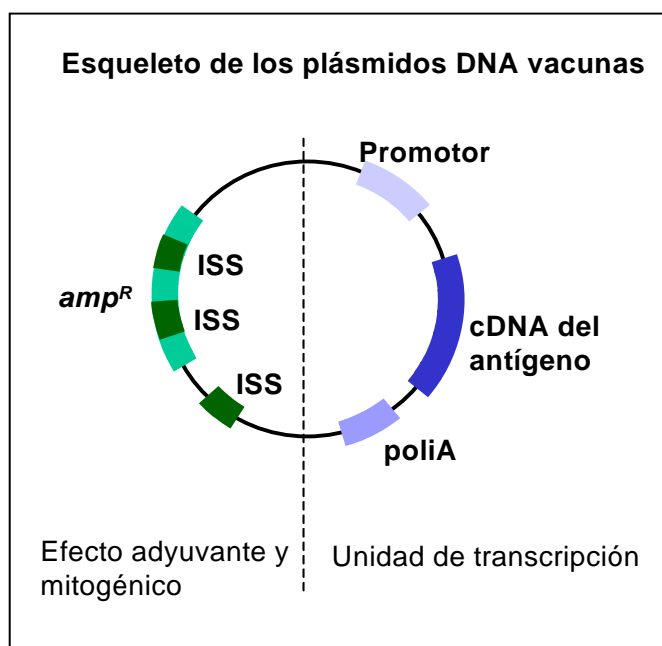


Figura 2: Esquema de los componentes de plásmidos ADN vacuna. Los vectores de ADN utilizados para vacunaciones genéticas presentan secuencias inmunoestimuladoras ISS que proporcionan un efecto adyuvante así como una unidad de transcripción, necesaria para la síntesis de las proteínas y formada por el promotor, la secuencia codificante para el antígeno de interés y la señal de poliadenilación. Las secuencias ISS se muestran de manera esquemática localizadas en la secuencia del gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*) y en la región no codificante del plásmido.

Este tipo de secuencias (ISS) ampliamente estudiadas, poseen un efecto estimulador *per se* del sistema inmunitario innato y en presencia del antígeno

contribuyen también a una respuesta antígeno específica. Se resume su acción en el siguiente esquema de la figura 3.

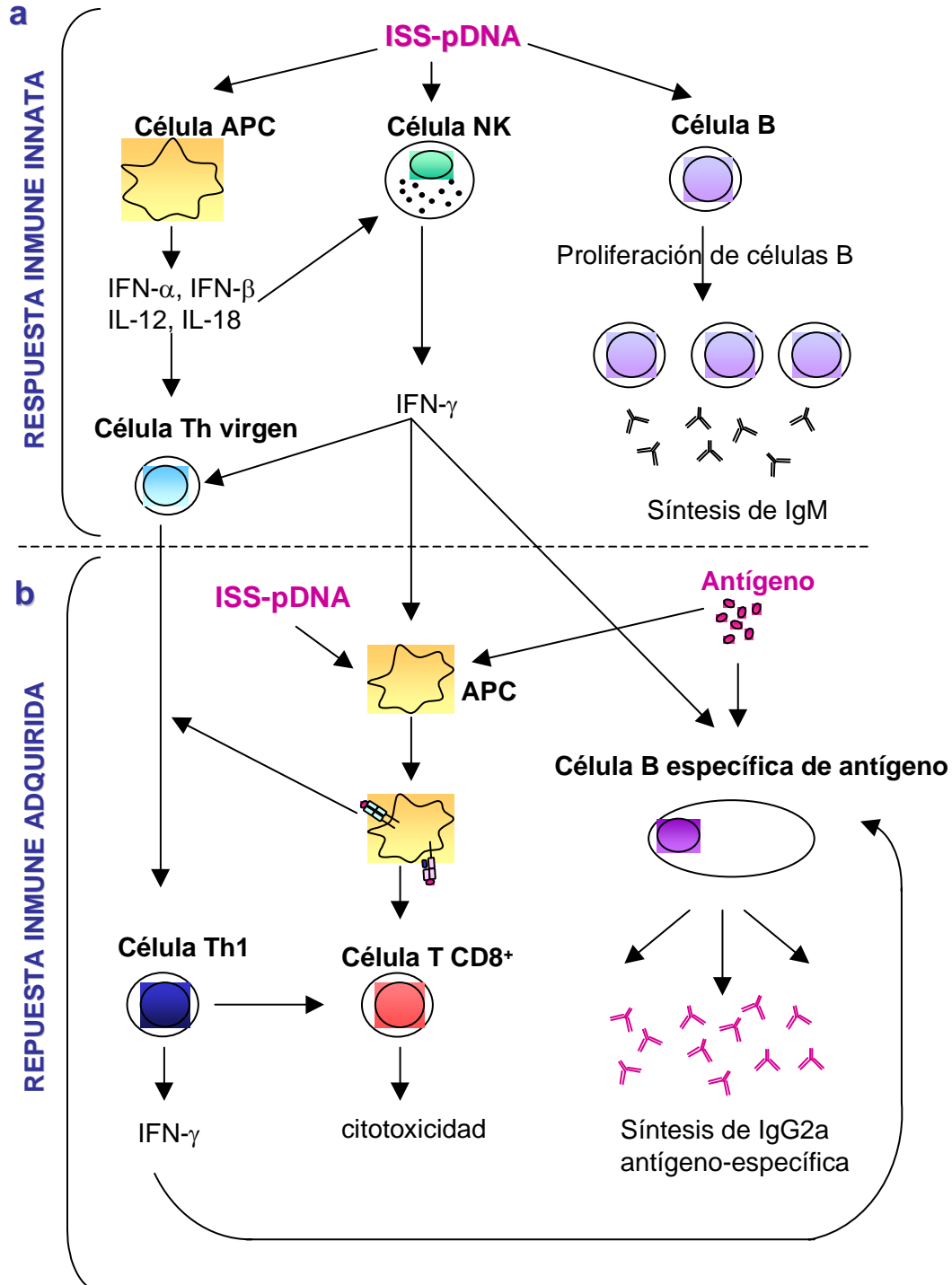


Figura 3. Mecanismo de acción de las secuencias inmunoestimuladoras (ISS) sobre las distintas poblaciones del sistema inmunológico.

Estos plásmidos carecen de un origen de replicación que sea funcional en células eucariotas, para evitar que se replique en el huésped mamífero y que se integre en el ADN cromosómico del animal. Una vez que el plásmido es capturado por la célula, expresa el antígeno en el interior, usando elementos de control eucariotas. Posteriormente son liberados al medio.

Aunque se desconoce el mecanismo por el cual actúan estos antígenos, se ha postulado que podrían actuar directamente sobre las células B provocando su activación, estas células proliferan y secretan inmunoglobulinas *in vitro* e *in vivo* (Krieg, Yi et al. 1995). Además, se ha podido comprobar que los motivos CpG inducen una fuerte respuesta inflamatoria de linfocitos T helper CD4⁺ tipo Th1 (Jakob, Walker et al. 1998; Sparwasser, Koch et al. 1998) y la activación de células dendríticas (Haker 1999; Hartmann, Weiner et al. 1999).

Se ha propuesto la existencia de un receptor para los motivos CpG, al menos en células dendríticas y en macrófagos (TLR 9) (Hemmi, Takeuchi et al. 2000). Además, se ha reportado que el extremo 5' de estas secuencias debe estar accesible para el reconocimiento por el receptor y la consecuente activación del sistema inmune. Esta actividad se ve inhibida si este extremo queda bloqueado mediante la unión por ejemplo, de dos motivos CpG consecutivos unidos por sus extremos 5'. Un efecto similar de inhibición se produce si se forman estructuras secundarias tipo *loops* de *hairpin* o dímeros terminales. Este tipo de estructuras secundarias afectan significativamente a su capacidad adyuvante cuando se forman en 5' y no así si lo hacen en 3'. Esto sugiere que, de alguna manera, el receptor responsable de la estimulación inmune "lee" la secuencia de ADN desde el extremo 3'. Se han realizado numerosas aproximaciones con objeto de aumentar la efectividad de este tipo de vacunas. Entre estos estudios se incluyen la adición de moléculas diana que dirijan el antígeno a lugares concretos como órganos linfoides o directamente a la célula presentadora. Otra posibilidad es coexpresar junto al antígeno de interés otras moléculas implicadas en la estimulación y/o modulación de una respuesta inmune antígeno específica, como son algunas citocinas, quimiocinas o moléculas de coestimulación (Kim, Bagarazzi et al. 1997; Chow, Chiang et al. 1998; Flo, Tisminetzky et al. 2000).

1.5.5.2. Vías de administración

Otro factor que hay que considerar es la vía de administración de una vacuna. Desde que se comenzaron a utilizar las vacunas genéticas hace más de una década hasta nuestros días, se han realizado numerosos estudios y con muy distintos antígenos. Básicamente existen 3 formas de administrar estas vacunas genéticas:

- Intramuscular
- Intradérmica
- Intranasal

En general, lo que se ha podido comprobar es que para un mismo antígeno la respuesta generada es distinta dependiendo de la vía de administración empleada (Pertmer, Roberts et al. 1996; Feltquate, Heaney et al. 1997). La ruta de administración también tiene implicaciones en la duración de la respuesta que se genera. Recientemente se ha llevado a cabo un interesante estudio comparativo de las rutas intradérmica (“gene gun”) e intramuscular. Así, para un mismo antígeno no sólo varía la magnitud de la respuesta, sino también su duración (Letvin, Mascola et al. 2006; Tsang, Babiuk et al. 2007). Así, empleando la proteína verde como reportero, la cual permite un seguimiento de la expresión génica, estos autores pudieron comprobar que si bien mediante la inyección intradérmica se obtenían las mayores respuestas tanto de anticuerpos como de activación de linfocitos T citotóxicos (en tan sólo 1 semana tras la última inyección), esta respuesta se veía claramente disminuida transcurridas 4 semanas. Sin embargo, 5 semanas tras la inmunización, los ratones que habían sido inoculados vía intramuscular exhibían una respuesta mayor que los inoculados por vía intradérmica, sin existir cambio en el tipo de anticuerpos generados.

1.5.5.3. Presentación de antígenos tras la vacunación genética

El mecanismo de acción de las vacunas genéticas no está totalmente elucidado por lo que actualmente se sigue estudiando cómo es el procesamiento que tiene lugar tras la inoculación de un plásmido que porta los genes correspondientes a los antígenos de interés que de alguna forma son vistos por el sistema inmune. En la inoculación intradérmica, el ADN plasmídico atraviesa la dermis encontrando así las células de Langerhans. Parece evidente que sean estas células presentadoras de antígeno las

encargadas de procesar el ADN y exponer en su superficie los péptidos resultantes del procesamiento (Mendez, Belkaid et al. 2002).

Cuando se utiliza la inyección intramuscular el panorama es algo distinto. En músculo, el número de células presentadoras de antígenos es sin duda menor que en la piel. En el tejido muscular el tipo celular mayoritario son los miocitos. Se propone que los miocitos pueden ser transfectados directamente, tras la inyección con este ADN, que tras ser procesado en su interior sería presentado a las APC por un proceso de presentación cruzada conocido como “cross-priming”. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para corroborar esta teoría. *In vitro* se ha podido comprobar que los miocitos son capaces de transferir los antígenos a células presentadoras (cross-priming) (Wolff, Malone et al. 1990; Corr, Lee et al. 1996; Ulmer and Otten 2000).

1.5.5.4. Seguridad de las vacunas genéticas

Como ya hemos mencionado, este tipo de vacuna consiste en un ADN extraño que se introduce en un organismo y por tanto el temor de que puedan existir ciertos riesgos derivados de su posible integración en el genoma del hospedador causando una reacción inmunológica adversa (Robertson 1994). A pesar del elevado número de experimentaciones realizadas con diversas moléculas de ADN hasta el momento no se han observado respuestas inmunes perjudiciales como autoinmunidad o desarrollo de tolerancia en respuesta a la expresión persistente de un antígeno extraño. Numerosas investigaciones con modelos animales han demostrado que las vacunas de ADN son seguras. Por otro lado, la probabilidad de integración de este ADN en el genoma del individuo es bastante escasa si se tienen en cuenta las siguientes consideraciones. La integración *in vitro* de genes extraños en el genoma de líneas celulares puede ocurrir al azar o por recombinación homóloga. Para esta última, se definen como condiciones óptimas para que ocurra, el que se produzca de manera simultánea la replicación del ADN del huésped y del plásmido, y la presencia de largas regiones (>600 pb) de homología entre ambos ADNs y cercanas en el espacio. En el caso de la vacunación intramuscular con ADN, el plásmido no contiene un origen de replicación que sea funcional en células eucariotas; además, la mayor parte de las células transfectadas (miocitos, macrófagos, células dendríticas) no tienen capacidad de división y la mayoría de las secuencias de ADN que constituyen el plásmido

carecen de homología con el ADN de mamíferos. No obstante, la observación de que el ADN inoculado no permanece íntegramente en el lugar de la inyección, así como su presencia en núcleos celulares (Condon, Watkins et al. 1996; Torres, Iwasaki et al. 1997) no permite excluir de una forma definitiva la posibilidad de una integración.

Por otra parte, aunque la integración al azar puede ocurrir con una frecuencia entre 50 y 1000³ veces mayor que la recombinación homóloga, la amplia experiencia existente hasta el momento sobre las inmunizaciones que utilizan virus de ADN replicativos y vivos (como el adenovirus) no han revelado fenómenos adversos relacionados con la integración. Por ejemplo, estudios directos sobre integración tras la inmunización intramuscular en ratones con un plásmido codificante de la nucleoproteína (NP) del virus influenza resultaron negativos (Nichols, Ledwith et al. 1995). La inmunización de perros con los virus WR y MVA (virus Ankara), expresando estos la proteína LACK de *L. infantum*, da lugar a una respuesta inmunitaria tipo Th1 y genera protección frente a la leishmaniasis visceral, con ausencia de síntomas de leishmaniasis visceral, baja respuesta de anticuerpos específicos y elevada activación de células T y de producción de citocinas (Ramos, Alonso et al. 2008).

1.5.5.5. Vacunas de ADN frente a *Leishmania*

Se han ensayado distintas vacunas frente a la leishmaniasis cutánea usando el modelo de infección experimental en ratón. En estas vacunas se han empleado distintos antígenos como gp63, PSA-2, LACK, etc. El gen codificante de gp63 fue el primero en usarse como vacuna de ADN, produciendo una fuerte respuesta Th1 generando significativa resistencia a la infección por *L. major*. En cuanto al gen PSA-2 empleado como vacuna de ADN reduce el tamaño de las lesiones generadas pero no consigue reducir la carga parasitaria. La vacuna genética más estudiada está compuesta por el gen LACK, analizada tanto como vacuna frente a leishmaniasis cutánea como frente a leishmaniasis visceral (Kedzierski, Zhu et al. 2006). La proteína LACK desencadena la producción temprana de IL-4 como consecuencia de la infección con *Leishmania major*. Al vacunar con este antígeno en forma de ADN se induce protección frente a la infección de *L. major* ya que redirige la respuesta inmunológica hacia Th1, reduciendo la respuesta Th2 desencadenante del desarrollo de la patología (Gurunathan, Sacks et al. 1997)

y produce la activación de células T CD8⁺ (Kedzierski, Zhu et al. 2006) favoreciendo la protección frente a la infección.

Se postula que la inoculación de un grupo de vacunas de ADN que codifican para varios antígenos puede generar una alta protección (Rodríguez-Cortes, Ojeda et al. 2007). Así, la unión de plásmidos que codifican para LACK, LmST11 y TSA origina una protección total frente a la infección con *L. major* (Mendez, Gurunathan et al. 2001). La mezcla de dos vacunas de ADN que codifican para las cisteína proteasas CPa y CPb de *L. major* protege parcialmente frente a leishmaniasis cutánea, mientras que la inoculación de cada plásmido por separado no da resultado positivo (Rafati, Salmanian et al. 2001).

En el caso de leishmaniasis visceral se han conseguido protecciones parciales empleando el antígeno A2 de *L. donovani* (Ghosh, Zhang et al. 2001). Se ha observado que la respuesta protectora aumenta al inhibir la respuesta mediada por la proteína p53. Esta proteína p53 es responsable de: activación de procesos apoptóticos, de parada del ciclo celular, de inhibición de promotores víricos, reparación de ADN y senescencia celular, que afectan negativamente a la eficacia de las vacunas genéticas. En otros estudios se ha identificado a las histonas H2B, H3 y H4, como antígenos protectivos frente a leishmaniasis visceral (Melby, Ogden et al. 2000). La vacuna de ADN que codifica la proteína LACK y que ha resultado ser protectora frente a *L. major* (LC), se ha visto que no lo es frente a leishmaniasis visceral pese a producir una alta respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Melby, Yang et al. 2001; Kedzierski, Zhu et al. 2006). Recientes estudios empleando la secuencia génica completa de la proteína gamma-glutamylcisteína sintetasa como vacuna, muestran la generación de protección frente a la infección por *L. donovani*, con la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de antígeno e incremento de células CD3⁺ y CD4⁺ en bazo que conducen a la reducción de la carga parasitaria en hígado (Carter, Henriquez et al. 2007). Se han realizado estudios con vacuna de ADN que codifica 4 antígenos de *L. infantum*: KMP11, gp63, LACK y TRYP. Este ensayo se ha hecho en perros y no se ha observado capacidad protectora de dicha vacuna frente a la infección por *L. infantum*. Los perros experimentan pérdida de peso, lesiones cutáneas y linfadenopatías, anemia, insuficiencia renal, alteraciones en hígado, etc. Los ratones inmunizados presentan respuesta IgG específica frente a los antígenos de *Leishmania* tras la infección, siendo similar entre los perros inmunizados y

los no inmunizados. La presencia de parásitos en sangre tarda más en aparecer en perros inmunizados (6 meses post-infección) pero aparece en niveles muy elevados, similares a los de los perros no inmunizados. Hay presencia de parásitos en hígado, bazo y ganglios poplíteos tanto en inmunizados como no inmunizados, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Esta inmunización retrasa la invasión de los órganos por parte de los parásitos, pero no resulta protectora, ya que los perros inmunizados presentan las mismas patologías y al mismo nivel que los no inmunizados. Los antígenos usados se han descrito como protectores en anteriores investigaciones y en el modelo murino también, pero en esta modalidad no ha resultado protectoro (Rodríguez-Cortes, Ojeda et al. 2007).

1.5.6. Memoria generada por las vacunas frente a *Leishmania*

Que el desarrollo de una vacuna efectiva sea posible depende de la inducción y el mantenimiento de memoria inmunológica. Muchos estudios ponen en entredicho la existencia de memoria en el caso de infecciones parasitarias (Brake 2003). En el caso de leishmaniasis, se cree que no se genera memoria frente a la infección, sino que tras superar la patología, el hospedador queda infectado de modo permanente. En los ratones resistentes a *L. major* la infección se vuelve crónica y la eliminación total del parásito puede lograrse mediante tratamiento con anticuerpos frente al receptor de la citocina IL-10 (Belkaid, Hoffmann et al. 2001). En estos casos, la eliminación del parásito convierte al ratón en susceptible al parásito en caso de reinfección. Esto indicaría que lo que mantiene a las células T efectoras es la presencia del parásito en el organismo. Esto ha provocado que se vuelva a plantear el uso de parásitos vivos como vacuna para que se pueda generar una respuesta protectora duradera. Al objeto de minimizar efectos negativos de patogenicidad debidos al uso de parásitos vivos o atenuados, se ha procedido a usar diferentes metodologías. Así, se ha observado que la patología debida a la infección o causada por la inoculación de parásitos vivos como vacuna se puede reducir mediante el uso simultáneo de secuencias CpG (Mendez, Tabbara et al. 2003). Otros ensayos han dejado patente que parásitos mutantes para LPG, la mayoría no sobreviven en el insecto vector y los que lo hacen, son muy sensibles al complemento y son fácilmente eliminados por los macrófagos en ratones BALB/c, evitando así el desarrollo de patología. Este parásito mutado permanece en el organismo hospedador en el sitio de

infección, dando resistencia frente a la reinfección por *L. major* (Uzonna, Spath et al. 2004). Sin embargo, se ha observado que este parásito mutante, presenta poblaciones que pueden revertir a un fenotipo *wild type* causante de la patología, con lo que no es factible su uso como vacuna en humanos debido al alto riesgo que supone (Spath, Lye et al. 2004).

1.6. Proteínas de choque térmico. Capacidad adyuvante

Su descubrimiento se produjo de forma casual hace unos 50 años cuando de forma accidental alguien aumentó la temperatura de un incubador. Se pudo observar así la presencia de unas estructuras conocidas como “puff” en los cromosomas de glándulas salivares de *Drosophila melanogaster*. Estas estructuras eran indicativas de *loci* transcripcionalmente activos (Ritossa 1962). Estos *loci* codificaban para las proteínas de choque térmico o HSP (*heat shock proteins*) y en los siguientes años se convirtieron en una interesante fuente de estudio para fenómenos tales como regulación transcripcional, respuesta a estrés e incluso estudios evolutivos.

La expresión de estas proteínas puede estar regulada no sólo por el aumento de temperatura, sino también por otros factores como la deprivación de glucosa, presencia de etanol o glucocorticoides. Por otro lado, estas proteínas aparecen también en niveles elevados bajo condiciones normales de la célula (Lindquist and Craig 1988).

Las proteínas de choque térmico son una gran familia en la que se incluyen miembros de muy distinto tamaño, con rangos de pesos moleculares que oscilan de los 6 a los 110 kDa; de hecho, existe una clasificación en función de estos pesos moleculares que las divide en un total de 6 familias: HSPs pequeñas, familia de 40, 60, 70, 90 y 100kDa. Todas estas familias están presentes en kinetopláستidos, siendo las familias HSP70, HSP60 y HSP40 las principalmente implicadas en la biología del parásito (Folgueira and Requena 2007). Es importante señalar que estas proteínas están altamente conservadas entre distintos organismos, con índices de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos en torno al 50%. Por ejemplo, la HSP 70 es una de las proteínas más conservadas que se conocen hasta la fecha. Como se ha comentado anteriormente, estas proteínas son sintetizadas en situaciones de estrés permitiendo a la célula, y en definitiva al organismo, alcanzar una situación de tolerancia ante las condiciones adversas. A pesar de ello, también cabe mencionar que estas proteínas tienen otras funciones celulares

importantes en condiciones de no estrés. Así, asisten a el plegamiento correcto de otras proteínas y participan en el ensamblaje de subunidades proteicas, gracias a su actividad chaperona (Hartl and Hayer-Hartl 2002).

Aunque inicialmente, e incluso hoy en día, estas proteínas de choque térmico son ampliamente estudiadas por todas estas propiedades, también tienen importantes funciones inmunológicas. Las primeras evidencias sobre las funciones inmunológicas de las HSPs comenzaron en los años 1980 cuando fue observado que preparaciones homogéneas de HSPs aisladas de células cancerígenas producían activación inmunológica frente al cáncer. Estas características funcionales se determinaron inicialmente en HSP-gp96, si bien resultados similares se obtuvieron más tarde con la HSP70 (Srivastava, Menoret et al. 1998). Por citar algunas de estas características inmunológicas, podemos decir que algunas de las HSPs se han descrito como antígenos inmunodominantes (Kaufmann 1990; Maresca and Kobayashi 1994), a pesar de su alto grado de conservación (Hightower and Guidon 1989). Otra de sus funciones más estudiadas es su posibilidad de activar linfocitos T CD8⁺ *in vivo*. (Wu, Wan et al. 2005). Así, usando su capacidad de unión a péptidos, las HSPs son capaces de adquirir material proteico antigénico, tanto del interior celular, como tras su administración exógena y activar células CD8⁺ específicas de diferentes moléculas.

Ya, en 1982, se pudo comprobar que las HSPs eran capaces de generar una potente respuesta antígeno específica (Srivastava and Barnum 1982). Aunque estos estudios fueron realizados con la gp96, pronto la lista de HSPs con esta capacidad fue aumentando y se incluyeron otras HSPs como HSP90 (Ullrich, Robinson et al. 1986; Udono and Srivastava 1993), la HSP70 (Udono and Srivastava 1993), la calreticulina (CRT) (Basu and Srivastava 1999) y más recientemente las HSP110 y la grp170 (Wang, Chen et al. 2000). Desde estos primeros estudios hasta nuestros días, podemos concluir que las HSPs tienen importantes funciones inmunológicas, habiéndose implicado en cáncer, vacunación contra agentes infecciosos e inmunoterapia (Anderson and Srivastava 2000). De forma simplificada, podemos decir que se les atribuye un papel central entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Srivastava 2000). Estos autores incluso proponen la liberación de las HSPs por parte de las células como evento primario para la activación de las cascadas innata y adaptativa. La liberación de complejos péptido-HSP por parte de las células podría ser la señal para que se active una respuesta del sistema inmunológico.

Se ha podido comprobar que las HSPs tienen un papel en la activación de la respuesta inmune innata, es decir, independiente del antígeno, desencadenando una serie de eventos que incluyen la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-12 o GM-CSF por parte de macrófagos y quimiocinas como MCP-1, MIP-2 y RANTES, por macrófagos y posiblemente por células T. Entre estos eventos también se incluye la inducción de la óxido nítrico sintetasa por macrófagos y células dendríticas (Panjwani, Popova et al. 2002). Además, las HSPs median en la maduración de células (Planelles, Thomas et al. 2002), potenciando la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII) y moléculas de coestimulación como CD80 y CD40, en células CD11⁺ (Srivastava 2002).

Las HSPs también intervienen en la migración de las células dendríticas desde el foco de infección a los nódulos linfáticos. Así, se ha demostrado que provocan la translocación de NF- κ B al núcleo de macrófagos y células dendríticas, fenómeno que posiblemente media muchos de los citados anteriormente (Basu, Binder et al. 2000; Gullo and Teoh 2004).

Cabe mencionar que todas estas funciones atribuidas a las HSPs aún no se conocen con exactitud. No debemos olvidar que la mayoría de los estudios se realizan con proteínas purificadas en sistemas bacterianos, y esto hace que siempre exista la duda de la posible presencia de lipopolisacárido (LPS) en las preparaciones. El LPS tiene un claro efecto sobre el sistema de inmunidad innata, se trata de una endotoxina por lo que puede ser responsable de muchos de los efectos comentados para las HSPs. De hecho el TLR4 descrito como receptor para el LPS se ha implicado en la vía de señalización por HSPs (Binder, Vatner et al. 2004).

Por otro lado, en cuanto al papel de estas proteínas en la inmunidad adaptativa, respuestas antígeno específicas, ya en los años 50 se propuso que podían tener actividad antitumoral (Klein, Klein et al. 1960). Se ha podido comprobar que gp96, hsp90, hsp70, calreticulina, hsp110 y grp170, son proteínas de choque térmico que unen péptidos, apareciendo asociadas a epítopes antigénicos, de ahí su eficiencia antitumoral. Esta idea se extrapoló a células infectadas por virus y se comprobó que ocurría igual, con la gp96 en virus influenza, listeria o mycobacterium.

También se ha comprobado que la administración exógena de HSPs (hsp70 y gp96) fusionadas a péptidos genera una respuesta de linfocitos T CD8⁺ (Blachere, Li et al. 1997; Gullo and Teoh 2004; Pavlenko, Roos et al.

2004; Wu, Wan et al. 2005) aunque también la administración de péptidos fusionados a HSPs puede generar respuestas CD4⁺ restringidas a clase II. Estos efectos se producían con cantidades muy pequeñas de péptido, y además se pudo comprobar que estas funciones ejercidas por las HSPs fusionadas a los péptidos eran extremadamente sensibles a las funciones de las células presentadoras de antígeno. Esto llevó a pensar que debía existir un receptor para las HSPs y más tarde se pudo comprobar que así era. En el año 2000 Binder y colaboradores (Binder, Han et al. 2000) describen el receptor CD91 de la β_2 -macroglobulina como receptor de la proteína gp96. Más tarde, en el 2001, Basu y colaboradores confirman que probablemente es también receptor de la HSP70, HSP90 y calreticulina (Basu, Binder et al. 2001). Sin embargo, existen pocas evidencias de que CD91 esté implicado en los fenómenos que desencadena la interacción entre HSP-APC independientes de antígeno. Algunos de estos procesos implican transducción de señales y no está claro que CD91 sea un receptor de señalización. Deben existir otros receptores en este caso. En este sentido se ha implicado a TLR4 (*toll like receptor*, receptor de LPS) en la ruta de señalización de hsp60 (Srivastava 2002). También se ha descrito el CD36 como receptor de gp96 (Panjwani, Popova et al. 2002). De todas formas, hay que comentar que no está bien establecida la interacción física con TLR4 ó CD36, ni las vías de señalización. Cabe mencionar además que las HSPs también podrían interactuar con otras células presentadoras como plaquetas, células NK o células T.

Otra de las funciones atribuidas a las HSPs es su posible papel en la señalización de muerte celular por necrosis. En ratas con artritis se ha visto la implicación de células T y a su vez se ha visto que la inmunización con HSP protege frente varias formas de artritis autoinmune en ratas y ratones, lo que hace pensar que las proteínas HSP tengan papel en la regulación de células T ante procesos de inflamación de tejidos, activando células T anti-inflamatorias (Van Eden, Wick et al. 2007).

La HSP70 se ha descrito también como una molécula con capacidad chaperona y como citocina, a través de su interacción con CD40, estimulando la síntesis de TNF- α e IFN- γ (Asea, Kabingu et al. 2000).

Como ya hemos mencionado, la familia de proteínas de choque térmico está formada por proteínas altamente conservadas, incluso entre bacterias, parásitos y mamíferos, por lo que su uso como inmunógeno se ha cuestionado por la posibilidad de inducir autoinmunidad. Se sabe que en individuos sanos

existen anticuerpos y células T que reconocen componentes del propio organismo. El sistema inmunitario responde a sus propias HSP de forma que puede promover el conocimiento y eliminación de células aberrantes que las sobreexpresan. Sin embargo, cuando ocurre un defecto en la regulación de la expresión de las HSP y de las respuestas inmunes específicas de las HSP, pueden desarrollarse reacciones autoinmunes. La tolerancia a los antígenos propios puede llegar a alterarse por el encuentro frecuente del sistema inmunitario con antígenos extraños que son muy similares a proteínas propias. Los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea presentan respuesta inmune frente a la histona H1 y frente a HSP70 del parásito (*L. donovani*), pero no reaccionan frente la HSP70 humana (Carmelo, Zurita et al. 2006).

En el caso de infección, no se debería producir respuesta inmunitaria frente a regiones conservadas entre la HSP del patógeno y la del hospedador, debido lo anteriormente explicado. Sin embargo, se ha observado un aumento en el título de anticuerpos reactivos contra regiones conservadas de las HSP en varias enfermedades infecciosas como es el caso de Malaria, donde se han encontrado anticuerpos que reconocen tanto la HSP70 de *Plasmodium falciparum* como la humana. También se han encontrado células T específicas contra HSP60 y HSP70 propia en pacientes con lepra y tuberculosis (Zugel and Kaufmann 1999). Se postula que esta respuesta de autoinmunidad es debida a la continua exposición a las HSP de organismos comensales, no a que los anticuerpos anti-HSP produzcan directamente la respuesta autoinmune (Zugel and Kaufmann 1999).

1.6.1. HSP70

Este grupo de proteínas de choque térmico ha sido muy estudiado debido a que cumple muchas funciones en el sistema inmunitario. Además de tener actividad chaperona, es una molécula con actividad adyuvante tanto endógena como exógena (Asea, Rehli et al. 2002; Vabulas, Ahmad-Nejad et al. 2002). Se ha descrito que la HSP70 obtenida a partir de células tumorales y células infectadas con virus, induce la activación de células CD8⁺ generando una respuesta citotóxica *in vivo* e *in vitro* frente a los distintos antígenos expresados en estas células (Srivastava 2002; Gullo and Teoh 2004). La inmunogenicidad *in vivo* de complejos péptido-HSP70 derivados de tumores ha sido ampliamente demostrada en tumores de ratones, ratas y humanos y la

vacunación basada en HSP ha sido eficaz tanto en profilaxis como en terapia (Noessner, Gastpar et al. 2002). La HSP70 procedente de células tumorales o de células infectadas por virus tiene la capacidad de activar respuesta CTL CD8⁺ *in vivo* e *in vitro* contra distintos antígenos expresados en las células de las cuales se ha purificado la proteína inmunogénica (Srivastava 2002). Además, la HSP70 extracelular puede formar complejos con distintos antígenos y activar, de este modo, células presentadoras de antígeno (APCs). Esta interacción da lugar a una cascada de eventos que incluyen la presentación por MHC I a células T CD8⁺ y por MHC II a células T CD4⁺, secreción de citocinas proinflamatorias y maduración fenotípica y funcional de células dendríticas (Gullo and Teoh 2004; Tobian, Canaday et al. 2004). La mutación puntual en el dominio de unión a péptidos de la HSP70 no permite la generación de CTLs aún pudiendo inducir la producción de citocinas proinflamatorias por DCs, lo que parece indicar que el papel de la HSP70 en la presentación de antígenos sería independiente de la estimulación de DC. Todas estas características hacen que HSP70 sea un potente adyuvante en respuesta inmunitaria innata y adquirida.

HSP70 presenta fuertes epítopes T y actúa como molécula *carrier* de los antígenos, induciendo células B específicas de antígeno, así como respuesta de células T CD4⁺ y CD8⁺ sin necesidad de adyuvante (Udono, Yamano et al. 2001; Gullo and Teoh 2004). La fusión de HSP70 a la proteína p24 de VIH genera una respuesta frente a esta proteína sin necesidad de adyuvante (Suzue and Young 1996). La inmunización con la proteína de fusión entre un fragmento de 27 aa del antígeno JEV E del virus de la encefalitis japonesa y la proteína HSP70 de *M. tuberculosis* generan una respuesta humoral y celular que resulta altamente protectora frente a la infección por dicho virus (Ge, Qiu et al. 2007). Asimismo, se ha descrito que proteínas quiméricas formadas por antígenos acoplados al fragmento C-terminal de HSP70 de *M. tuberculosis* (Wang, Kelly et al. 2002; Lehner, Wang et al. 2004) o el fragmento N-terminal de *Leishmania infantum* (Rico, Angel et al. 1999) inducen una respuesta inmunitaria humoral y celular frente a los antígenos acoplados. La inmunización de ratones con una dosis de la proteína recombinante IL14 covalentemente unida a la proteína HSP70 de *T. cruzi*, induce un alto nivel de anticuerpos anti-IL14, siendo estos de subtipo IgG2a mayoritariamente (Gonzalez, Thomas et al. 2004). Se ha descrito que la proteína HSP70 de *L. braziliensis* es reconocida por el suero del 84% de los pacientes con

leishmaniasis cutánea y mucocutánea y en un nivel menor (18,75%) por pacientes chagásicos (Zurita, Rodriguez et al. 2003). Los determinantes antigénicos de la proteína HSP70 de *L. braziliensis* se encuentran localizados en el extremo carboxilo de la proteína, presentando este dominio, un 70% de sensibilidad y 100% de especificidad, siendo así, un buen candidato para realizar serodiagnóstico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Zurita, Rodriguez et al. 2003).

Existen receptores para HSP70 en células presentadoras de antígenos de modo que pueden internalizar el antígeno (Srivastava, Udonon et al. 1994). La señalización y presentación de esta proteína se debe a diferentes receptores como ya mencionamos anteriormente, el primero de ellos se descubrió en el año 2000 (Binder, Harris et al. 2000). CD91 es un receptor endocítico de HSP70, mientras que TLR-2 y TLR-4 son receptores de señalización (Binder, Vatner et al. 2004; Qazi, Oehlmann et al. 2007). Así, la HSP70 puede ser reconocida de modo específico por el receptor CD91 dando lugar a la endocitosis y presentación de HSP70 asociada a MHC, a linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ (Udonon, Yamano et al. 2001).

La capacidad adyuvante de HSP70 está basada en la interacción específica de HSP70 con los receptores de células dendríticas y macrófagos, dando lugar a dos tipos distintos de respuesta. Puede estimular una respuesta innata y una respuesta adaptativa con la intervención del complejo mayor de histocompatibilidad, integrando una respuesta innata y adaptativa. Se postula que HSP70 activa células dendríticas mediante la unión de esta a los receptores TLR-2 y TLR-4 expresados en estas células (Moroi, Mayhew et al. 2000; Srivastava 2002). La unión a los receptores desencadena una cascada de señales sobre las células dendríticas inmaduras dando lugar a diferenciación y migración a los ganglios linfáticos (Castellino, Boucher et al. 2000). Esto da lugar a la activación de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad como CD86, CD83, etc., la producción de óxido nítrico y la secreción de citocinas inflamatorias como IL-12, IL-6 y TNF- α . (Kuppner, Gastpar et al. 2001; Gullo and Teoh 2004).

Ensayos de nuestro laboratorio han mostrado *in vitro* que la proteína HSP70 de *T. cruzi* tiene *per se* un singular efecto estimulador sobre células de bazo y ganglio de ratones *naive* (Maranon, Planelles et al. 2000), el cual da lugar a una rápida e intensa estimulación de células T, seguida de un proceso de internalización de los receptores CD3⁺ y TCR $\alpha\beta$ y un proceso de apoptosis

no dependiente de Fas/L. Asimismo, evidenciamos que la inmunización de ratones de distinto haplotipo con un vector vacuna que porta el gen KMP11 de *T. cruzi* (Thomas, Garcia-Perez et al. 2000) fusionado al codificante para la proteína HSP70 induce una producción de anticuerpos IgG de isotipo IgG2a, específicos para KMP11. Además, los ratones C57BL/6-A2K^b inmunizados con la proteína de fusión KMP11-HSP70, pero no los inmunizados con la proteína KMP11 aislada, inducen una respuesta citotóxica frente a células Jurkat-A2K^b expresando la proteína KMP11 así como frente a dichas células cargadas con distintos péptidos de KMP11 de probada unión a la molécula A2. Así, se ha evidenciado la existencia en el antígeno KMP11 de *T. cruzi* de un epítipo A2 inmunodominante y un epítipo A2 críptico (Maranon, Thomas et al. 2001). Interesantemente, los ratones inmunizados con el gen quimérico se protegen en un 50% frente a la infección experimental tardía, tres meses post-última inmunización, con formas infectivas de *T. cruzi* (Planelles, Thomas et al. 2001). La proteína HSP70 de *T. cruzi*, tanto sola como fusionada a la KMP11, así como un fragmento de la HSP70 es capaz de madurar células dendríticas murinas. Las células dendríticas maduras producen un aumento de la expresión de las citoquinas IL12, TNF- α , moléculas de coestimulación y marcadores de activación, mostrando un claro incremento en la capacidad aloestimuladora (Planelles, Thomas et al. 2002). Se ha visto que un fragmento de 29 kDa de la proteína HSP70 de *T. cruzi*, localizado en el dominio amino terminal de dicha proteína, madura células dendríticas humanas activando un específico patrón de citocinas. Además, se observa un diferente patrón de citocinas en células dendríticas de pacientes chagásicos versus controles sanos, maduras por el mencionado fragmento de la HSP70 (Cuellar, Santander et al. 2008).

La inmunización de ratones sensibles BALB/c y resistentes C57BL/6 únicamente con la proteína HSP70 de *Leishmania* o distintos fragmentos de esta, no genera protección frente a una posterior infección por *L. major*. La respuesta humoral generada frente a las diferentes formas truncadas de HSP70 sugiere una respuesta mixta Th1/Th2. Sin embargo, en pacientes que han sufrido leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral, hay respuesta humoral frente a distintas formas de HSP70, lo que demuestra la capacidad de HSP70 de estimular la respuesta humoral en humanos y ratones, dejando de nuevo patente la importancia de esta proteína en el control de leishmaniasis (Rafati, Gholami et al. 2007).

Trabajos recientes del laboratorio, realizados al objeto de avanzar en el conocimiento del mecanismo de activación y modulación de la respuesta inmune inducida por la HSP70 han permitido el análisis comparativo de la respuesta de anticuerpos frente al hapteno OVA en ratones C57BL/6 (*wild type*), así como en ratones transgénicos *knock out* para los receptores TLR2 y TLR4, usando antígenos HSP70 procedentes de distintos organismos, *T. cruzi*, *P. falciparum*, *M. tuberculosis* y *L. braziliensis*. Los resultados obtenidos, evidencian que las proteínas HSP70 son moléculas fuertemente adyuvantes pero, dentro de la misma familia de HSPs (HSPs-70) existen HSPs que muestran diferente grado de capacidad adyuvante tanto en intensidad como en el patrón de respuesta inmune que inducen. Las HSP70 ensayadas inducen una elevada producción de IL12 por macrófagos de médula. Sin embargo, únicamente la proteína HSP70 de *T. cruzi* es capaz de inducir *in vivo* e *in vitro*, frente al hapteno asociado, una respuesta inmunológica mixta (IgG1 e IgG2a) la cual, interesantemente, resulta ser independiente de los receptores TLR2 y TLR4 (Qazi, Oehlmann et al. 2007).

La proteína HSP70 de *T. cruzi* está codificada por copias multigénicas organizadas en tandem con orientación cabeza-cola (Requena, Lopez et al. 1988). Esta proteína comparte un 88% de identidad a nivel de secuencia con su homóloga en *T. brucei* (Requena, Lopez et al. 1989). De forma similar los genes HSP70 de *L. infantum* están formados por 6 copias organizadas en tandem con orientación cabeza-cola, mostrando pequeñas divergencias en la secuencia. Sin embargo, la región 3'-UTR del gen 6 de HSP70 es completamente divergente a la secuencia 3'-UTR presente en los otros 5 genes (Quijada, Soto et al. 1997). Los mRNA correspondientes al sexto gen son los más abundantes pero solo aquellos procedentes de los genes 1 a 5 se acumulan tras un proceso de choque térmico (Quijada, Soto et al. 2000). Estos autores, usando apropiados vectores para transfección en *Leishmania* y empleando el gen cloroanfenicol acetil transferasa (CAT) como gen reportero, han estudiado el papel funcional de estas mencionadas regiones 3'-UTR, comprobando que ambas son esenciales para la traducción de los ARNm de la HSP70 a temperatura de choque térmico (Folgueira, Quijada et al. 2005; Folgueira and Requena 2007). Así mismo, ponen en evidencia que la región 3'-UTR presente en el gen 6 está implicada en el estado silente transduccional observado, a la temperatura normal de crecimiento (26°C), para el transcrito HSP70 que la contiene (Folgueira, Quijada et al. 2005). Estos resultados

permiten sugerir a los autores que los mencionados transcritos correspondientes al gen 6 de la HSP70 son almacenados en el parásito *Leishmania* con la función biológica de activar rápidamente la síntesis *de novo* de la proteína HSP70 cuando estos encuentran situaciones de estrés (Folgueira, Quijada et al. 2005). De hecho, mutantes nulos de dicho gen, generados por disrupción de ambos alelos, sintetizan una significativa menor tasa de traducción que los parásitos normales. La línea obtenida mostró tener defectos que afectan tanto a la morfología como al crecimiento de los promastigotes, presentando incluso alteraciones en la duración de las fases del ciclo celular. Al estudiar la infectividad de los promastigotes deficientes para el mencionado gen HSP70 6, encontraron claras deficiencias en su capacidad de infección tanto en ensayos *in vitro* de infección de macrófagos como en ensayos *in vivo* de infección de ratones (Folgueira y col., comunicación oral en XXIX Congreso de la SEBBM) Estos resultados hacen pensar a los autores del trabajo, la posibilidad de emplear estos parásitos mutantes como vacuna de parásitos atenuados (comunicado personal).

2. OBJETIVOS

2.1. Estudio del efecto activador y modulador de la respuesta inmune de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi* y, especialmente, de un fragmento de 29 kDa de la misma (h70T), usado como proteína de fusión asociada a diferentes haptenos.

2.2. Estudio de la capacidad inmunogénica de los antígenos KMP11, fragmentos amino y carboxilo de PSA-2 y Tgp63 de *Leishmania* asociados o no a h70T y usados como proteínas recombinantes y moléculas de ADN quiméricas. Determinación de la capacidad de estas moléculas quiméricas de inducir protección frente a la infección por *Leishmania infantum* y *Leishmania major*, respectivamente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Productos químicos y material básico

En general los reactivos que se han utilizado en la realización de esta tesis son principalmente de las marcas registradas Merck, Sigma, Boehringer, Pharmacia, Promega, Stratagene, Gibco y Bio-Rad, de la máxima calidad y pureza.

3.2. Tampones y soluciones

- Laemmli: Tris-ClH 50 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, Glicerol 10% (Laemmli 1975).
- Tampón de carga de ácidos nucleicos 10x: glicerol 70% (v/v), sarcosil 5%, azul de bromofenol (BPB) 2% (p/v), xilano cianol 2% (P/V), EDTA 0,1 M pH 8.
- Tampón de electroforesis de proteínas 10x: Tris-base 30,3 g/l, glicina 144,2 g/l, SDS 10 g/l.
- Tampón de lisis de eritrocitos: NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0,1 mM.
- Tampón de transferencia de proteínas 1x: Tris base 25 Mm, glicina 14,4 mM, metanol 15%.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,13 M, Na_2HPO_4 0,07 M, NaH_2PO_4 0,003 M pH 7,2.
- Tampón TAE 50x: Tris-HCl 2 M pH 7,2, EDTA 50 mM pH 8, bromuro de etidio 10 mg/ml, ácido acético hasta pH 7,2 y agua destilada hasta 1 l.
- Tampón TBS 1x: Tris-ClH 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM.
- Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM.
- Tampon de lisis de células: 0,1 M Tris-HCl pH 8; 0,1% Triton X-100.

3.3. Enzimas

- Ribonucleasa pancreática o RNAsa A (Sigma).
- Deoxirribonucleasa de páncreas bovino (DNAsa I) (Sigma).
- Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Roche).
- ADN ligasa del fago T4 (Roche).
- ADN polimerasa de *Termus acuaticus* (Taq) (Roche).
- Proteinasa K (Roche).
- Lisozima de clara de huevo (Sigma).

En cuanto a las enzimas de restricción empleadas así como otras enzimas usadas de forma puntual son principalmente de las casas comerciales Boehringer, Roche, Promega y Pharmacia.

3.4. Anticuerpos

- Anti-mouse IgM acoplada a peroxidasa (Sigma).
- Antimouse IgG acoplada a peroxidasa (Nordik).
- Anti-mouse IgG acoplada a PA (Sigma).
- Antimouse IgG1 acoplada a peroxidasa (Nordik).
- Antimouse IgG2a acoplada a peroxidasa (Nordik).
- Anti-mouse CD3 ϵ -PE (clon 145-2C11, PharMingen).
- Anti-mouse CD4-FITC (clon GK1,5, PharMingen).
- Anti-mouse CD19-FITC (clon 6D5, PharMingen).
- Anti-histidina (Clontech).
- Anti-mouse IL-10-PE (clon JES5-16E3, PharMingen).
- Kit CBA Th1/Th2 Becton-Dickinson. (Ref:551287).

3.5. Oligonucleótidos sintéticos

Los estudios referentes a características termodinámicas y de estructura secundaria de oligonucleótidos se realizan con la ayuda del programa informático “Oligos 4”. Los oligonucleótidos sintetizados son los siguientes:

- II70Tcprimer5': 5'-GTTAGGATCCATGGCAAGGAGCGCAAT-3' (BamHI)
- II70Tcprimer3': 5'-GTTTGCATGCT**TTAT**GGCGTCACGTCGAG-3' (SphI)
- Glía5'BamHI: 5'-GCCAAGGATCCAGCTGCAGTTACAACCG-3'
- Glía3'KpnIBamHI: 5'-GCTAAGGATCCGGTACCAAAACGGTTGCGGTTG-3'
- 70C5'BamHI: 5'-GTTTGGATCCTCTGCGGCGACC-3'
- pQEreverse: 5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'
- Kmp278: 5'-CTATGGTACC**ACTTTCCTGGGAAC**-3' (KpnI)
- IPB/IPB-mod: GGG GGA CGT TCA AGC GTT ATG TCG TTT AAG CGT TAC GAC GTT GGGG (en IPB mod, enlaces fosforotioatos para unir las 7 primeras bases de extremos 5' y 3', el resto, enlace fosfodiester)
- LN/LNmod: GGG GGA CGT TCA TTG CGA ATG TCG TGT AAG CGT TAC TTG CAG GGG (en LN mod, enlaces fosforotioatos para unir las 7 primeras bases de extremos 5' y 3', el resto, enlace fosfodiester)

3.6. Medios de cultivo.

- Medio LB: Bactotripton 10 g/l (Sigma), extracto de levadura 5 g/l (Difco), NaCl 10 g/l, pH 7-7,2.
- Medio DMEM completo, para el cultivo de esplenocitos así como de las líneas celulares: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10% (Gibco), 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma), 1 mM de piruvato sódico (Riedel-deHäen), 2 mM de Glutamina (Merck), 0,25 mM de asparragina (Merck), 0,5 mM de ácido aspártico, 150 U/ml de estreptomycin (Merck) y 100 U/ml de penicilina (Laboratorios ERN) HEPES. En el caso de líneas celulares no se adiciona el hepes ni el piruvato.

- Medio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, estreptomycin 150 U/ml, penicilina 100 U/ml. Cultivo de macrófagos peritoneales.
- Medio Schneider's (GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, estreptomycin 300 U/ml, penicilina 200 U/ml. Empleado para células infectadas con *Leishmania sp.*

3.7. Cepas bacterianas.

Todas las cepas bacterianas empleadas son de la especie *E. coli*:

- XL1-blue (Genotipo: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, F⁺proAB, LacI^r M15), para la transformación (Bullock et al 1987) y propagación de los plásmidos.
- M15 (Nal^s Str^s rif^s lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺ pREP4) para la expresión de proteínas recombinantes.
- REG-1 (Genotipo: mini-Tn5(kan^r nahR/P_{sal}::xylS2) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG) para la expresión de proteínas recombinantes.

3.8. Cultivo de líneas celulares de mamífero.

Se ha trabajado con las siguientes líneas celulares:

- Jurkat-A2 (*wild type*): línea de timo humano.
- Jurkat-A2/K^b: línea de timo humano transfectada establemente con el gen quimérico HLA-A2/K^b.
- P815: línea de mastocitoma de ratón.

Para todos los cultivos de las líneas celulares se utiliza el medio DMEM completo descrito en el punto "Medios de cultivo". Para el mantenimiento de las líneas transfectantes Jurkat-A2/K^b y p815 el medio se suplementa con 500 µg/ml de G-418 (Gibco) Para las células p815 se suplementa con 3,5 mg/ml más de glucosa. Cada tres días el medio se renueva diluyendo el cultivo con medio fresco.

3.9. Cepas de ratones.

Los ratones de la cepa BALB/c (H2-K^d) y C57BL/6 (H2-K^b) se obtienen directamente de IFFA-CREDO (Saint Germain-sur-l'Abresch, France). Los ratones transgénicos C57BL/6-A2.1/K^b (C57BL/6-A2/K^b) (Vitiello, Marchesini et al. 1991), se criaron en las instalaciones del centro a partir de hembras proporcionadas por el Dr. L. Sherman (Scripps Laboratories, San Diego, Ca) a través de Dr. P. Romero (Ludwing Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland). Estos ratones transgénicos expresan el producto del gen quimérico HLA-A2.1/K^b, donde los dominios α_1 y α_2 son iguales a los de la molécula HLA-A2.1 humana y los dominios α_3 , transmembrana y citoplasmático similares a la molécula murina H-2K^b (Fig 4). Todas las cepas de ratones se mantienen bajo las condiciones convencionales de limpieza.

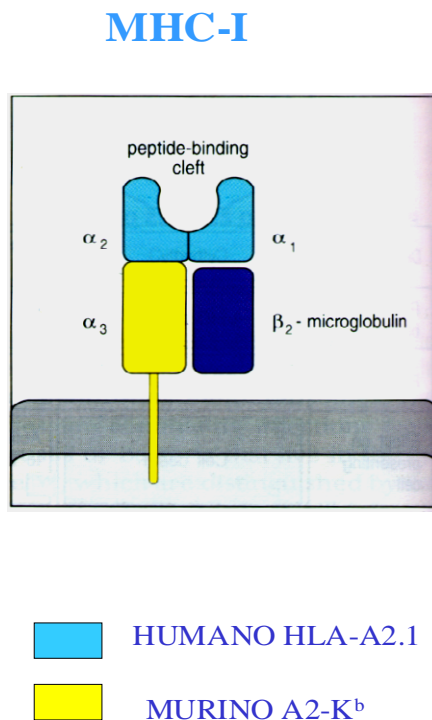


Figura 4.-Ratones C57BL/6-A2-K^b (HLA-I transgénicos): Presentan las hélices α_1 y α_2 humanas (A2.1) y la hélice α_3 murina.

3.10. Purificación de ADN plasmídico

En el caso de purificaciones de ADN de plásmido para reacciones de secuenciación u otros casos donde se necesite alto grado de pureza, se utiliza el kit “Wizard Minipreps” de Promega, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la purificación de ADN de los vectores recombinantes pCMV4, pCMV4-Q4Li, pCMV4-Q5Li, empleados como vectores vacuna, se ha utilizado el kit “Endofree Plasmid Gigakit” (Qiagen) siguiendo el protocolo de la casa comercial.

La concentración de ácidos nucleicos se determina midiendo la absorbancia a 260 nm, tomando como coeficiente de extinción $50 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ADN de doble cadena y $33 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para oligonucleótidos de cadena simple. La medida se realiza en espectrofotómetro Smart Spec Plus Spectrophotometer (BIO-RAD).

3.11. Tratamiento del ADN con proteínas enzimáticas

En este apartado se van a detallar únicamente los tratamientos con enzimas empleadas de manera general.

- Enzimas de restricción: las digestiones del ADN con enzimas de restricción se llevan a cabo según las condiciones especificadas por el fabricante en cada caso (tampón de reacción y temperatura), siendo la relación unidades de enzima/ μg de ADN a digerir generalmente mayor de 2, el volumen de reacción de 20 μl y el tiempo de incubación mínimo de 1 h.
- Fosfatasa alcalina: se emplea para desfosforilar los extremos 5' de los plásmidos utilizados como vectores de clonaje con el fin de evitar su religamiento. La reacción se lleva a cabo durante 1 hora a 37°C, en el mismo tampón en el que se realiza la digestión del ADN. Las endonucleasas de restricción se inactivan previamente según las condiciones específicas de cada una. Una vez desfosforilado, el ADN se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior aislamiento del fragmento.
- ADN ligasa del fago T4: esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-OH y 5'-P de ADN adyacentes. En las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se emplea 1 U de enzima y el tampón de reacción suministrado por la casa comercial. La concentración de vector que se utiliza es de 50 ng, mientras que la de inserto se ajusta a una proporción molar de 2:1 o 1:1 (inserto-vector) según el tamaño del mismo. El volumen final de reacción es de 10 a 15 μl . La mezcla se incuba toda la noche a 16°C. Pasado este tiempo, los productos de la reacción se precipitan y se lavan, empleándose finalmente para transformar células competentes de *E.*

coli mediante electroporación o por choque térmico en cuyo caso no es necesario precipitar y lavar el ADN.

3.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación mediante PCR, a excepción de las de secuenciación, se realizan en un termociclador Perkin-Elmer: GeneAmp PCR System 2400, usando las enzimas *Taq DNA polimerasa* o la mezcla de enzimas modificadas “*Expand™ high fidelity system*” de Boehringer (0,25 U/reacción). La mezcla de reacción tiene un volumen final de 100 µl, y en ella se incluyen entre 20-40 pmoles de cada cebador, tampón de reacción 1x, 0,1 mM de cada dNTP y 10-50 ng de ADN molde. Para la amplificación se utilizan normalmente programas de 30 ciclos.

3.13. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN en base a su tamaño se realiza sobre geles de agarosa al 1% (p/v) con 100 µg/ml de bromuro de etidio, en cubetas de desarrollo horizontal. Como tampón de carga de alta densidad utilizamos el descrito como de tipo II por Sambrook y col. (1989). Como tampón de electroforesis, TAE 1x de 0,1 mg/ml. Las condiciones de electroforesis fueron 100 V/cm durante 1 hora.

Los marcadores de peso molecular utilizados son ADN del fago Lambda gt11 digerido con *HindIII* (Daniels y col., 1983) o con *BstEII* así como ADN del citado fago digerido con *HaeIII* (Fuchs et al. 1978). Todos de la casa comercial Boehringer.

Para la visualización de los ácidos nucleicos con luz ultravioleta, se utiliza radiación con una longitud de onda de 366 nm. La fotografía del gel marcado con Bromuro de Etidio se realiza con el expositor de geles a ultravioleta GEL/CHEMI DOC (BIO-RAD) y el programa gelDoc.

La recuperación de los fragmentos de ADN desde el gel de agarosa se realiza mediante elución de la banda deseada y unión del ADN a un intercambiador aniónico en un soporte sólido, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial (“Quiaex gel extraction kit”, de Quiagen).

3.14. Clones recombinantes

Clones construidos por personal del laboratorio:

- pQE₃₂KMP11-HSP70: empleado para generar la fusión KMP11-h70T.
- pCMV4-KMP11: empleado para la construcción de pALEX-KMP11-C-LYT.
- pQE₃₂-HSP70: empleado para la construcción de pQE₃₂-Glía33x2-HSP70.
- pQE₃₂-h70T: empleado para la construcción de pQE₃₂-Glía33-h70T.
- pALEX.Glía: clon proporcionado por la empresa Biomedal.
- pQE₃₀-Q4Li: empleado para purificación de la proteína Q4Li y construcción de pCMV4-Q4Li. Construido por M.C. Thomas y colaboradores, contiene de forma funcional y en fase los genes codificantes de los antígenos KMP11, fragmento amino de PSA, fragmento carboxilo de PSA y el fragmento de gp63 (Tgp63) separados respectivamente por Glicina.
- pQE₃₀-Q5Li: purificación de la proteína Q5Li y construcción de pCMV4-Q5Li. Realizado por M.C. Thomas y colaboradores. Consiste en asociar en fase a los genes de los antígenos de *Leishmania* en pQE₃₀-Q4Li, el fragmento génico que codifica un fragmento de 29 kDa de la proteína HSP70 (h70T) (Planelles, Thomas et al. 2002)
- pCMV4-Q4Li: vector empleado para inmunización de ratones y transfección celular.
- pCMV4-Q5Li: vector empleado para inmunización de ratones.
- pQE₃₀-KMP11Li: purificación de la proteína KMP11Li
- pQE₃₀-PSA-NH₂Li: purificación de la proteína PSA-NH₂Li
- pQE₃₀-PSA-COOLi: purificación de la proteína PSA-COOLi
- pQE₃₀-Tgp63Li: purificación de la proteína Tgp63Li

3.15. Construcción de clones recombinantes

La construcción de los clones empleados durante esta tesis doctoral partiendo de clones existentes en el laboratorio se especifica como parte de los resultados de esta tesis.

3.16. Transformación de *E. coli* con los plásmidos de ADN recombinantes

3.16.1. Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes

Para la preparación de células electrocompetentes utilizamos el protocolo recomendado por el fabricante del electroporador (BTX). Las bacterias se crecen hasta una densidad óptica de 0,6-0,8 a 600 nm, y se recogen mediante centrifugación a 4000 g 15 minutos y 4°C. A continuación, se realizan lavados con agua bidestilada esterilizada fría en las mismas condiciones: 1 volumen, 0,5 volúmenes dos veces, 0,02 volúmenes. Finalmente, el sedimento se resuspende en 0,002-0,003 volúmenes de glicerol al 10% frío y esterilizado por filtración. Las bacterias electrocompetentes se conservan en alícuotas a -70°C.

El ADN debe estar resuspendido en agua bidestilada, y el volumen utilizado es de 1 µl. En una cubeta de electroporación se mezclan en frío 40 µl de bacterias y 1 µl de ADN. Esta mezcla se somete a un pulso de 6 mseg a 12,25 Kv/cm. Inmediatamente después se añade 1 ml de medio SOC precalentado a 37°C, con el que se recogen las células de la cubeta. La mezcla se mantiene a 37°C con agitación suave durante 1 h, y después 100-500 µl se siembran en LB-agar, con el antibiótico de selección adecuado. Las placas de LB-agar se incuban a 37°C durante 12-16h.

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

En plásmidos que portan el gen de resistencia a la ampicilina, como los originados a partir del pCMV4 ó del pQE, la selección de los transformantes se basó en el hecho de que solamente las células transformadas pueden crecer en un medio que contenga este antibiótico. Las colonias obtenidas se cultivan en medio LB líquido con ampicilina, con la finalidad de extraer el ADN plasmídico y verificar la presencia del inserto y la orientación del mismo mediante digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción y posterior secuenciación.

En plásmidos que portan el gen de resistencia a Zeocina, como los originados a partir de pZeo, la selección de los transformantes se hizo siguiendo el procedimiento arriba indicado, pero empleando medio LB con zeocina, donde solamente pueden crecer las células transformadas.

3.17. Secuenciación de ADN

La secuencia de un fragmento de ADN se determina en base al método de Sanger (1977), a través de una reacción de PCR utilizando el “ADN

sequencing kit” de Perkin Elmer y la enzima *Taq DNA polimerasa* (Boehringer). Los componentes de la reacción son: 0,4-1 µg de ADN, 3,2 pmoles de cebador y la mezcla de dNTPs con los terminadores marcados adecuados. Los fragmentos de ADN de cadena simple amplificados se separan mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida. La visualización de dichos productos, así como el análisis de resultados se realiza en un secuenciador automático 373 ADN Sequencer Stretch de Applied Biosystem.

3.18. Purificación de las distintas proteínas recombinantes a estudio

Los vectores utilizados para la expresión de las proteínas recombinantes a estudio son pQE y pALEX. La purificación se realiza por cromatografía de afinidad a níquel (Qiagen), usando el Tag de 6 Histidinas y elución con imidazol o tampón salino a distintos pHs. Las distintas proteínas recombinantes que contienen como Tag el fragmento C-LYT se purifican mediante columnas C-LYTAG (Biomedal) y elución con colina.

En todos los casos se parte de un cultivo bacteriano crecido toda la noche con el cual, al día siguiente, se prepara un cultivo de 500 ml haciendo una dilución de 1:50 a 1:100. Cuando este cultivo alcanza la densidad óptica de 0,2 (600 nm), el mismo se induce con el inductor apropiado para cada proteína, a la concentración y tiempo de inducción establecido, en cada caso, como más idóneo.

Todas las proteínas que van a ser empleadas en experimentos que implican el uso de cultivos celulares así como aquellas que son inoculadas en animales de experimentación, son chequeadas con el *limulus* Amebocyte Lysate reaction kit (E-toxate; Sigma, St Louis, MO) y empleadas en los ensayos cuando las concentraciones de endotoxinas estaban por debajo de los límites de detección del kit.

3.18.1. Purificación de la proteína KMP11Li

La purificación de la proteína KMP11Li se realiza a partir de células M15 tranfectadas con el plásmido pQE₃₀-KMP11Li, disponible en el laboratorio. La inducción de la proteína recombinante se realiza mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. Las bacterias se recogen mediante centrifugación y las proteínas se resuspenden en proporción 50:1 en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, ClNa 0,3 M, PMSF 100 mM). Posteriormente

la solubilización se favorece por sonicación del extracto durante 8 minutos a intervalos del 50%. El extracto de proteínas solubilizadas se incuba con la resina equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras empaquetar la resina en columna, esta se lava con tampón de lavado (ClNa 0,3 M, NaH₂PO₄ 50 mM, PMSF 1 mM y βME 10 mM) a pH 8, pH 7,5, pH 6 y 5,5. La proteína se eluye en este mismo buffer a pH 4.

Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 16%.

3.18.2. Purificación de la proteína PSA-NH₂Li

La purificación de la proteína PSA-NH₂Li se realiza a partir de células M15 tranfectadas con el plásmido pQE₃₀-PSA-NH₂Li, disponible en el laboratorio.

La inducción de la proteína se lleva a cabo con 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. Tras recoger las bacterias mediante centrifugación el pellet bacteriano se resuspende en proporción 50:1 en tampón fosfato a pH8 (Na₂HPO₄ 50 mM, ClNa 300 mM). Se añade una punta de espátula de lisozima y se agita durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se sonica durante 8 minutos con pulsos al 40%. Se realizan tres extracciones. La proteína solubilizada en tampón fosfato suplementado con PMSF 1 mM y βME 10 mM y Glicerol 10% a pH 8, se incuba con la resina que previamente equilibrada en este tampón. Tras empaquetar la resina en una columna esta se lava con tampón fosfato a pH8, y a pH 7,5 (mismo tampón sin glicerol). La elución se realiza a pH 6 y pH 4 (mismo tampón sin glicerol y sin βME). Con cada uno recogemos 3-4 fracciones de 1,5 ml cada una.

Las distintas fracciones se visualizan en gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 16%.

3.18.3. Purificación de la proteína PSA-COOLi

La expresión de la proteína PSA-COOLi se realiza en la cepa M15 de *E. coli*. La inducción de la expresión de la proteína se realiza por adición de 1 mM de IPTG y crecimiento en agitación durante 3 horas a 37°C. Las bacterias se recogen mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Se realizan tres solubilizaciones en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, ClNa 300

mM). En la primera se añade una punta de espátula de lisozima y se agita durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se sonica durante 8 minutos con pulsos al 40%. Cada uno de los extractos de proteínas solubilizadas se incuban con la resina que equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante toda la noche a temperatura ambiente. La resina, empaquetada en columna se lava con tampón fosfato suplementado con PMSF 1 mM , β ME 10 mM y Glicerol 10%, a pH 8, pH 7,5 y pH 6,5. La elución de la proteína se realiza a pH 5 y pH 4 (mismo tampón que el de pH 6,5).

Las distintas fracciones se visualizan en gel desnaturante de SDS-poliacrilamida al 16%.

3.18.4. Purificación de la proteína Tgp63Li

La sobreexpresión de la proteína Tgp63Li se realiza en la cepa M15 de *E. coli* XL1-blue tras añadir 0,1 mM de IPTG al cultivo y crecerlo en agitación durante 1,5 horas a 37°C. Las bacterias se recogen mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Se realizan tres solubilizaciones en tampón fosfato a pH 8 (Na_2HPO_4 50 mM, ClNa 300 mM). En la primera se añade una punta de espátula de lisozima y se agita durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se sonica durante 8 minutos con pulsos al 40%. Cada uno de los extractos de proteínas solubilizadas se incuban con la resina que equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante toda la noche a temperatura ambiente. Empaquetar la resina y montar la columna sobre un pie. La resina se lava con tampón fosfato suplementado con PMSF 1 mM , β ME 10 mM y Glicerol 10%, a pH 8 y pH 7,5. La elución de la proteína se realiza a pH 5 y pH 4 (mismo tampón sin glicerol y sin β ME).

Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturantes de SDS-poliacrilamida al 16%.

3.18.5. Purificación de las proteínas recombinantes Q4Li y Q5Li

La purificación de las proteínas Q4Li y Q5Li se realiza a partir de células XL1-Blue o M15 transformadas con el plásmido pQE₃₀-Q4Li y pQE₃₀-Q5Li, disponibles en el laboratorio. Se parte de un preinóculo de 10 ml de medio LB suplementado con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y Kanamicina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en caso de usar la cepa M15) crecido a 37°C y en agitación a 220 rpm. La inducción de la

proteína recombinante se realiza con 0,1 mM de IPTG al cultivo y crecimiento en agitación durante 3 horas a 37°C. Las bacterias se recogen mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Se realizan dos solubilizaciones en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, ClNa 300 mM) suplementado con PMSF 1 mM, βME 10 mM, Glicerol 10% e Imidazol 10 mM. En la primera extracción se añade una punta de espátula de lisozima y se agita durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se sonica durante 8 minutos con pulsos al 40%. Cada uno de los extractos de proteínas solubilizadas se incuban con la resina equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras empaquetar la resina y montar la columna sobre un pie, la resina se lava con tampón fosfato suplementado con PMSF 1 mM , βME 10 mM y Glicerol 10%, a pH 8 y pH 7,5. La elución de la proteína se realiza en este mismo buffer (sin βME) a pH6, pH 5 y pH 4. Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10%.

3.18.6. Purificación de las proteínas recombinantes KMP11-HSP70; KMP11-h70T; KMP11-h70TA y KMP11-h70TC

La purificación de estas proteínas se realiza a partir de células XL1-blue o M15 tranfectadas con el plásmido pQE₃₂-Kmp11-HSP70, pQE₃₂-Kmp11-h70T, pQE₃₂-Kmp11-h70TA y pQE₃₂-Kmp11-h70TC.

La inducción se realiza con 0,02 mM de IPTG durante 1,5 horas a 37°C y 220 rpm de agitación. Las bacterias se recogen mediante centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos. El pellet se resuspende en proporción 20:1 de tampón de resuspensión pH 8 (Na₂PO₄ 50 mM, Cl Na 0,3 M y PMSF 1 mM). Se añade una pizca de lisozima y se agita durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se sonica durante 8 minutos con pulsos al 50% y volvemos a centrifugar 30 min a 400 rpm y 4°C. Se realiza una segunda solubilización.

Al extracto de proteína solubilizadas se le añade βME 10 mM y se incuban con la resina durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Tras empaquetar la resina en la columna esta se lava con tampón de lavado (ClNa 0,3 M, NaHPO₄ 50 mM, PMSF 1 mM, βME 10 mM) a pH 8, a pH 7,5 y la proteína se eluye en este mismo tampón (sin βME) a pH 6 y pH 4.

Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 16%.

3.18.7. Purificación de las proteínas Glía33x2-HSP70 y Glía33-HSP70

Estas proteínas se expresan en XL1-Blue (*E. coli*) transformadas con los plásmidos pQE₃₂-Glía33x2-HSP70 y pQE₃₂-Glía33-HSP70. Para llevar a cabo la purificación partimos de preinóculo y lo llevamos a un volumen de 500 ml de LB haciendo dilución 1/10 a partir del preinóculo y añadimos 500 µl de Ampicilina. La inducción se realiza con 0,1 mM de IPTG durante 1,5 horas a 37°C y 220 rpm. Pasado este tiempo, se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos y recogemos el pellet bacteriano. Llevamos a cabo la solubilización con tampón de resuspensión (Na₂HPO₄ 50 mM; ClNa 60 mM y PMSF 1 mM) a pH 8. Los extractos solubles se ajustan a NaCl 0,3 M; MgCl₂ 5 mM; PMSF 1 mM; βME 10 mM; Glicerol 10% y Na₂HPO₄ 50 mM) a pH 8 y se incuban con la resina toda la noche. La resina se lava con la misma solución a pH 8 y pH 7,5 y se eluye en la misma disolución a pH 6. Cada fracción obtenida se chequea en geles desnaturalizantes de SDS-page al 10%.

3.18.8. Purificación de la proteína Glía33-h70T

Esta proteína se expresa en XL1-Blue (*E. coli*) transformada con el plásmido pQE₃₂-Glía33-h70T. Partimos de un preinóculo y lo llevamos a un volumen de 500ml de LB y 500 µl de Ampicilina haciendo dilución 1/50 a partir del preinóculo. La inducción se realiza con 0,02 mM de IPTG durante 1,5 horas a 37°C y 220 rpm. Pasado este tiempo, se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos y recogemos el pellet bacteriano. Llevamos a cabo la solubilización con tampón de resuspensión (Na₂HPO₄ 10 mM; ClNa 60 mM y PMSF 1 mM) a pH 8. En la primera solubilización se añade un poco de lisozima y agita durante 1 hora a 4°C. El solubilizado se ajusta a NaCl 0,3 M; PMSF 1 mM; βME 10 mM y Na₂HPO₄ 50 mM, pH8 y se deja uniendo a la resina durante 2,5 horas. Para la purificación se empaquetan la resina y el lisado en jeringa y se emplea el mismo buffer de equilibrado a distintos pHs: pH 8, pH 7,5.. Se eluye con la misma solución a pH6. La purificación se chequea en geles desnaturalizantes de SDS-page al 10%.

3.18.9. Purificación de la proteína Glía33x2

Esta proteína se expresa en M15 (*E.coli*) transformada con el plásmido pQE₃₂-Glí33x2. Partimos de un preinóculo y lo llevamos a un volumen de 500 ml haciendo dilución 1/10 a partir del preinóculo y añadiendo 500 µl de Ampicilina y Kanamicina. La inducción se realiza con 1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C y 220 rpm. Pasado este tiempo, se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos y recogemos el pellet bacteriano. Llevamos a cabo la solubilización con tampón de resuspensión (Na₂HPO₄ 0,1 mM; TrisClH 0,01 M; Urea 8M y PMSF 1mM) a pH 8. En la primera solubilización se añade un poco de lisozima y agita durante 1 hora a 4°C. Después se sonica durante 8 minutos con pulsos y se centrifuga a 1200 rpm durante 20 minutos. El solubilizado se incuba con la resina C-LYTAG equilibrada en tampón de resuspensión durante 2 horas. Los lavado se realizan también con esta solución a pH 8 y 7,5. La proteína se eluye a pH 6, 5 y, especialmente pH 4. La purificación se chequea en gel desnaturante de SDS-page al 16%. Tras la purificación hay que dializar las fracciones proteicas para eliminar la Urea y luego liofilizar si es necesario concentrar.

3.18.10. Purificación de las proteínas C-LYT-Glía33, C-LYT-KMP11 y C-LYT

Estas proteínas se expresan en recA-1 (*E. coli*) tranfectadas con el plásmido pALEX conteniendo las distintas construcciones. Las bacterias se crecen en medio LB en presencia de ampicilina y kanamicina. La inducción se hace con 2 mM de Salicilato. La solubilización de las proteínas se realiza en buffer fosfato 20 mM a pH 7 y NaCl₂ 1,5 M y mediante 10 pulsos al 60% de 20 segundos. La resina equilibrada en el mencionado tampón incuba con el extracto de proteínas solubilizadas durante 5 minutos. La resina se lava con 15 ml de buffer fosfato 20 mM a pH 7 y la proteína recombinante se eluye con buffer fosfato 20 mM a pH 7 y 250 mM de colina. Cada fracción de 1 ml obtenida, se chequea en geles desnaturizantes de SDS-page al 16%.

Para la determinación de la concentración de proteínas en las diferentes muestras se utiliza el método de Bradford (1976) (Bio-Rad). En cada determinación se prepara una curva patrón de concentración, tomando como proteína de referencia la albúmina.

3.19. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida: SDS-PAGE

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida empleamos el sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad). La concentración de los geles variaba en función del tamaño de la proteína que se quería discriminar. Por ello, usamos geles de un rango de concentración de 10-16%, usando el protocolo descrito por Sambrook y col. (1989). A las muestras se les añade 1 volumen de tampón de Laemmli y se hierven 5 min antes de cargarlas en el gel. Una vez finalizada la electroforesis se utiliza el método Fairbanks de tinción rápida. En este método se emplean un total de 4 soluciones: la primera de ellas contiene isopropanol al 25%, ácido acético al 10% y azul coomassie 0,05%. El gel se introduce en esta solución en un recipiente ventilado, y se calienta en el microondas a máxima potencia durante unos dos minutos (hasta ebullición). Se deja enfriar en agitación a temperatura ambiente unos 5 minutos. Retiramos esta solución y lavamos con agua. Se añade ahora una solución con isopropanol al 10%, y ácido acético al 10%, en la que se incluye un 0,005% de azul Coomassie. Volvemos a calentar en el microondas hasta ebullición. Retirar la solución, lavar y añadir la tercera solución que contiene sólo ácido acético (10%) y azul Coomassie (0,002%). Calentar en microondas y dejar enfriar. Lavar con agua y añadir la última solución que contiene un 10% de ácido acético y no incluye azul Coomassie. Nuevamente calentamos en el microondas. Con esta solución en frío se puede dejar de 15 minutos hasta toda la noche. En el recipiente también se incluye una esponja con el fin de retirar los restos de colorante para desteñir por completo el gel. Una vez finalizado el proceso de tinción, el gel se seca a vacío entre papel celofán (Bio-Rad).

En aquellos casos en los que transferimos el gel a membranas, se procede directamente a la transferencia justo después de la electroforesis, obviando el proceso de fijación.

Como marcadores de peso molecular se utilizan los siguientes:

- “SDS-PAGE Broad Range” (Bio-rad): Aproximadamente 200000, 1162500, 97400, 662000, 45000, 31000, 21500, 14400 y 6500 Da.
- “Prestained SDS-PAGE Broad Range” (Bio-rad): Aproximadamente 206911, 118961, 98540, 56695, 37544, 29494, 20265 y 6880 Da.

Los pesos moleculares en Daltons (Da) pueden variar ligeramente, según el lote del marcador.

3.20. Inmunodetección de proteínas fijadas en membranas (“Western blot”)

Para transferir proteínas desde geles de acrilamida hasta membranas, se utiliza el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad, y la membrana de PVDF (Millipore), usando tampón de transferencia 1x, y transfiriendo durante 2 h a 70 V.

La membrana a la que se transfieren las proteínas se bloquea entre 1 y 15 h con solución de bloqueo (leche desnatada 5%, Tween-20 1% en TBS 1x), y seguidamente se lava con solución de lavado (Tween-20 1% en TBS 1x), tres veces durante 10 min. La incubación con el primer anticuerpo a la dilución adecuada se realiza en solución de bloqueo durante 2h, después de la cual se vuelve a lavar tres veces con la misma solución. A continuación se procede a la incubación con el conjugado del segundo anticuerpo (anti-ratón) acoplado a fosfatasa alcalina, durante 2 h. Lavar nuevamente tres veces e incubar con la solución de substratos cromogénicos (NaCl 0,1 M, Cl₂Mg 5 mM, Tris-Cl 0,1 M pH 9,5 , NBT 0,33% (Boehringer), BCIP 0,165% (Sigma)) durante 10-20 min (en ocasiones tiempos mayores) hasta que el color alcanza la intensidad deseada. La reacción se detiene con abundante agua bidestilada, y la membrana se conserva seca entre papel plástico.

3.21. Expresión de proteínas recombinantes en células eucariotas por los vectores recombinantes de pCVM4

La correcta expresión de las proteínas KMP11-HSP70, KMP11-h70T, KMP11-h70TA, KMP11-h70TC, Q4Li y Q5Li en células Jurkat-A2/K^b y p815 se realizó tras llevar a cabo la transfección de estas células con los correspondientes genes codificantes de las mismas clonadas en el vector pCMV4 (Planelles, Thomas et al. 2001) y posterior inmunodetección de las mismas en los extractos celulares. Para llevar a cabo la transfección, las células se incuban durante 6 horas en presencia de lipofectina (Gibco BRL) con 2 µg de ADN de cada uno de los vectores mencionados. A continuación, las células transfectadas son lisadas a distintos tiempos con objeto de determinar el tiempo de máxima expresión, con tampón de lisis (0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1% Triton X-100). Los extractos celulares (un total de 40 µg de cada uno de

ellos) se someten a una electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y se transfieren a una membrana PVDF (Millipore) empleando el sistema Miniprotean (Bio-Rad). Realizamos análisis de Western Blot según la metodología estándar descrita anteriormente (Towbin y col., 1979), utilizando anticuerpo anti-histidina (Clontech) a dilución 1/1000 y un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) a una dilución 1/5000.

3.22. Protocolo de inmunización de ratones con proteínas recombinantes a estudio y plásmidos de ADN

Ratones BALB/c y C57BL/6-A2/K^b se inyectan vía intraperitoneal y subcutánea con 2 y 0.1 µg de las proteínas recombinantes: Q4Li y Q5Li. Ratones BALB/c son inoculados con 5 y 2 µg de la proteína recombinante Q5Li y 100 µg de distintas secuencias CpG. Cada ratón recibe la proteína en 100 µl de solución de cloruro sódico al 0.9% esteril (Sigma). Siempre se incluye un grupo control inoculado únicamente con solución salina.

Grupos de ratones C57BL/6 y C57BL/6-A2/K^b se inyectaron vía intramuscular con 100 µg de uno de los siguientes plásmidos de ADN: pCMV4 (plásmido control), pCMV4-Q4Li (plásmido portador de los genes fusionados en fase KMP11Li, Tgp63Li, PSA-NH₂Li y PSA-COOLi), pCMV4-Q5Li (plásmido portador de los genes fusionados en fase KMP11Li, Tgp63Li, PSA-NH₂Li, PSA-COOLi y h70T). Cada ratón recibe el ADN disuelto en 100 µl de solución de cloruro sódico al 0.9% estéril (Sigma), 50 µl en el músculo tibial anterior de cada pata. Se incluye un grupo de ratones control, que se inocula solamente con solución salina. Cada ratón se inmuniza 4 veces, con un intervalo de 2 semanas entre las dosis.

3.23. Detección de anticuerpos en suero frente a proteínas recombinantes mediante ELISA

Los niveles de anticuerpos (IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM) específicos frente a las distintas proteínas empleadas, se determinaron en los sueros de ratones BALB/c y C57BL/6 inmunizados con plásmidos de ADN y con proteínas. Para ello, los ratones se sangran en distintos días.

En las determinaciones de títulos de anticuerpos frente a las distintas proteínas recombinantes se utilizó la técnica de ELISA, fijando en cada pocillo de la placa (Nunc) 0,5 µg de proteína, disuelta en 100 µl de solución de $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 10 mM, pH 9,6 (por duplicado). La placa se incubaba a 37°C durante 1 h y se mantiene a 4°C durante toda la noche. A continuación lavamos dos veces con PBS-Tween 0,05%. El bloqueo se realiza con leche desnatada en polvo al 5% en PBS durante 2 h, y después de desecharla, se añaden los sueros diluidos en esta misma solución. Los sueros se incubaron durante 2 h a 37°C, en un volumen de 100 µl por pocillo. Después de lavar las placas de cuatro a seis veces con PBS-Tween 0,05% se añaden 100 µl de una solución del segundo anticuerpo acoplado con peroxidasa en PBS-Tween 0,05%-leche desnatada 5%, durante 1 h a 37°C. Se realiza cuatro lavados con PBS-Tween 0,05%. El revelado se hace con OPD (ortofenildiamina, Sigma), disuelto en tampón citrato pH 5, 100µl por pocillo. Se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2N y se realiza la medida de densidad óptica en este caso a una longitud de onda de 492 nm. Siempre se incluye un pocillo en blanco, es decir que llevará fijado el antígeno y sufre todo el proceso en paralelo con las muestras de forma que nos indicará el valor basal o de fondo.

3.24. Procesamiento células de bazo y ganglios linfáticos

Tras la extracción estéril, el bazo y/o los gánglios linfáticos (inguinales, poplíteos, mesentéricos, cervicales y axilares) de los ratones a analizar, se homogenizan en PBS al 1% de suero bovino fetal inactivado (SBFI) en una placa de Petri y usando el émbolo de una jeringa estéril. A continuación, las células se lavan y se resuspenden en tampón de lisis de eritrocitos incubándose a temperatura ambiente durante 3 min. Transcurrido este tiempo añadimos PBS con 1% SBFI para parar la reacción y pasamos la suspensión por un filtro de nylon (Falcon) para quitar los agregados. Tras lavar de nuevo, se resuspenden las células en medio DMEM completo y se contabilizan las células viables por tinción con el colorante azul Trypan y empleando una cámara de Neubauer.

3.25. Ensayo de linfoproliferación

Para los ensayos de proliferación celular, las células del bazo de los ratones vacunados así como de los ratones control son cultivadas por

triplicado en placas de 96 pocillos y fondo redondo (4×10^5 células/pocillo) en presencia o ausencia de distintas concentraciones de antígeno o Concanavalina A (mitógeno). El volumen final es de 200 μ l/pocillo y el medio utilizado, DMEM completo (apartado 3.6). Las placas se incuban durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, añadimos 0,5 μ Ci de [³H-metil] timidina por pocillo y prolongamos la incubación a 37°C durante 8 horas más. A continuación se recogen las células en un *harvester* (Inotech) y el ADN se inmoviliza sobre una membrana de fibra de vidrio (Wallac). La radiactividad retenida en el filtro se mide en un contador de centelleo líquido (Wallac 1450 microbeta counter). Los resultados se expresan como índice de estimulación, calculado a partir de la fórmula:

Índice de estimulación = [cpm (cultivo estimulado) – cpm (cultivo sin estimular)] / cpm (cultivo sin estimular).

3.26. Inmunodetección de proteínas de la superficie celular mediante citometría de flujo

Las células en las que se quiere analizar la expresión superficial de proteínas CD3/CD4 y CD19 son resuspendidas en medio DMEM completo. En una placa de 96 pocillos y fondo en V se añaden entre 2×10^5 y 2×10^6 células/pocillo, manteniendo la placa en hielo durante todo el proceso de tinción. Las células se lavan con PBS y se resuspenden en 50 μ l de Fc block durante 10 minutos. Tras un lavado con PBS, incubamos en primer lugar las células con los anticuerpos monoclonales que no están marcados con fluorocromos, en un volumen de 50 μ l. Transcurridos 20 min, realizamos dos lavados con PBS e incubamos las células con los anticuerpos (primarios o secundarios) marcados con algún fluorocromo (FITC, PE) cubriendo la placa con papel de aluminio durante 20 minutos. A continuación, las células se lavan dos veces con PBS, se resuspenden en 300 μ l de PBS y se analizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Cuando interesa posponer el análisis, las células pueden conservarse fijándolas con paraformaldehído al 2% y manteniéndolas a 4°C. El análisis posterior de los datos adquiridos se realiza utilizando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson) y el programa WinMDI 2.8 (J. Trotter. Scripps Laboratoires, San Diego, CA).

3.27. Determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares

3.27.1. Determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares mediante ELISA

Para determinar los niveles de las citoquinas de ratón TNF- α e IL4, presentes en el sobrenadante de cultivos celulares utilizamos el kit "OptEIA™" de la casa comercial Pharmingen. El procedimiento a seguir, descrito a continuación, es el especificado por los fabricantes.

El anticuerpo de captura diluido, anti-TNF- α ó anti-IL4, se añade en una placa flexible de 96 pocillos (Nunc) y se incuba durante toda la noche a 4 °C. Como tampón para diluir, fosfato sódico 0,2 M a un pH 6,5. Como tampón para todos los lavados se utiliza Tween 20 al 0,05% en PBS. Tras realizar 3 lavados, los pocillos se rellenan con 200 μ l de solución de bloqueo, PBS con SBF1 al 10%. La placa se mantiene 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, lavamos tres veces la placa y depositamos en los pocillos los estándares así como las muestras problema disueltas en un volumen de 100 μ l/pocillo. Cada determinación se hace por duplicado y para cada muestra evaluamos dos diluciones. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente y 5 lavados posteriores, añadimos en cada pocillo 100 μ l de solución detectora, que contiene el anticuerpo monoclonal de ratón (TNF- α o IL4) biotinilado y la enzima peroxidasa conjugada con avidina, todo ello disuelto en PBS con SBF1 al 10%. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente seguida de 7 lavados, añadimos a cada pocillo 100 μ l de solución substrato, consistente en tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrogeno. Incubamos 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y a continuación se añaden 50 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción. Por ultimo, medimos la densidad óptica a 620 nm en un lector de ELISA.

3.27.2 Determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares mediante citometría de flujo

Mediante el kit CBA – Mouse Th1/Th2 cytokine kit- (Becton Dickinson) llevamos a cabo la determinación de las citoquinas liberadas al sobrenadante por parte de células murinas. Determinamos TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5.

Se emplea una curva de concentración de todas las citoquinas haciendo diluciones seriadas a partir de un stock con 5000 pg/ml de cada citoquina.

Posteriormente se incuban el control negativo (Assay diluent), las muestras de la curva y las muestras problema con una mezcla de bolitas de captura de cada citoquina (todas juntas) y con el fluorocromo PE, durante 3 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz. Pasado este tiempo se añaden 150 µl de tampón de lavado y se centrifugan a 200 g durante 5 minutos. Después se aspira el sobrenadante y se vuelve a lavar con otros 150 µl de tampón de lavado. Finalmente se preparan en 300 µl de tampón de lavado para pasar por el citómetro.

En el citómetro primero se establecen los setting mediante isotipos del kit, posteriormente se realiza la curva y por último se pasan las muestras problema. Posteriormente, con todos los datos el programa los analiza y refleja la concentración en cada muestra ensayada. El programa es “BD CBA 6 Beads análisis”.

3.28. Análisis de actividad citotóxica en esplenocitos de ratones inmunizados

3.28.1. Estimulación de los esplenocitos *in vitro*

Para cada grupo de ratones inoculados con plásmidos de ADN o con proteína, se extrae el bazo entre 2 y 10 semanas tras la última inmunización, se homogeniza y las células se resuspenden en medio DMEM completo (apartado 3.6). Un total de 5×10^6 esplenocitos/pocillo son incubados en placas de 24 pocillos junto a $5-10 \times 10^5$ células Jurkat previamente tratadas con 50 µg/ml de mitomicina C (Sigma) durante 60 minutos a 37°C. Cada 3 días, el medio de cultivo se renueva añadiendo al medio fresco 0,5 µl de interleucinas IL-2 e IL-7. Semanalmente los cultivos son reestimulados utilizando como células presentadoras de antígenos células Jurkat tratadas con 50 µg/ml de mitomicina C y pulsadas con 50 µg/ml de péptido durante dos horas. El análisis fenotípico de la población celular se lleva a cabo tras dos ciclos de reestimulación *in vitro*. Para ello se determina la expresión en las células en cultivo de las moléculas superficiales CD4 y CD8, según el método descrito (apartado 3.26).

Las células Jurkat fueron transfectadas mediante electroporación 48 horas antes de realizar estas estimulaciones. Se utilizó un electroporador BTX, con cubetas de 4 mm que contenían un total de 20×10^6 células y 20 µg de plásmido pCMV4-KMP11 o pCMV4-Q4Li según el ensayo. Las condiciones de

electroporación empleadas fueron: 300 v, 186 ohms, 975 μF y una relación resistencia/capacitancia de 500 v. Estas células fueron sometidas a un gradiente de ficoll, con objeto de eliminar todas las células muertas del cultivo y tratadas con mitomicina al igual que las pulsadas con péptidos. La proporción de estas células siempre fue como mínimo un 10% con respecto a las efectoras.

3.28.2. Ensayo de liberación de ^{51}Cr

La cuantificación de la actividad citotóxica se determina el día 6 post última estimulación (dependiendo del caso se suelen hacer 2 ó 3 estimulaciones) mediante el ensayo clásico de liberación de ^{51}Cr (Schoenberger y col., 1998). Las células diana se marcan radiactivamente con 200 μCi de Na^{51}Cr (Amersham) durante 1 hora a 37°C . Antes de realizar el marcaje, es necesario retirar todas las células muertas del cultivo de células diana (transfectadas con los distintos plásmidos 48 horas antes). A continuación, se lavan dos veces y se reparten en placas de 96 pocillos y fondo redondo, junto a diferentes cantidades de esplenocitos efectoras, que han sido previamente estimulados *in vitro* durante 21 días y procedentes de los ratones inmunizados. Antes de hacer este ensayo se deben eliminar las células muertas de estos cultivos que se han ido estimulando. Normalmente se utiliza una cantidad fija de 2000 células diana en cada pocillo frente a distintas proporciones de células efectoras, en general las proporciones empleadas son 100:1, 50:1 y 25:1 (células efectoras:células diana) en un volumen final de 200 μl . El ensayo se realiza en placas de fondo en V con el fin de favorecer el contacto entre células y facilitar la recogida del sobrenadante. Las determinaciones se realizan por triplicado y tras 5 horas de incubación a 37°C en atmósfera de CO_2 , medimos la radiactividad liberada en los sobrenadantes usando un contador de centelleo líquido Microbeta 1450 (Wallac). La lisis específica se calcula usando la siguiente fórmula: $\% \text{ lisis específica} = [\text{cpm (liberación experimental)} - \text{cpm (liberación espontánea)}] / [\text{cpm (liberación total)} - \text{cpm (liberación espontánea)}] \times 100$. La liberación espontánea representa el número de cuentas obtenidas cuando las células diana son incubadas en medio de cultivo sin células efectoras y la liberación total representa el número de cuentas obtenidas después de tratar las células diana con $\text{ClH } 1\text{M}$. Experimentos donde la lisis espontánea es mayor del 20% respecto a la lisis total se eliminan.

3.29. Obtención de formas promastigotes metacíclicos de *Leishmania major*

Todos los estudios descritos en este trabajo han sido realizados en la cepa VI CMHOM/IL/80/Friedlin.

La obtención *in vivo* de promastigotes de *L.major* altamente infectivos, se realiza a partir de ratones BALB/c infectados previamente. La infección se realiza inoculando en la planta de la pata, 1×10^4 metacíclicos/pata procedentes de cultivo y resuspendidos en PBS. Pasado tiempo de la infección, se extraen los ganglios poplíteos. Se homogeneizan con medio Schneider enriquecido con 10% de SBF1 y con 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin. Se hacen diluciones seriadas 3:1 y se deja 7 días a 26°C. Pasado este tiempo los parásitos han salido de las células de modo que podemos recogerlos, lavarlos con PBS para eliminar las células y congelarlos en N₂ líquido a una concentración de 6×10^7 parásitos/ml.

Se parte de un cultivo de promastigotes procíclicos y pasados 5 o 6 días están en fase estacionaria. Estos parásitos en fase estacionaria se lavan con medio RPMI y se centrifugan a 660 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspende en medio RPMI conteniendo PNA (peanut aglutinin). Los parásitos se incuban 15 minutos permitiendo que las formas no metacíclicas se aglutinen con la lectina donde son formas metacíclicas altamente infectivas. Para infectar los ratones necesitamos que estén en fase infectiva que es la forma metacíclica. Los parásitos se lavan con RPMI y posteriormente se resuspenden con RPMI con 10% de SBF1 y 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y añadimos 100 µg de PNA (por cada 10^8 parásitos) que se pega a las lectinas de la membrana de promastigotes, de modo que se aglutinan con esta y se van al fondo. Se incuba 15 minutos a T^a ambiente y luego se centrifuga a 500 rpm durante 5 minutos. De este modo los promastigotes se quedan al fondo y las formas metacíclicas en el sobrenadante, que es lo que nos quedamos. Para inocularlas en los ratones deben estar en solución salina estéril.

3.30. Obtención de formas infectivas de *Leishmania infantum*

Partimos de formas promastigotes infectivos de la cepa JPC (MCAN/ES/98/LLM-724) de *L.infantum* procedentes de tejido de bazo de perros infectados, suministrados por la Dra. C. Cañabate del Instituto de

Salud Carlos III crecidos en medio RPMI con 10% de SBF y NNN. Tras 3 pases los parásitos son crecidos hasta alcanzar la fase estacionaria en medio RPMI.

3.31. Infección de ratones con *Leishmania sp*

Grupos homogéneos en edad y sexo de ratones BALB/c, C57BL/6 y C57BL6-A2/K^b se infectan con diferentes dosis de metacíclicos por distintas vías dependiendo de la especie con que se infecta.

En el caso de *L. major* se infectan en las orejas. En las orejas se inoculan 500 parásitos por oreja, entre las dos capas dérmicas de la oreja. El volumen en que se inoculan es 15µl por oreja.

En el caso de *L. infantum* se infecta por vía intravenosa en la cola, con 10⁴ o 10⁵ parásitos en un volumen de 30 µl.

3.32. Obtención de células de distintos órganos de ratones infectados con *Leishmania sp*

3.32.1. Obtención de células de bazo, hígado y ganglios linfáticos de ratones infectados con *Leishmania sp*

Se obtienen el bazo, hígado, ganglios cervicales, axilares, mesentéricos, poplíteos y mesentéricos. Todos ellos se homogeneizan con 1ml de medio Schneider y a partir de este ml se hacen diluciones seriadas 1:3 hasta 12 o 24 diluciones en placas de 96 pocillos. Se incuban a 26 °C durante 7 días y pasado este tiempo ya se puede ver la carga parasitaria.

3.32.2. Obtención de células derivadas de médula ósea procedente de ratones infectados con *Leishmania infantum*

Se extrae el fémur y la tibia del ratón, se cortan las epífisis y se perfunden con 1ml de medio Schneider con 10% de suero (SBFI) y con penicilina y estreptomycinina. Se hacen diluciones seriadas y se incuban 7 días a 26°C. Pasado este tiempo, los parásitos han salido del interior de las células y podemos observarlos en las distintas diluciones.

3.32.3. Obtención de células dérmicas de las orejas procedentes de ratones infectados con *Leishmania major*

Se obtienen las dos orejas del ratón y se esterilizan con Etanol 70% durante 5 minutos. Pasado este tiempo se retira el Etanol y se dejan secar para esterilizar. Se despegan ambas caras de la oreja sujetando por la parte ventral y tirando de la dorsal. Se ponen en 1ml de DMEM sin suero con 20 µg de liberasa Cl. Se incuba 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo se homogeneizan con el émbolo de una jeringa y se pasan por un filtro. Después se centrifuga 20 minutos a 2500rpm. El pellet se lava con DMEM y DNAsa 0,05%. Se centrifuga otros 20 minutos a 2500rpm y se resuspende en 1ml de medio Schneider. A partir de aquí hacemos diluciones seriadas 1:3 y se incuba a 26°C durante 7 días. Pasado este tiempo podemos ver los parásitos que ya han salido de las células dérmicas.

3.33. Extracción de proteínas totales de *L. major* y *L. infantum*

Se recogen los parásitos y se lavan 2 veces en PBS centrifugando a 3.500 rpm durante 30 min. El pellet se resuspende en solución de lisis (Tris-ClH 50 mM pH 7, SDS 1%, PMSF 2 mM, NP40 1%, EDTA 5 mM y β-ME 1%) manteniendo una relación de 400 millones de parásitos/ml solución de lisis. A continuación se somete la muestra a 5 ciclos de sonicación de 8 segundos (siempre en hielo). El extracto se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante.

4. RESULTADOS

4.1. Capacidad adyuvante de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi* usada como proteína de fusión

4.1.1 Activación de respuesta humoral inducida frente al antígeno KMP11 de *T. cruzi*. Análisis del tipo de inmunoglobulinas inducidas y de la dependencia de haplotipo y edad del ratón

Con el objetivo de evaluar el efecto inmunomodulador de la proteína HSP70 y su capacidad de inducir una respuesta humoral específica frente a moléculas a las que se asocia como proteína de fusión, llevamos a cabo varias construcciones de vectores recombinantes que la portan asociada a diferentes moléculas no inmunogénicas. Así, el extremo 5' del gen codificante de la proteína HSP70, o aquel codificante de un fragmento de 29kDa de la mencionada HSP70, denominado hsp70T (h70T) (Planelles, Thomas et al. 2001) es clonado en el vector pQE asociado al gen codificante para antígeno KMP11 de *Trypanosoma cruzi*.

La inmunización con las distintas proteínas recombinantes a estudio así como los controles se realiza usando ratones BALB/c (haplotipo H2-K^d) y C57BL/6 (haplotipo A2-K^b) con el fin de determinar si la respuesta inmunológica que se genera es dependiente de haplotipo. Las inoculaciones se hacen vía subcutánea. Con el fin de inmunizar con el mismo número de moléculas de KMP11, la dosis de inoculación por ratón es de 20 µg para la proteína KMP11-HSP70 y 10 µg para la proteína KMP11-h70T. La proteína KMP11 (control) se utiliza a 8 µg. Se utilizan ratones de 7 y 11 semanas de edad al objeto de determinar las posibles diferencias, en la respuesta de anticuerpos generada, debidas a la edad del animal inmunizado. Se llevan a cabo 2 inmunizaciones separadas 3 semanas. La obtención de suero sanguíneo se realiza pasadas 2 semanas de cada inmunización, determinando en los mismos el nivel de anticuerpos IgG generado frente al antígeno problema (KMP11), así como el balance de los subtipos IgG1 e IgG2a, a fin de determinar el grado de respuesta humoral generada y tipo de la misma. Estas determinaciones se realizan mediante la técnica de ELISA, enfrentando los sueros a la proteína recombinante KMP11 de *T. cruzi*. Cada uno de los ensayos de inmunización y determinación del nivel de anticuerpos generado se lleva a

cabo por triplicado, usando grupos de 6 ratones por experimento y molécula a evaluar y realizando el ensayo por duplicado.

4.1.1.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes KMP11, KMP11-HSP70 y KMP11-h70T

La proteína de fusión KMP11-HSP70 y la proteína KMP11 se obtienen, respectivamente, a partir de los vectores pQE₃₂-KMP11-HSP70 y pQE₃₀-KMP11 disponible en el laboratorio (Maranon, Thomas et al. 2001; Thomas, Longobardo et al. 2001). Para obtener la proteína de fusión KMP11-h70T (figura 1) partimos del vector recombinante pQE₃₂-KMP11-HSP70, el cual es digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sph*I que liberan al fragmento génico correspondiente a la proteína HSP70 y permite el aislamiento del vector recombinante abierto, conteniendo el fragmento génico de KMP11. Por otra parte, llevamos a cabo una PCR a partir del fragmento génico completo de la HSP70, usando oligos que flanquean la región que se corresponde con el fragmento de 242 nt y que va desde el nucleótico 192 al 433 y que contiene los lugares de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sph*I. Así, el producto amplificado se digiere con las mencionadas enzimas *Bam*HI y *Sph*I obteniendo el fragmento génico que codifica para el polipéptido h70T flanqueado por las mismas, procediendo a su clonaje en el vector pQE₃₂-KMP11 abierto.

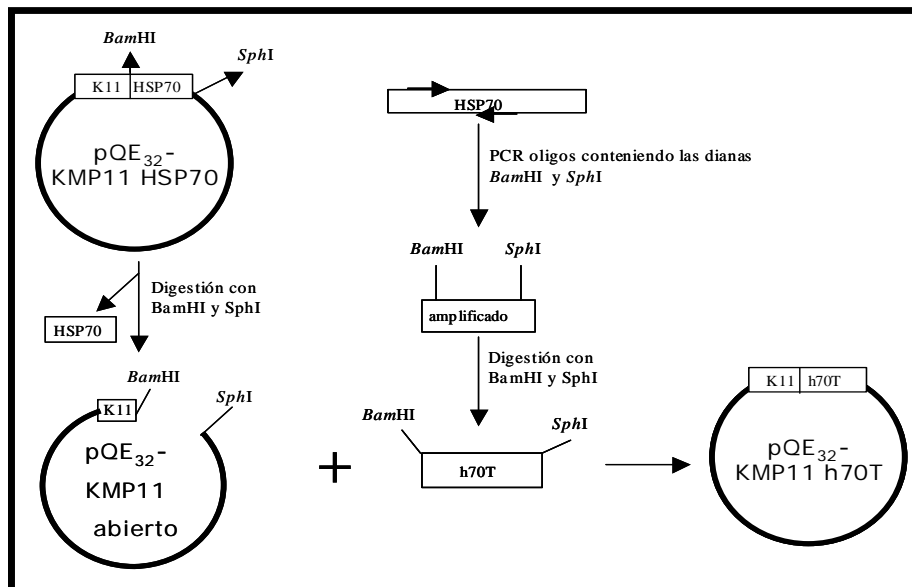


Figura 1. Clonaje del vector recombinante pQE₃₂-KMP11-h70T. Para la obtención del mencionado vector recombinante partimos del vector pQE₃₂-KMP11-HSP70 que contienen los genes codificantes de KMP11 y HSP70 de *T. cruzi* fusionados y en fase.

Una vez obtenidos los vectores recombinantes portadores de los genes de fusión a ensayo, llevamos a cabo la transformación de bacterias *E. coli*, cepa XL1-blue, con dichos vectores e inducción y solubilización de las proteínas recombinantes por ellos codificadas. La purificación de las mismas se realiza mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺, posibilitada por la cola de 6 histidinas que poseen las tres construcciones y que quedan en fase con las proteínas de fusión codificadas por los genes clonados. Los datos acerca de la expresión, solubilización y purificación de las distintas proteínas recombinantes se especifican en la sección de material y métodos. Las fracciones purificadas son analizadas mediante SDS-PAGE.

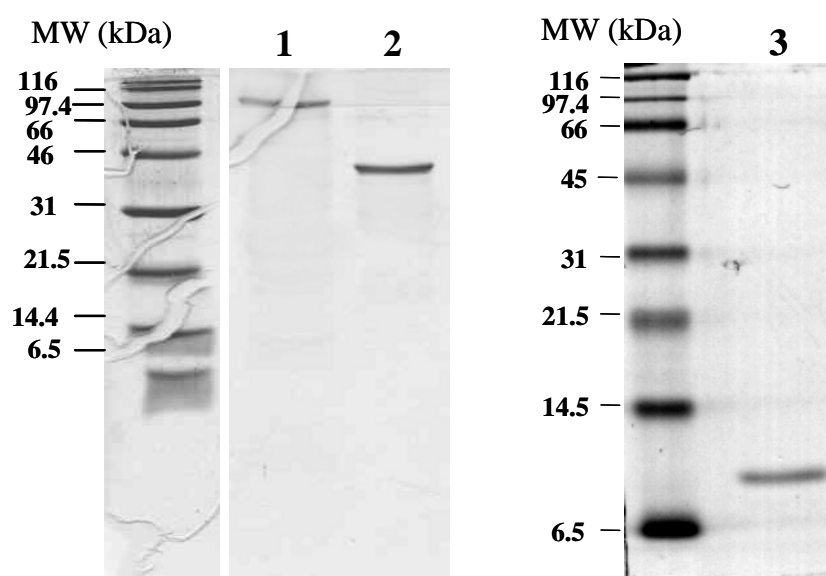


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas KMP11-HSP70, KMP11-h70T y KMP11, purificadas mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺. 1: KMP11-HSP70; 2: KMP11-h70T. 3: KMP11.

Como se muestra en la figura 2, una única banda teñida con azul Coomassie es observada en los carriles 1, 2 y 3 correspondientes a las proteínas de fusión KMP11-HSP70, KMP11-h70T y KMP11, respectivamente. Las citadas bandas se corresponden con proteínas de un tamaño aproximado a 81, 40 y 11 kDa, respectivamente, los cuales coinciden con el tamaño teóricamente esperado para las mencionadas proteínas de fusión.

4.1.1.2. Determinación del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones BALB/c de 7 semanas

Los resultados obtenidos muestran que, dos semanas tras la primera inmunización, el 86% de los ratones inmunizados con la molécula de fusión KMP11-HSP70 presentan valores de anticuerpos frente a KMP11 con valores medios de densidad óptica (D.O.) de 0,3 a una dilución 1/100 de los sueros (Figura 3A) Los ratones del grupo inmunizado con KMP11-h70T responden el 42,8% con un valor medio de D.O. de 0,19 a una dilución 1/100 de los sueros. En ningún caso los ratones inmunizados con la proteína KMP11 aislada generan anticuerpos frente a dicha molécula. El análisis de subtipos IgG1 e IgG2a, únicamente determinados en aquellos ratones con respuesta IgG, muestra que la respuesta está desbalanceada hacia el isotipo IgG1 en ambos grupos de ratones. Así, en el grupo de ratones inmunizado con KMP11-HSP70, la respuesta IgG1 tiene un valor medio de densidad óptica a 492 nm (D.O.) de 0,44 y en aquellos inmunizados con KMP11-h70T el valor medio de D.O. es de 0,5. Para IgG2a, los ratones inmunizados con KMP11-HSP70 presentan valores de D.O. de 0,29 y en aquellos inmunizados con KMP11-h70T no hay respuesta IgG2a (Figura 3A).

En los sueros obtenidos dos semanas tras la segunda inmunización, la determinación del nivel de anticuerpos se realiza a dilución 1/200 (Figura 3B) Los resultados muestran una elevada respuesta IgG anti-KMP11 en los dos grupos inmunizados con las proteínas de fusión, no observándose respuesta de anticuerpos en aquellos inmunizados con la proteína KMP11 aislada. Los ratones inmunizados con KMP11-HSP70, responden con un valor medio de D.O. de 2,9 respondiendo el 100% de los ratones inmunizados. Los ratones inmunizados con KMP11-h70T presentan igualmente altos niveles de anticuerpos frente a KMP11, con valores de IgG similares a los anteriormente mencionados para los ratones inmunizados con la proteína de fusión que contiene la molécula HSP70 completa. Sin embargo, en este grupo de ratones existe un 10% de no respondedores. Respecto al subtipo de IgG generado, se observa un equilibrio entre ambos subtipos, ligeramente desbalanceada hacia el subtipo IgG2a. Así, el grupo de ratones inmunizados con KMP11-HSP70 tiene un valor medio de D.O. de 2,2 para IgG1 y de 2,83 para IgG2a. El grupo inmunizado con KMP11-h70T tiene valor de D.O. de 1,12 para IgG1, siendo para IgG2a de 1,48 (Figura 3B).

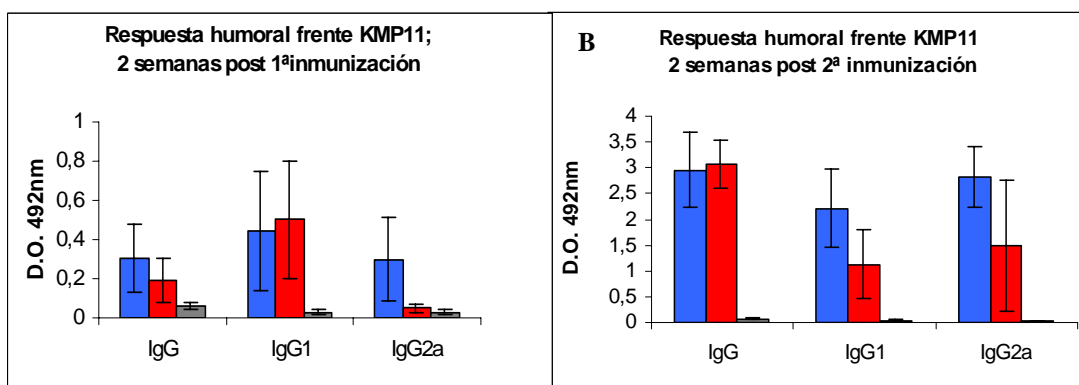


Figura 3. Nivel de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, anti-KMP11 en sueros de ratones inmunizados con las proteínas KMP11-HSP70, KMP11-h70T y KMP11. Ratones BALB/c de 7 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura A representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la 1ª inmunización. La figura B representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la segunda inmunización. El color azul representa el grupo inmunizado con KMP11-HSP70, el color rojo representa al grupo inmunizado con KMP11-h70T y el gris representa al grupo inmunizado con KMP11. El grupo inoculado con Solución salina no resultó tener respuesta en ningún caso. Los valores expresados se corresponden con las medias obtenidas en el porcentaje de ratones que responden en cada caso.

4.1.1.3. Determinación del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones BALB/c de 11 semanas

Los resultados obtenidos en el estudio, mediante ELISA, del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones BALB/c de 11 semanas inmunizados con las moléculas a estudio, son mostrados en la figura 4. El análisis de los mismos indica la presencia de anticuerpos IgG anti-KMP11, dos semanas tras la primera inmunización (figura 4A) en el 100% y 60% de los ratones de los grupos inmunizados con las moléculas de fusión KMP11-HSP70 y KMP11-h70T, respectivamente. Sin embargo, ningún ratón del grupo inmunizado con KMP11 aislada presenta anticuerpos anti-KMP11. Los ratones del grupo inmunizado con KMP11-HSP70 tienen un valor medio de D.O. de 0,39 y el grupo inmunizado con KMP11-h70T de 0,80 a dilución 1/100 en ambos casos. Respecto al subtipo de IgG, la respuesta en ambos casos está claramente inclinada hacia el subtipo IgG1, con valores de D.O. de 0,31 y 0,70 para los ratones inmunizados con KMP11-HSP70 y KMP11-h70T, respectivamente.

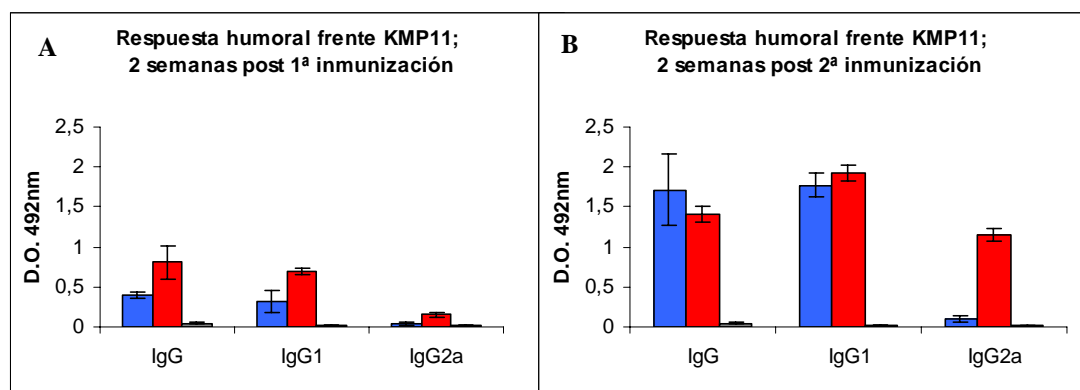


Figura 4. Nivel de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, anti-KMP11 en sueros de ratones inmunizados con las proteínas KMP11-HSP70, KMP11-h70T y KMP11. Ratones BALB/c de 11 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura A representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la 1^a inmunización. La figura B representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la segunda inmunización. El color azul representa el grupo inmunizado con KMP11-HSP70, el color rojo representa al grupo inmunizado con KMP11-h70T y el gris representa al grupo inmunizado con KMP11. El grupo inoculado con Solución salina no resultó tener respuesta en ningún caso. Los valores expresados se corresponden con las medias obtenidas en el porcentaje de ratones que responden en cada caso.

Dos semanas tras la segunda inmunización, la respuesta humoral generada frente a la molécula KMP11 se incrementa significativamente en los ratones inmunizados con las mencionadas moléculas de fusión, siendo nuevamente indetectables anticuerpos en aquellos ratones inmunizados con la proteína KMP11 aislada. La respuesta IgG anti-KMP11, determinada por ELISA en los sueros a dilución 1/200, es muy similar en ambos grupos con valores de D.O. de 1,71 en los ratones del grupo inmunizado con KMP11-HSP70, con el 100% de ratones respondiendo y D.O. de 1,4 en el grupo inmunizado con KMP11-h70T, en el cual encontramos un 20% de ratones que no responden (Figura 4B).

El balance de anticuerpos de subtipo IgG1 e IgG2a es mixto, aunque algo inclinado hacia el subtipo IgG1. En los dos grupos de ratones se observan niveles similares de anticuerpos, siendo 1,7 y 1,9 los valores de D.O. media obtenidos, respectivamente, para cada grupo. Respecto a IgG2a, los valores obtenidos de D.O. son de 0,1 en el caso de ratones inmunizados con KMP11-HSP70 y de 1,16 en los inmunizados con KMP11-h70T. Los ratones salinos no responden en ningún caso (Figura 4B).

4.1.1.4. Determinación de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones C57BL/6 de 7 semanas

Los resultados obtenidos, mediante ELISA, en sueros diluidos 1/50 evidencian que dos semanas tras la primera inmunización hay respuesta IgG anti-KMP11 en los grupos inmunizados con las proteínas de fusión a estudio, aunque en el grupo inmunizado con KMP11-h70T sólo responde el 40% de los ratones (5 de 12) mostrando un valor medio de D.O. de 0,25. En el grupo inmunizado con KMP11-HSP70 responden el 75% de los ratones (9 de 12) y con un valor medio de D.O. de 0,25. De los sueros positivos para IgG analizamos los subtipos IgG1 e IgG2a. Para IgG1, los valores medios de D.O. son de 0,17 y 0,16, para los ratones inmunizados con KMP11-HSP70 y KMP11-h70T, respectivamente. La respuesta IgG2a es menor, sobre todo en el grupo inmunizado con KMP11-h70T. En el grupo KMP11-HSP70, la respuesta adquiere un valor de D.O. de 0,11. Los ratones del grupo inmunizado con KMP11 no tienen respuesta de anticuerpos frente a dicha molécula (Figura 5A)

Dos semanas tras la segunda inmunización, el nivel de anticuerpos anti-KMP11 generado en los ratones inmunizados con las moléculas de fusión se incrementa considerablemente, siendo de valor similar en ambos grupos. Así, para ambos grupos de ratones se obtienen valores medios de D.O. de aproximadamente 1,6 a dilución 1/200 del suero, pero con la diferencia de que en el grupo de ratones inmunizados con KMP11-HSP70, responden el 83 % de los mismos (10 de 12) y en el grupo inmunizado con KMP11-h70T responden el 33% de los ratones (4 de 12). De los ratones con respuesta IgG anti-KMP11, analizamos el subtipo de la misma (IgG1 e IgG2a) observando que la respuesta IgG1 en el grupo de ratones inmunizados con KMP11-HSP70 tiene valor medio de D.O. de 2,38 mientras que en el grupo inmunizado con KMP11-h70T, el valor es 1,1. En el caso de IgG2a la respuesta es mayor en el grupo inmunizado con KMP11-h70T, con un valor de 3,1. El grupo inmunizado con KMP11-HSP70 tiene respuesta con valor medio de 1,69 (Figura 5B). El grupo inmunizado con KMP11 aislada no tiene respuesta de anticuerpos.

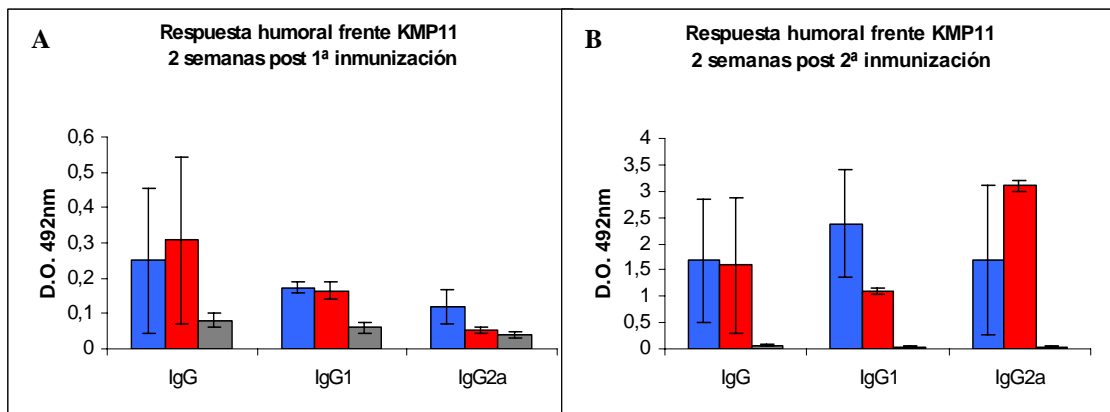


Figura 5. Nivel de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, anti-KMP11 en sueros de ratones inmunizados con las proteínas KMP11-HSP70, KMP11-h70T y KMP11. Ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura A representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la 1ª inmunización. La figura B representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la segunda inmunización. El color azul representa el grupo inmunizado con KMP11-HSP70, el color rojo representa al grupo inmunizado con KMP11-h70T y el gris representa al grupo inmunizado con KMP11. El grupo inoculado con Solución salina no resultó tener respuesta en ningún caso. Los valores expresados se corresponden con las medias obtenidas en el porcentaje de ratones que responden en cada caso.

4.1.1.5. Determinación del nivel de anticuerpos generados frente a la proteína KMP11 en ratones C57BL/6 de 11 semanas

Los resultados obtenidos muestran que dos semanas tras la primera inmunización el grupo inmunizado con KMP11-HSP70 tiene una respuesta IgG frente KMP11 con un valor medio de D.O. de 0,15 y una respuesta del 50% de los ratones. El análisis del subtipo de IgG muestra que únicamente hay respuesta IgG2a con un valor medio de D.O. de 0,25. Los ratones del grupo inmunizado con KMP11-h70T solo responden un 33% con valor medio de IgG de 0,13 siendo estos de subtipo IgG2a (Figura 6A).

Dos semanas tras la segunda inmunización la respuesta humoral generada frente a la molécula KMP11 se incrementa significativamente en los dos grupos de ratones inmunizados con las proteínas de fusión KMP11-HSP70 y KMP11-h70T, respondiendo el 100% de los ratones. Sin embargo, el nivel de anticuerpos es considerablemente superior en los ratones inmunizados con la molécula KMP11-HSP70 mostrando valores de D.O. de 2,65 frente al antígeno KMP11 a dilución 1/200 de los sueros. En el grupo inmunizado con KMP11-h70T el valor de D.O. obtenido es de 0,43. Respecto al subtipo de los anticuerpos generados es, en ambos casos, mayoritariamente IgG2a. Así, para

IgG1 los ratones inmunizados con KMP11-HSP70 responden con un valor de D.O. de 0,86 y los inmunizados con KMP11-h70T, responden con un valor medio de 0,23. En cuanto a IgG2a, la respuesta adquiere valores de 2,6 de D.O. en los ratones inmunizados con KMP11-HSP70 y de 1 en los inmunizados con KMP11-h70T (Figura 6B). Los ratones del grupo inmunizado con la proteína recombinante KMP11 aislada no presentan respuesta de anticuerpos frente a dicho antígeno.

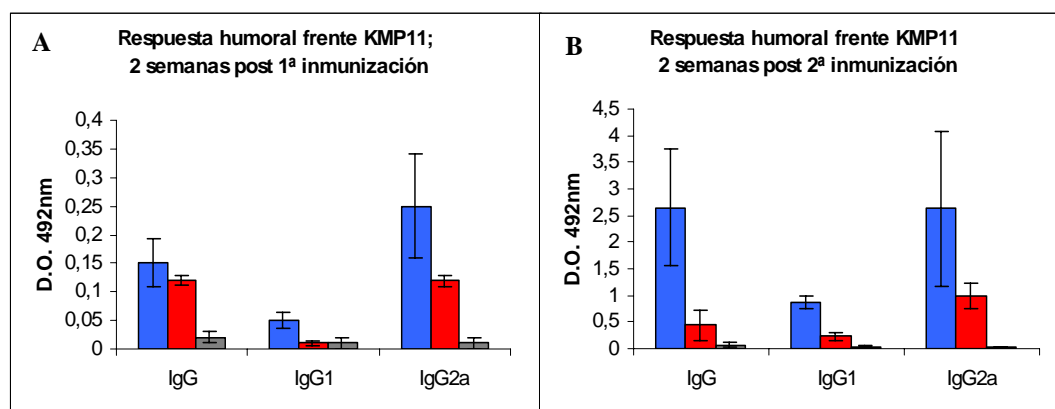


Figura 6. Nivel de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, anti-KMP11 en sueros de ratones inmunizados con las proteínas KMP11-HSP70, KMP11-h70T y KMP11. Ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura A representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la 1ª inmunización. La figura B representa los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a, 2 semanas tras la segunda inmunización. El color azul representa al grupo inmunizado con KMP11-HSP70, el color rojo representa al grupo inmunizado con KMP11-h70T y el gris representa al grupo inmunizado con KMP11. El grupo inoculado con Solución salina no resultó tener respuesta en ningún caso. Los valores expresados se corresponden con las medias obtenidas en el porcentaje de ratones que responden en cada caso y con aquellos obtenidos en 2 experimentos independientes.

4.1.2. Análisis de la respuesta humoral inducida frente al antígeno KMP11 de *T. cruzi* usado como inmunógeno asociado a otras moléculas no relacionadas con la HSP70

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del efecto inmunomodulador inducido por la proteína HSP70, proyectamos estudiar si la respuesta de anticuerpos anti-KMP11 generados por las moléculas de fusión KMP11-HSP70 y KMP11-h70T era causada por la presencia de la HSP70 o h70T en las mencionadas moléculas, o por el incremento en el tamaño que adquiere el antígeno KMP11 al fusionarse a dichas proteínas. Así, comparamos la capacidad inmunogénica inducida por la proteína KMP11-h70T con aquella que induciría la KMP11 asociada como proteína de fusión a la molécula C-LYT

(Moron, Cebolla et al. 2008) de 24 kDa, tamaño similar al fragmento truncado de HSP70 (h70T).

Para ello, distintos grupos de 8 ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad se inmunizaron con 8µg de las proteínas recombinantes KMP11, KMP11-h70T y C-LYT-KMP11 respectivamente, en un volumen de 100µl. Se llevan a cabo 2 inmunizaciones separadas 3 semanas usando la vía de inoculación subcutánea. La obtención de sueros para el análisis del nivel de anticuerpos, determinado mediante ELISA, se realiza 2,5 semanas tras la primera inmunización y 1,5 y 4 semanas tras la segunda inmunización, lo que nos permite así mismo evaluar la cinética de aparición de los anticuerpos antígeno específicos generados.

4.1.2.1. Clonaje, expresión y purificación de la proteína C-LYT-KMP11

Para la obtención de la proteína de fusión C-LYT-KMP11 se procede al subclonaje del gen codificante de la proteína KMP11 sobre el vector pALEX b (Biomedal) que contiene el polipéptido C-LYT en fase con él, obteniendo el vector pALEX- C-LYT-KMP11. Para ello, el vector pCMV4-KMP11 es digerido con *Bam*HI y *Asp*718 extrayendo el fragmento codificante del antígeno KMP11. Seguidamente el vector pALEXb se digiere con *Bam*HI y *Asp*718 dejando el mismo abierto a la altura del extremo 5' del tag C-LYT y se procede a la ligación de ambos fragmentos (figura 7).

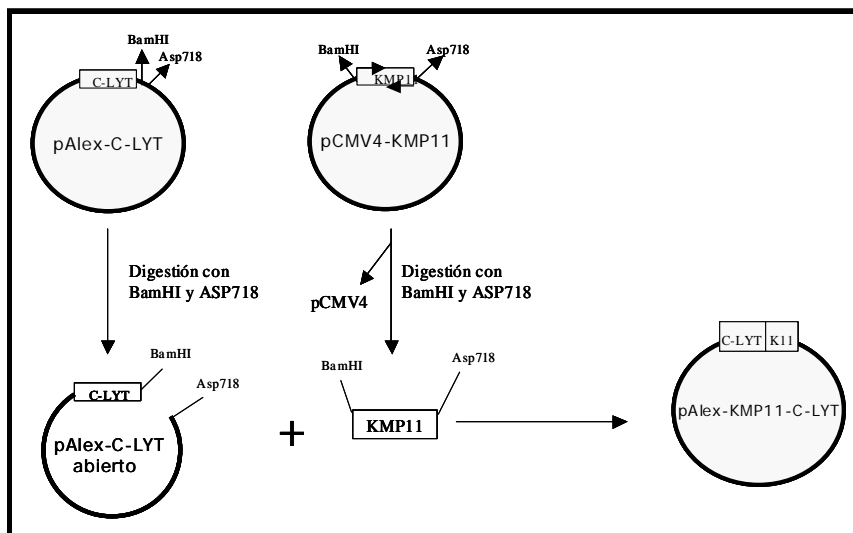


Figura 7. Clonaje del vector recombinante pALEX- C-LYT-KMP11. Para la obtención del mencionado vector recombinante partimos de los vectores pALEX-C-LYT y pCMV4-KMP11.

Una vez obtenido el correspondiente vector recombinante, se procede a la transformación en *E. coli*, cepa REG1, e inducción y solubilización de dicha proteína recombinante a partir de las células transformadas. La purificación de la misma se realiza mediante cromatografía por afinidad a la resina C-LYTAG. Los datos acerca de la expresión, solubilización y purificación de dicha proteína recombinante se especifican en la sección de material y métodos y las fracciones purificadas son analizadas mediante SDS-PAGE.

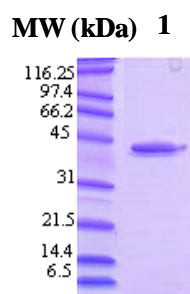


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la proteína C-LYT-KMP11, purificada mediante cromatografía de afinidad a C-LYTAG. MW: marcador de peso molecular (kDa) 1: proteína C-LYT-KMP11

Como se muestra en la figura 8, una única banda teñida con azul Coomassie es observada en el carril 1 correspondiente a la proteína de fusión C-LYT-KMP11. La citada banda se corresponde con proteína de un tamaño aproximado a 35 kDa, el cual coincide con el tamaño teóricamente esperado para la mencionada proteína de fusión.

4.1.2.2. Determinación del nivel de anticuerpos generado en ratones C57BL/6 frente a las moléculas KMP11, C-LYT y HSP70

El análisis del nivel de IgG existente frente a la molécula KMP11 en los distintos grupos de ratones a estudio (figura 9), muestra que los ratones inmunizados con KMP11 o con la molécula de fusión C-LYT-KMP11, no tienen respuesta alguna de anticuerpos. Sin embargo, a las 2 semanas y media post-primera inmunización, el grupo de ratones inmunizado con la molécula KMP11-h70T (vía subcutánea) muestra tal como era de esperar por los resultados previos, la presencia de anticuerpos anti-KMP11 en un 37% de los ratones, con un valor medio de D.O. de 0,33. 1 semana y media tras la segunda inmunización, observamos que el 100% de los ratones inmunizados con KMP11-h70T (vía subcutánea) presentan anticuerpos anti-KMP11, con

valor medio de D.O. de 0,38. 4 semanas tras la segunda inmunización, observamos un incremento en el nivel de anticuerpos anti-KMP11 en los ratones inmunizados con la molécula KMP11-h70T con valor de D.O. 0,68.

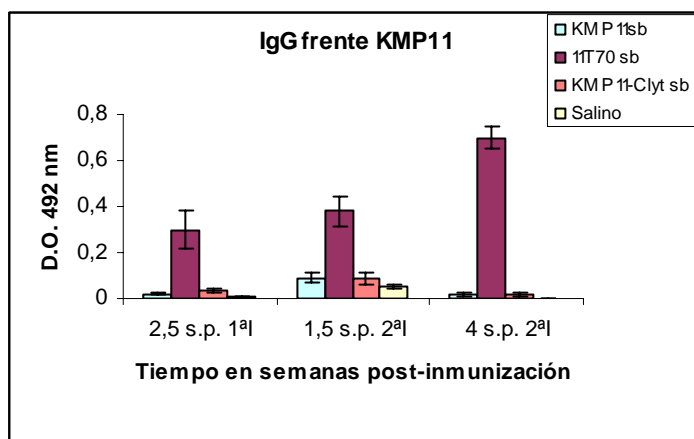


Figura 9. Nivel de anticuerpos IgG anti-KMP11 en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con las proteínas KMP11, KMP11-h70T y C-LYT-KMP11. Ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura representa los niveles de IgG 2 semanas y media tras la 1ª inmunización, 1 semana y media y 4 semanas tras la 2ª inmunización. Tras la 1ª inmunización, los sueros son analizados a dilución 1/50 y tras la 2ª inmunización, a dilución 1/100.

El análisis de respuesta IgG frente HSP70 en los ratones inmunizados con KMP11-h70T, mostrado en la figura 10, evidencia que 2 semanas y media tras la primera inmunización, el grupo de ratones inmunizado (vía subcutánea) con dicha molécula de fusión tiene una respuesta IgG anti-HSP70 en el 75% de los ratones con valor medio de D.O. de 0,17. Tras la segunda inmunización responden el 100% de los ratones inmunizados por vía subcutánea con un valor medio de D.O. de 0,27. Pasadas 4 semanas de la segunda inmunización, el nivel de anticuerpos anti-HSP70 se reduce significativamente mostrando anticuerpos el 75% de los ratones inmunizados con valor medio de D.O. de 0,11. Como era de esperar, el resto de grupos ensayados no presenta anticuerpos anti-HSP70 en ningún caso.

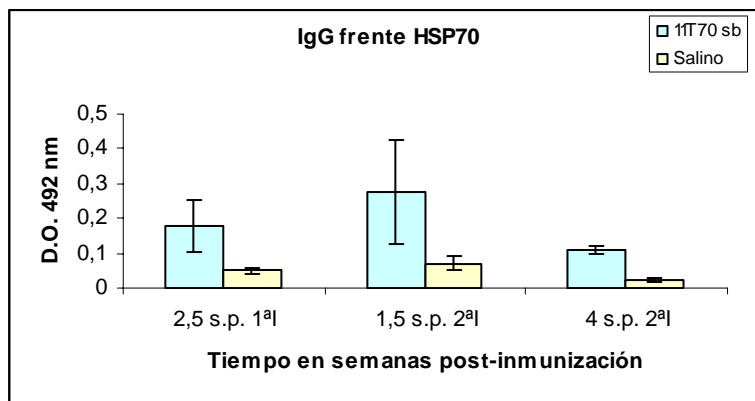


Figura 10. Nivel de anticuerpos IgG frente a la proteína HSP70 en ratones C57BL/6 inmunizados con la proteína KMP11-h70T. Ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura representa los niveles de IgG 2 semanas y media tras la 1ª inmunización, 1 semana y media y 4 semanas tras la 2ª inmunización. Tras la 1ª inmunización, los sueros son analizados a dilución 1/50 y tras la 2ª inmunización, a dilución 1/100.

La determinación de anticuerpos anti-C-LYT en los sueros procedentes de los ratones inmunizados con la proteína C-LYT-KMP11 (figura 11), refleja la existencia de anticuerpos IgG una semana y media post-segunda inmunización, en un 50% de los ratones inmunizados por vía subcutánea con un valor medio de D.O. de 0,13. Pasadas 4 semanas de la segunda inmunización, el nivel de anticuerpos anti-C-LYT desciende no detectando respuesta alguna frente a esta molécula.

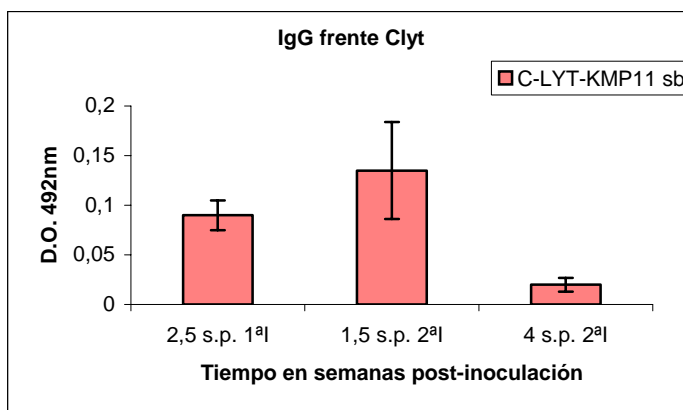


Figura 11. Nivel de anticuerpos IgG frente a la proteína C-LYT en ratones inmunizados con C-LYT-KMP11. Ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea. La figura representa los niveles de IgG 2 semanas y media tras la 1ª inmunización, 1 semana y media y 4 semanas tras la 2ª inmunización. Tras la 1ª inmunización, los sueros son analizados a dilución 1/50 y tras la 2ª inmunización, a dilución 1/100.

4.1.3. Activación de la respuesta humoral inducida frente al polipéptido Glía33 asociado como proteína de fusión a la proteína HSP70. Análisis de la especificidad de respuesta y vía de inoculación.

Una vez comprobado el papel adyuvante de la proteína HSP70 y fragmento h70T de la misma, fusionado al antígeno no inmunogénico KMP11, proyectamos determinar si esta capacidad carrier de la HSP70 no se restringe a determinados específicos antígenos. Con este fin llevamos a cabo varias construcciones, fusionando en el extremo 5' del gen codificante de HSP70 o del fragmento de ésta (h70T), al fragmento génico que codifica el polipéptido Glía33 (Glía33 es un polipéptido de 33 aminoácidos contenido en la gliadina, proteína que se encuentra presente en el gluten de diferentes cereales). Así, se obtuvieron los vectores recombinantes codificantes para las proteínas de fusión Glía33-HSP70 y Glía33-h70T. Además, al ser Glía33 una molécula relativamente pequeña respecto a la HSP70, realizamos el clonaje de dos copias en fase del fragmento que codifica para dicho polipéptido, fusionado al gen de la proteína HSP70, obteniendo el vector codificante para la proteína de fusión Glía33x2-HSP70. Como moléculas control utilizamos la proteína recombinante 2xGlía33, formada por dos moléculas del polipéptido Glía33 en fase y obtenida a partir del correspondiente vector construido a tal fin, así como el polipéptido Glía33 fusionado a la molécula C-LYT (molécula no relevante en cuanto a su capacidad carrier) proteína obtenida a partir del plasmido pALEX-Glía33 suministrado por Biomedal (Sevilla-España).

El clonaje del vector pQE₃₂-Glía33HSP70 se hace a partir de los vectores pALEX-Glía33 y pQE₃₂-HSP70 (figura 12A). Para ello se procede a la amplificación del fragmento génico Glía33 con dos oligos, que mapean en los extremos 5' y 3' del mismo y que contienen en sus extremos las secuencias correspondientes a las dianas de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Asp*718. El fragmento amplificado se digiere con las correspondientes enzimas. El vector pQE₃₂-HSP70 es digerido con *Bam*HI y *Asp*718, de modo que queda abierto a la altura del extremo 5' de HSP70 y podemos subclonar el fragmento codificante de Glía33.

El clonaje de pQE₃₂-Glía33h70T se lleva a cabo a partir de los vectores pALEX-Glía33 y pQE₃₂-h70T (figura 12B). Para ello se procede a la amplificación del fragmento génico Glía33 con dos oligos, que mapean en los extremos 5' y 3' del mismo y que contienen en sus extremos la secuencia

correspondiente a la diana de corte de la enzima de restricción *Bam*HI. El fragmento amplificado se digiere con *Bam*HI. Por otro lado, el vector pQE₃₂-h70T es digerido con *Bam*HI para abrirlo a la altura del extremo 5' de h70T. Una vez el mencionado vector que linearizado, se subclona el fragmento codificante de Glía33.

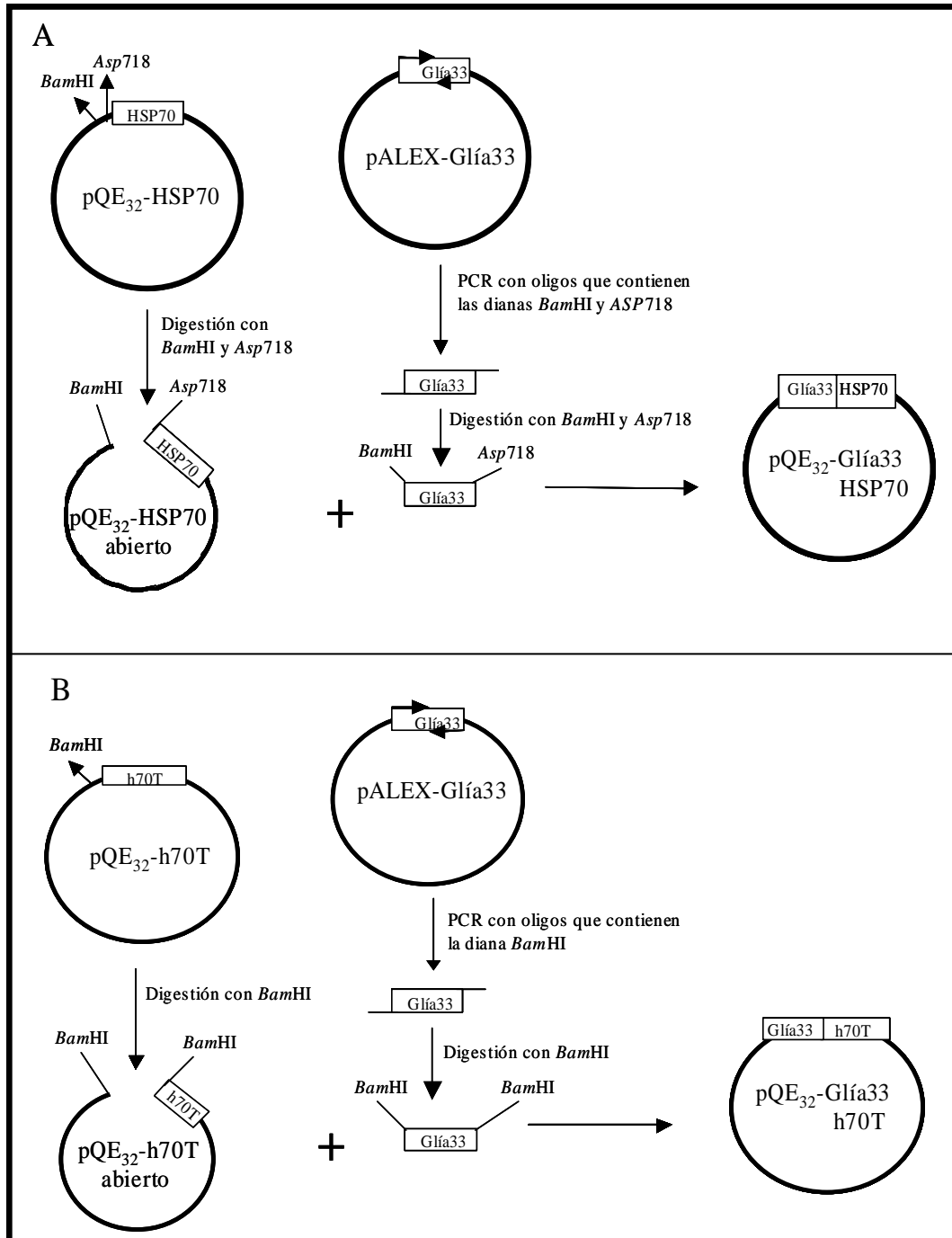


Figura 12. Clonaje de los vectores recombinantes pQE₃₂-Gli33HSP70 y pQE₃₂-Gli33h70T.

El clonaje de pQE₃₂-Gli33x2-HSP70, es realizado a partir de pALEX-

Glía33 y pQE₃₂-HSP70 (figura 13). Para ello se procede a la amplificación del fragmento génico Glía33 con dos oligos, que mapean en los extremos 5' y 3' del mismo y que contienen en sus extremos la secuencia correspondiente a la diana de corte de la enzima de restricción *Bam*HI. El fragmento amplificado se digiere con *Bam*HI. El vector pQE₃₂-HSP70 es digerido con *Bam*HI quedando abierto en el extremo 5' del gen que codifica para la HSP70, lugar donde se subclona, en fase con el extremo 5' de HSP70, el fragmento codificante para dos secuencias de Glía33.

Para el clonaje de pQE₃₂-Glía33x2 (figura 13), se digiere el vector pQE₃₂-Glía33x2-HSP70 con las enzimas *Bsi*WI y *Hind*III, de modo que se extrae el fragmento HSP70 y se religa nuevamente el vector recombinante resultante.

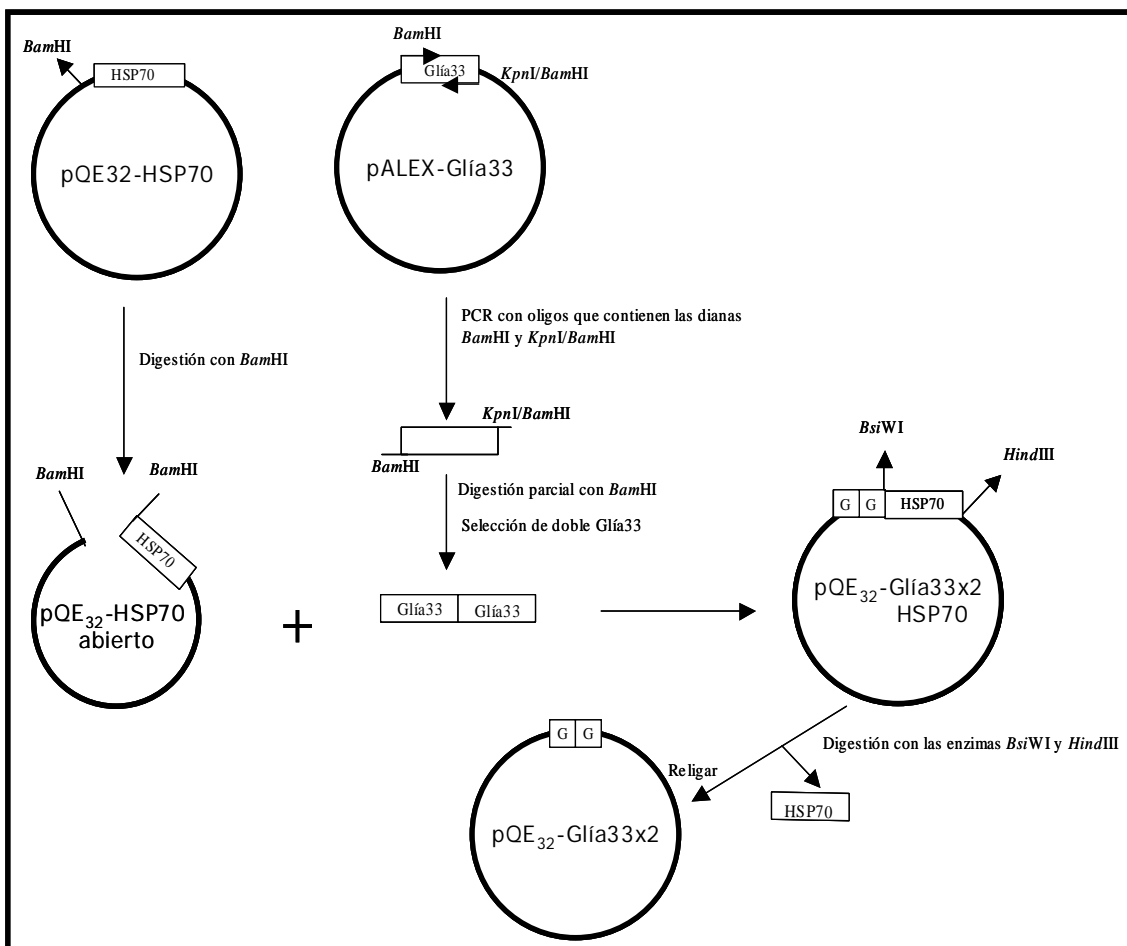


Figura 13. Clonaje de los vectores recombinantes pQE₃₂-Glía33x2-HSP70 y pQE₃₂-Glía33x2 partiendo de pQE₃₂-HSP70 y pALEX-Glía33.

4.1.3.1. Expresión y purificación de las correspondientes proteínas recombinantes

Una vez obtenidos los correspondientes vectores recombinantes portadores de los genes de fusión a ensayo, se realiza la transformación en bacterias *E. coli*, cepas XL1-blue y M15, en este caso, solo con el vector recombinante Glía33x2. Tras la inducción y solubilización de las distintas proteínas recombinantes codificadas por dichos vectores, se lleva a cabo la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad a Ni⁺⁺ y a C-LYTAG (proteínas C-LYTGlí33 y C-LYT). Los datos acerca de la expresión, solubilización y purificación de las distintas proteínas recombinantes se especifican en la sección de material y métodos de la presente Tesis, y las fracciones purificadas son analizadas mediante SDS-PAGE, quedando mostradas en figura 14.

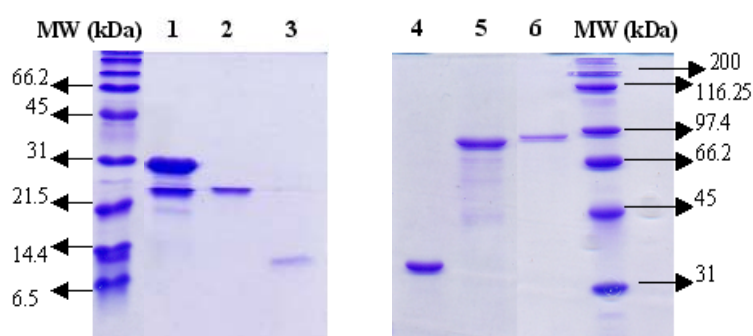


Figura 14. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de la purificación de las distintas proteínas recombinantes a ensayo. En la foto: **MW.** Marcador de peso molecular 1. C-LYT-Glí33 2. C-LYT 3. Glía33x2 4. Glía33-h70T 5. Glía33-HSP70 6. Glí33x2-HSP70.

Como se muestra en la figura 14, una única banda teñida con azul Coomassie es observada en los carriles 3, 4, 5 y 6 correspondientes a las proteínas de fusión Glía33x2, Glía33-h70T, Glía33-HSP70 y Glía33x2-HSP70 respectivamente. Las citadas bandas se corresponden con proteínas de un tamaño aproximado a 12; 32,6; 84,2 y 88 kDa, respectivamente. El carril 2 corresponde a la proteína C-LYT con tamaño de 24 kDa y el carril 1 corresponde a la proteína recombinante C-LYT-Glí33, presentando una doble banda, debida a la hidrólisis espontánea de la proteína C-LYT.

La inmunización con las diferentes proteínas de fusión se realiza en ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad. Se llevan a cabo dos inmunizaciones separadas 3 semanas entre sí, e inmunizamos con 8µg de proteína por ratón,

en un volumen de 100 µl, utilizando grupos de 4 ratones por proteína a estudio y grupo control salino.

4.1.3.2. Determinación del nivel de anticuerpos (IgM e IgG) generado frente a la molécula Glía33 en ratones inmunizados con las distintas proteínas recombinantes.

La respuesta de anticuerpos inducida frente a la molécula Glía33 la analizamos mediante la técnica de ELISA. El análisis de los resultados (figura 15) muestra que 2 semanas y media tras la primera inmunización sólo se produce respuesta IgM e IgG en los grupos de ratones inmunizados con las moléculas Glía33x2-HSP70 y Glía33-h70T, en ambos casos, únicamente en los ratones inoculados por vía intraperitoneal. La respuesta IgM se observa en el 100% de los ratones de ambos grupos. En el grupo de ratones inmunizado con Glía33x2-HSP70, el valor medio de respuesta es de D.O. de 0,17 y los ratones inmunizados con Glía33-h70T, presentan valor medio de D.O. de 0,57. En cuanto a la respuesta IgG, el grupo de ratones inmunizado con Glía33x2-HSP70 presenta un valor medio de D.O. de 0,43 y responden el 100% de los ratones, mientras que en el grupo inmunizado con Glía33-h70T, únicamente responden el 50% de los ratones con un valor medio de D.O. de 0,26. El estudio del subtipo de IgG inducido muestra que para los dos grupos de ratones la respuesta es esencialmente de subtipo IgG2a. El grupo de ratones inmunizado con Glía33x2-HSP70 tiene un valor medio de D.O. de 0,14 mientras que los ratones inmunizados con Glía33-h70T, muestran un valor de D.O. de 0,38 (con respuesta en un 50% de los ratones, tal como mencionamos anteriormente).

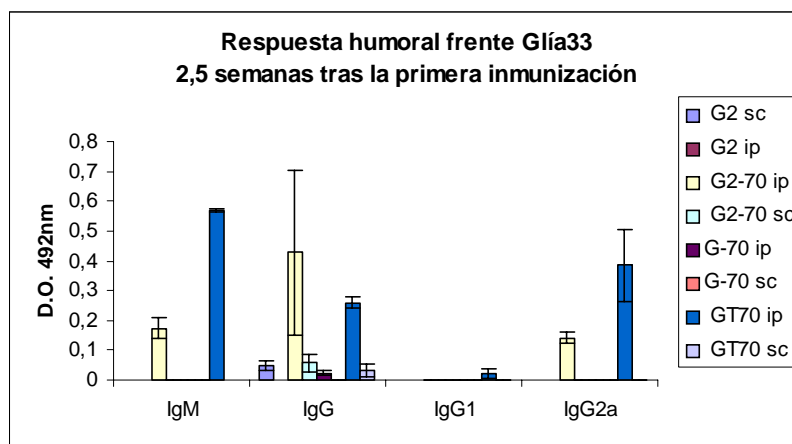


Figura 15. Respuesta humoral inducida frente a la proteína Glía33, en ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía intraperitoneal y subcutánea con las diferentes proteínas a estudio. Determinación de los niveles de IgM, IgG, IgG1 e IgG2a, 1 semana y media tras la primera inmunización. Sueros analizados a dilución 1/50.

Tres semanas tras la segunda inmunización, observamos la presencia de anticuerpos IgG anti-Glía33 en los grupos de ratones inmunizados con las moléculas Glía33x2-HSP70 y Glía33-h70T independientemente de la vía de inmunización, así como en el grupo de ratones inmunizados con la molécula Glía33-HSP70 por vía intraperitoneal. Como se muestra en la figura 16, los ratones inmunizados con la molécula Glía33x2 no presentan anticuerpos. En los grupos de ratones inmunizados con Glía33x2-HSP70, la respuesta de anticuerpos anti Glía33 se observa en el 100% de los ratones con un valor medio de D.O. de 3 en los ratones inmunizados por vía intraperitoneal y de 1,8 en aquellos inmunizados por vía subcutánea. Así mismo, en el grupo de ratones inmunizado con Glía33-HSP70, vía intraperitoneal, se detectan anticuerpos anti-Glía33 en el 100% de los ratones, con un valor medio de D.O. de 0,55. En el caso de los ratones inmunizados con la molécula Glía33-h70T se observa un valor similar de anticuerpos, independientemente de la vía utilizada con valor medio de D.O. de 1 e igualmente una respuesta en el 100% de los ratones. La determinación del subtipo de respuesta IgG anti-Glía33 inducida, muestra que los anticuerpos son principalmente de subtipo IgG2a en los ratones inmunizados por vía intraperitoneal independientemente de la proteína de fusión usada, conteniendo la molécula HSP70 o fragmento de la misma, aunque, tal como se observa para IgG, el nivel de anticuerpos inducido por cada una de las moléculas es diferente y en consonancia al observado para IgG. Sin embargo, la respuesta es mixta, IgG1 e IgG2a, en los ratones inmunizados por vía subcutánea.

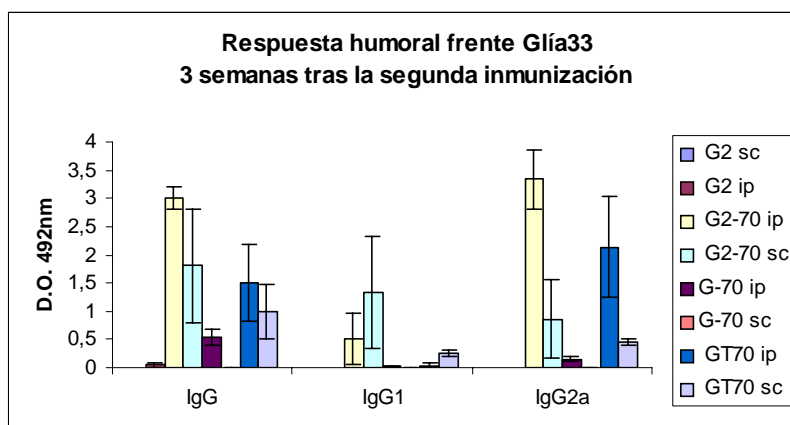


Figura 16. Respuesta humoral inducida frente a la proteína Glía33, en ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía intraperitoneal y subcutánea con las diferentes proteínas a estudio. Determinación, 3 semanas tras la segunda inmunización, del nivel de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a, a dilución 1/100 de los sueros.

Al objeto de evaluar la estabilidad de los anticuerpos generados y cinética de aparición, analizamos el nivel de IgG anti Glía33, 9 y 15 semanas post-segunda inmunización. Los resultados obtenidos 9 semanas tras la segunda inmunización, mostrados en figura 17A, muestran que existe un perfil de anticuerpos anti-Glía33 similar al observado 3 semanas post-segunda inmunización a excepción de la presencia de anticuerpos IgG en los ratones inmunizados con la molécula Glía33-HSP70 por vía subcutánea, no observado a las 3 semanas post-segunda inmunización. Los ratones inmunizados con Glía33x2, tanto por vía intraperitoneal como subcutánea, siguen sin tener respuesta de anticuerpos anti-Glía33.

A las 15 semanas post-segunda inmunización, observamos (Fig 17B) una leve caída del nivel de anticuerpos anti-Glía33 relativo al valor observado 9 semanas post-segunda inmunización en todos los grupos de ratones, independientemente del inmunógeno usado o vía de inoculación. Los valores de D.O. obtenidos oscilan entre valor de 1,7 en los ratones inmunizados con la molécula Glía33x2-HSP70 por vía intraperitoneal y 0,2 en aquellos inmunizados con la molécula Glía33-HSP70 por igual vía..

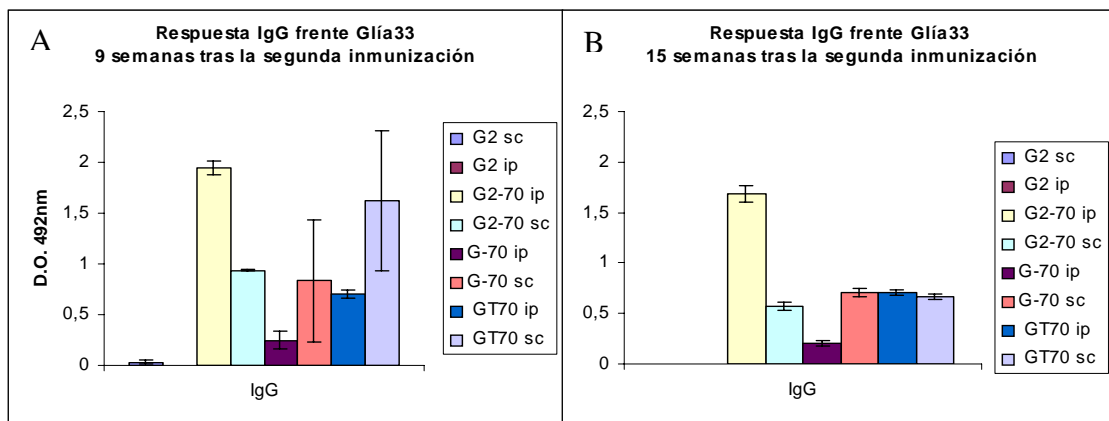


Figura 17. Nivel de anticuerpos IgG inducido frente a la proteína Glía33, en ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados con las diferentes proteínas a estudio. Determinación realizada 9 y 15 semanas tras la segunda inmunización, a dilución 1/200 los sueros.

Los resultados obtenidos en la respuesta IgG generada frente a HSP70 en los ratones inmunizados con las distintas proteínas de fusión que la

contienen, quedan mostrados en la figura 18. Así, podemos observar que 2 semanas y media tras la primera inmunización únicamente existe respuesta de anticuerpos en el grupo de ratones inmunizado con Glía33-h70T por vía subcutánea. Esta respuesta se da en el 50% de los ratones y con un valor medio de D.O. de 0,21. Sin embargo, tres semanas tras la segunda inmunización, los ratones de los grupos inmunizados con Glía33x2-HSP70 y Glía33-HSP70, por vía intraperitoneal y subcutánea, presentan una respuesta de anticuerpos anti-HSP70 en el 100% de los ratones con un valor medio de D.O. de 3. Interessantemente, los ratones inmunizados con Glía33-h70T por vía intraperitoneal y subcutánea no tienen respuesta de anticuerpos frente HSP70.

El análisis de esta respuesta a largo plazo, 15 semanas tras la segunda inmunización, mostrado en la figura 18, refleja que en general existe un leve descenso en el nivel de anticuerpos anti-HSP70, especialmente en los casos de inmunización por vía intraperitoneal, aunque siguen detectandose éstos en el 100% de la población de cada grupo. El grupo de ratones inmunizado con Glía33-h70T sigue sin mostrar respuesta de anticuerpos tanto si la inmunización es por vía intraperitoneal como subcutánea. Los ratones salinos no presentan anticuerpos anti-HSP70 en ningún momento ensayado post-inmunización.

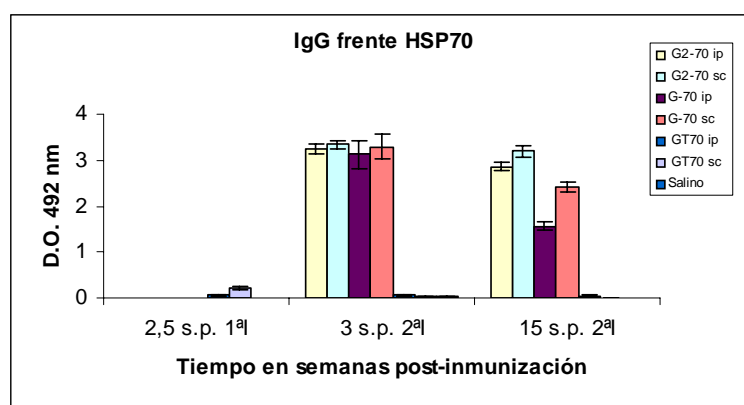


Figura 18. Nivel de anticuerpos IgG inducido frente a la proteína HSP70 en ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados con las diferentes proteínas a estudio por vía intraperitoneal y subcutánea. Análisis llevado a cabo 2 semanas y media tras la 1ª inmunización (sueros analizados a dilución 1/50) y 3 y 15 semanas tras la 2ª inmunización (sueros analizados a dilución 1/100). Los sueros procedentes de ratones salinos no dan respuesta en ningún caso.

El grupo de ratones control inmunizado con la molécula C-LYT-Glía33 no muestra anticuerpos IgG anti-Glía33 en ningún punto de los analizados (2 semanas y media tras la primera inmunización, 3 y 9 semanas tras la segunda

inmunización). Sin embargo, estos ratones si muestran anticuerpos frente al polipéptido C-LYT desde la primera inmunización. Así observamos que 2 semanas y media tras esta primera inmunización (figura 19), responden el 25% de los ratones con un valor medio de D.O. de 0,57. Pasadas 3 semanas post-segunda inmunización, observamos una respuesta de anticuerpos en el 100% de los ratones con valor de D.O. de 0,78 y 9 semanas tras la segunda inmunización, se observa un valor medio de D.O. de 0,35.

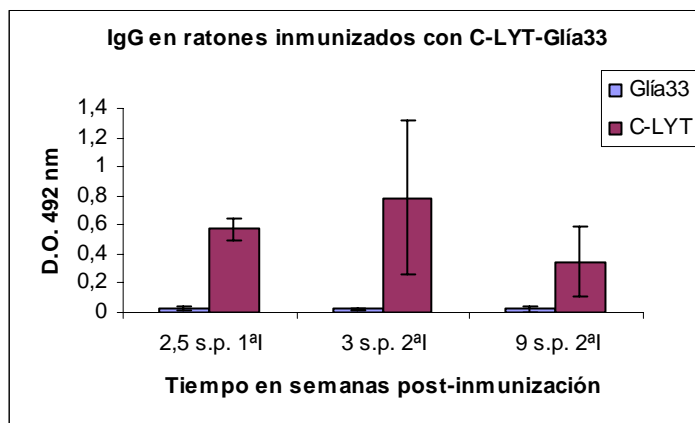


Figura 19. Respuesta humoral inducida frente a las proteínas Glía33 y C-LYT en ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad, inmunizados por vía subcutánea con la proteína C-LYT-Glía33. Análisis realizado 2 semanas y media tras la primera inmunización a dilución 1/50 de los sueros y 3 y 9 semanas tras la segunda inmunización, a dilución 1/100 de los sueros. Los ratones salinos no presentan respuesta frente a ninguna de las dos proteínas.

4.1.4. Activación de una respuesta celular (linfocitos T citotóxicos) inducida frente al antígeno KMP11 por la molécula HSP70. Análisis del fragmento de HSP70 que porta tal actividad *carrier*

Estudios previos del laboratorio han puesto de manifiesto que la proteína HSP70 de *T. cruzi* tiene la capacidad de inducir células T citotóxicas específicas del antígeno KMP11, al ser inoculadas como proteína de fusión en ratones de la cepa C57BL/6-A2K^b (Maranon, Thomas et al. 2001). Al objeto de identificar el fragmento de HSP70 capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno asociado, llevamos a cabo la construcción de distintos vectores portando el antígeno KMP11, asociado a distintos fragmentos de dicha molécula HSP70. Para ello empleamos la molécula completa HSP70 (control), el fragmento h70T de 29kDa y las mitades carboxilo y amino de este fragmento h70T, denominadas h70TC y h70TA, respectivamente.

4.1.4.1. Construcción de vectores recombinantes.

La construcción del vector pQE32-KMP11-h70TA se realiza a partir del vector pQE₃₂-KMP11-h70T (Planelles, Thomas et al. 2002). Este vector es digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *SphI*, que permiten liberar el fragmento carboxilo de h70T. Una vez digerido, el vector resultante es religado dando lugar al vector pQE₃₂-KMP11-h70TA (figura 20).

En el caso del vector pQE32-KMP11-h70TC, digerimos el mencionado vector pQE32-KMP11-h70T con las enzimas de restricción *BamHI* y *SphI*, extrayendo el fragmento h70T completo y dejando el vector abierto conteniendo la secuencia génica codificante del antígeno KMP11. Por otro lado, llevamos a cabo la amplificación por PCR del fragmento génico que codifica la región carboxilo del fragmento h70T (h70TC), mediante oligos que mapean en sus extremos 3' y 5' y que contienen las secuencias de corte para *BamHI* y *SphI* en sus extremos. Una vez amplificado, digerimos con las mencionadas enzimas de restricción *BamHI* y *SphI*, obteniendo el fragmento h70TC con los extremos protuberantes correspondientes a las mencionadas enzimas y que permite un subclonaje en el vector abierto pQE₃₂-KMP11 (figura 20).

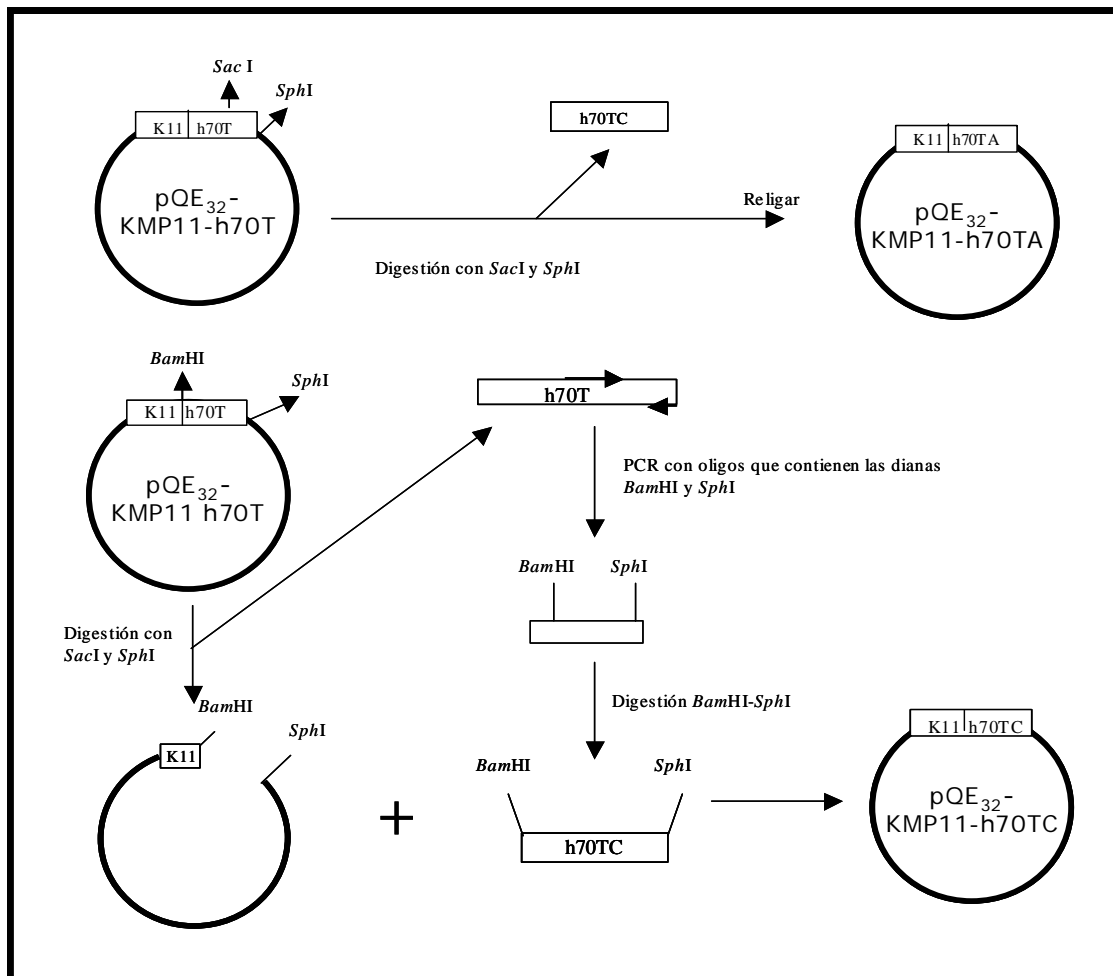


Figura 20. Esquema del clonaje de los vectores recombinantes pQE₃₂-KMP11-h70TA y pQE₃₂-KMP11-h70TC. Para la obtención de dichos vectores partimos del vector pQE₃₂-KMP11h70T que contiene los genes codificantes para KMP11 y h70T de *T.cruzi* fusionados en fase.

4.1.4.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes KMP11-HSP70, KMP11-h70T, KMP11-h70TA y KMP11-h70TC. Ensayo de inmunización

Una vez obtenidos los vectores recombinantes portadores de los genes de fusión a ensayo, se realiza la transformación en bacterias *E. coli*, cepa XL1-blue. Tras la inducción y solubilización de las proteínas recombinantes codificadas por dichos vectores, se lleva a cabo la purificación por cromatografía de afinidad a Ni²⁺, debido a la cola de 6 histidinas que poseen las construcciones y que quedan en fase con las proteínas de fusión codificadas por los genes clonados.

Los datos acerca de la expresión, solubilización y purificación de las distintas proteínas recombinantes se especifican en Material y métodos y las fracciones purificadas son analizadas mediante SDS-PAGE.

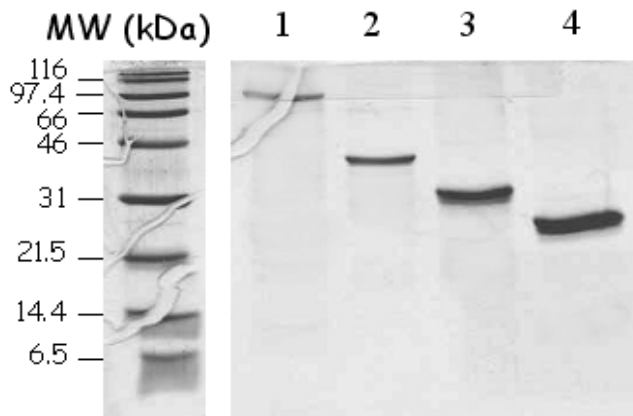


Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas KMP11-HSP70 y KMP11-h70T, KMP11-h70TA y KMP11-h70TC, purificadas mediante cromatografía de afinidad a Niquel. 1: KMP11-HSP70; 2: KMP11-h70T; 3: KMP11-h70TA; 4: KMP11-h70TC. Se muestran las 4 proteínas recombinantes empleadas para las inmunizaciones.

Como se muestra en la figura 21, una única banda teñida con azul Coomassie es observada en los carriles 1, 2, 3 y 4 correspondientes a las proteínas de fusión KMP11-HSP70, KMP11-h70T, KMP11-h70TA y KMP11-

h70TC, respectivamente. Las citadas bandas se corresponden con proteínas de un tamaño aproximado a 81, 40, 26 y 24 kDa respectivamente, los cuales coinciden con el tamaño teóricamente esperado para las mencionadas proteínas de fusión.

La inmunización con las distintas moléculas a ensayo se realiza por vía subcutánea en ratones transgénicos C57BL/6-A2K^b de 7 semanas de edad, llevando a cabo 3 inmunizaciones a intervalos de 21 día. El ensayo de citotoxicidad se realiza 3 semanas tras la última inmunización. Al objeto de inmunizar con similar número de moléculas de KMP11, la dosis por ratón de cada una de las proteínas recombinantes es la siguiente: 20 µg de KMP11-HSP70, 10 µg de KMP11-h70T, 8 µg de KMP11-h70TA y 8 µg de KMP11-h70TC. Como control, un grupo con igual número de ratones se inocula con solución salina.

4.1.4.3. Determinación de la presencia de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno.

Al objeto de determinar la capacidad de la proteína HSP70 y distintos fragmentos a estudio derivados de ésta, de inducir linfocitos T citotóxicos (CTLs) frente al antígeno KMP11 al que van fusionado, tres semanas tras la tercera inmunización de los ratones inmunizados son estimuladas *in vitro* 3 veces a intervalos de 6 días con células Jurkat-A2K^b transfectadas con el gen codificante para KMP11 (Maranon, Thomas et al. 2001). 6 días post-tercera estimulación, se realiza con estas células efectoras un ensayo clásico de liberación de cromo (⁵¹Cr) utilizando como células diana las mencionadas células Jurkat-A2K^b transfectadas con el gen KMP11, células p815 igualmente transfectadas con KMP11, así como ambas células sin transfectar. En todos los casos las células diana son tratadas con mitomicina y marcadas con cromo (⁵¹Cr). En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos expresados como porcentaje de lisis específica y para distintas proporciones células efectoras/células diana.

Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 22, indican que a la proporción E:D de 25:1, los ratones inoculados con KMP11-h70T presentan el mayor porcentaje de lisis celular, siendo este 23%. Este porcentaje de lisis se mantiene a las proporciones E:D de 50:1 y 100:1, siendo el valor de lisis a estas proporciones de células efectoras:diana, similar al obtenido para la

proteína HSP70 completa. Las células procedentes del grupo de ratones inmunizado con la proteína KMP11-h70TA no inducen un porcentaje significativo de lisis celular.

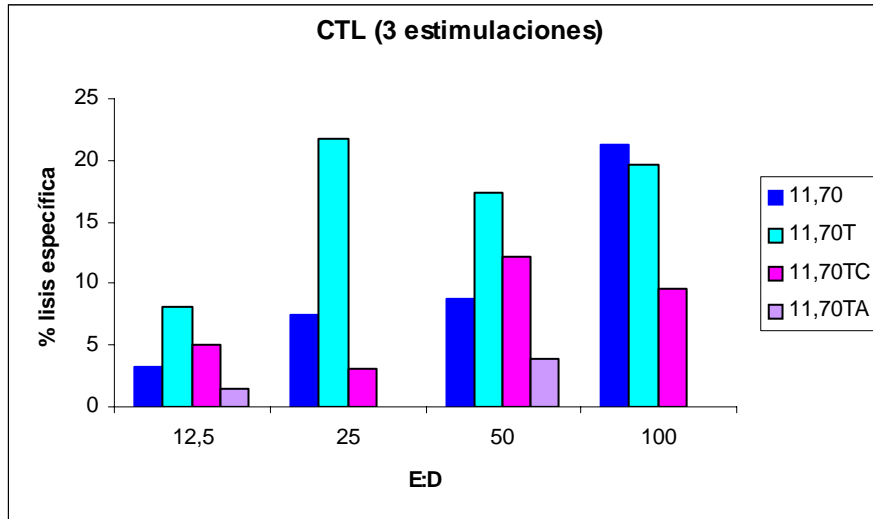


Figura 22. Ensayo de citotoxicidad (CTLs). En el gráfico se muestra el porcentaje de lisis específica frente a distintas proporciones de células efectoras y diana, restando en cada caso el porcentaje obtenido frente a células Jurkat-A2K^b no transfectadas con el gen KMP11. Las células efectoras empleadas son esplenocitos de ratones inoculados con KMP11-HSP70, KMP11-h70T, KMP11-h70TA y KMP11-h70TC.

Interesantemente, aquellas células procedentes de los ratones inmunizados con la proteína de fusión conteniendo la región carboxilo del fragmento h70T, induce lisis celular en un porcentaje de aproximadamente el 13% a la proporción de E:D de 50. Para ningún grupo de ratones inmunizados con las distintas moléculas a estudio se observa lisis significativa frente a las células p815 transfectadas con el gen KMP11 así como frente a células Jurkat-A2K^b o p815 sin transfectar.

4.2. Estudio de la respuesta inmune inducida por las proteínas recombinantes quiméricas Q4LiP portando los antígenos de *Leishmania* (KMP11, Tgp63, PSA-NH2 y PSA-COO) y Q5LiP que incorpora a estos antígenos el fragmento h70T de *T. cruzi*, y de su capacidad de inducir protección frente a la infección por *Leishmania*

4.2.1. Determinación de la capacidad inmunogénica de las moléculas Q4LiP y Q5LiP

La proteína recombinante quimérica Q4LiP está compuesta por los antígenos o fragmentos antigénicos KMP11, Tgp63, PSA-COO y PSA-NH₂ de *Leishmania infantum*. La proteína recombinante quimérica Q5LiP está formada por estos mismos antígenos de *L. infantum* fusionados al fragmento truncado de HSP70 de *Trypanosoma cruzi* (h70T). Al objeto de determinar la capacidad inmunogénica de los mencionados antígenos de *Leishmania* en el contexto de la molécula quimérica que los porta, así como del papel inmunomodulador del fragmento h70T, se llevan a cabo inmunizaciones en ratones BALB/c y C57BL/6 usando la vía subcutánea y vía intraperitoneal.

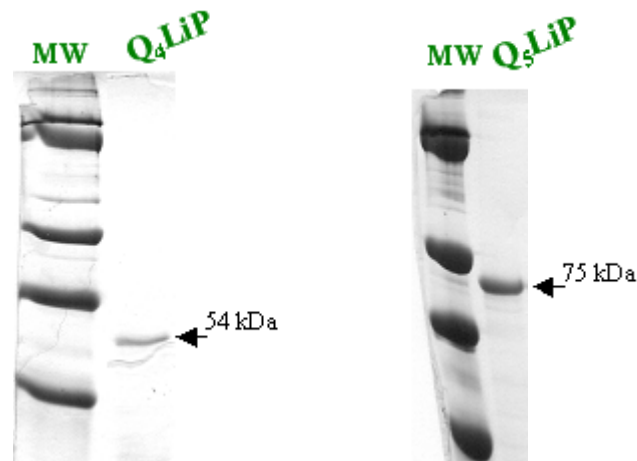


Figura 23. Proteínas Q4LiP y Q5LiP, purificadas por cromatografía de afinidad a Níquel.

4.2.1.1. Inmunización de ratones y obtención de muestras para análisis de respuesta inmunológica

Se llevan a cabo dos inmunizaciones separadas 3 semanas entre ellas, en 2 grupos de 15 ratones inmunizados con distinto patrón de inoculaciones:

	<u>1^a Inmunización</u>	<u>2^a Inmunización</u>
<u>Grupo 1:</u>	2 µg Q4LiP	0.1 µg Q4LiP
<u>Grupo 2:</u>	2 µg Q5LiP	0.1 µg Q5LiP

Con el fin de determinar la respuesta inmunológica generada por las mencionadas moléculas a estudio se toman distintas muestras sanguíneas y celulares de los ratones inmunizados a distintos tiempos pre y post-infección. La respuesta humoral se analiza mediante ELISA a partir de suero sanguíneo que obtenemos 2 y 5 semanas tras la segunda inmunización determinando la respuesta generada (nivel de IgG y de los subtipos IgG1 e IgG2a) frente a cada una de las 4 proteínas de *L. infantum* componentes de las moléculas quiméricas. La respuesta celular la analizamos 5 semanas tras la segunda inmunización mediante la determinación del índice de proliferación linfocitaria observada frente a cada una de las 4 proteínas de *L. infantum* componentes de las moléculas quiméricas inoculadas y frente a la misma molécula quimérica Q4LiP.

4.2.1.2. Respuesta humoral en ratones inmunizados con Q4LiP y Q5LiP

La primera determinación de respuesta humoral inducida frente a los antígenos KMP11Li, PSA-NH₂Li, PSA-COOLi y Tgp63Li por las moléculas a estudio se realiza 2 semanas tras la segunda inmunización, mediante la técnica de ELISA. Así, se analiza el nivel de IgG generado frente a los mencionados antígenos y los subtipos de inmunoglobulina generada (IgG1 e IgG2a). Todos los sueros están analizados a dilución 1/200.

Los datos que se reflejan en las figuras 24 a 29 corresponden a los datos obtenidos para los ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea. En los ratones C57BL/6 observamos datos similares (no mostrados) lo que evidencia la ausencia de diferencias significativas en la respuesta humoral generada dependiendo del haplotipo del ratón.

La respuesta IgG es mayor en los ratones de los grupos 1. La proteína frente a la que hay una respuesta más elevada es PSA-COOLi con valores de D.O. en torno a 1. Frente Tgp63Li y KMP11Li la respuesta en la mayoría de los ratones es muy similar con valores de D.O. en torno a 0,5. Frente a la proteína PSA-NH₂Li la respuesta es muy escasa. En los ratones del grupo 2 la respuesta es significativamente menor que en el grupo anterior. La respuesta se produce frente Tgp63Li, PSA-COOLi y PSA-NH₂Li y con valores de D.O. menores a 0,5 en la mayoría de los casos. En este grupo 2 de ratones es llamativa la gran disminución observada en el nivel de anticuerpos generados frente al antígeno PSA-COOLi relativo a aquel observado en el grupo 1.

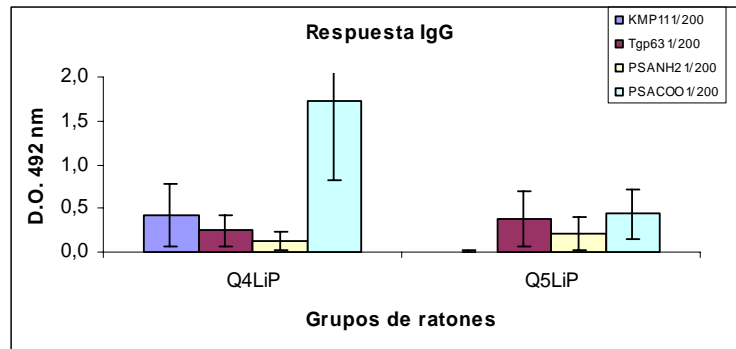


Figura 24. Respuesta humoral IgG en ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea frente a los distintos antígenos componentes de la molécula quimérica Q4LiP, 2 semanas tras 2ª inmunización. Q4LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q4LiP y Q5LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q5LiP. Los datos expresados son representativos de 3 experimentos diferentes.

Analizamos los subtipos IgG1 e IgG2a para caracterizar la respuesta producida y determinar si hay una respuesta balanceada entre estos dos subtipos de IgG, o si por el contrario la respuesta es predominante de uno de los subtipos. Los resultados obtenidos muestran que en los ratones del grupo 1, la respuesta es mixta con valores similares para ambos subtipos. Los ratones del grupo 2 presentan únicamente una respuesta de tipo IgG2a.

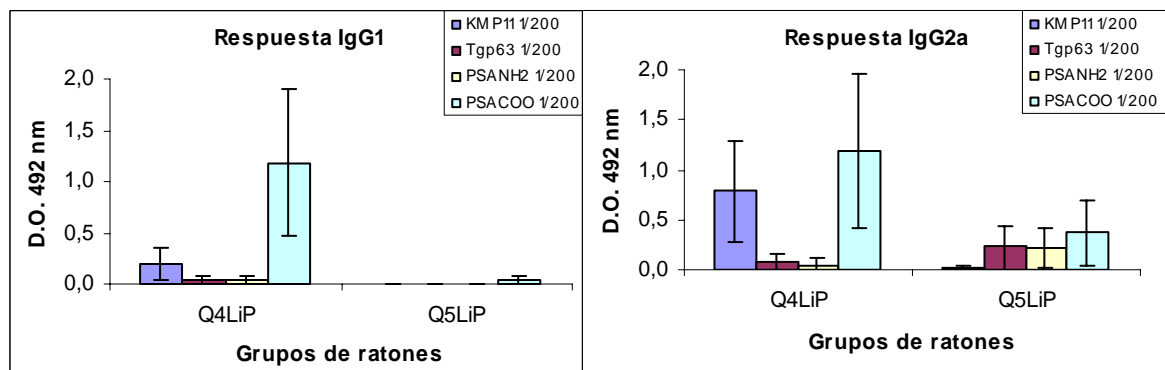


Figura 25. Subtipos de IgG: IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea frente a KMP11Li, Tgp63Li, PSA-COOLi y PSA-NH₂Li, 2 semanas tras la 2ª inmunización. Q4LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q4LiP y Q5LiP es el grupo inmunizado con Q5LiP. Los datos expresados son representativos de 3 experimentos diferentes.

La determinación de anticuerpos 5 semanas tras la segunda inmunización, muestra que la respuesta humoral aumenta en ambos grupos de ratones. Esta respuesta es cualitativa y cuantitativamente diferente según el grupo analizado. Así, en el grupo 1 de ratones hay una respuesta mayoritaria frente PSA-COOLi y KMP11Li observando valores algo menores frente Tgp63Li. En el grupo 2 los anticuerpos generados son significativamente

inferiores a los observados en el grupo 1, estando la respuesta especialmente dirigida a los antígenos Tgp63Li y PSA-NH₂Li. Frente KMP11Li solo responde 1 ratón con valor de 0,6 y frente PSA-COOLi no responde ningún ratón.

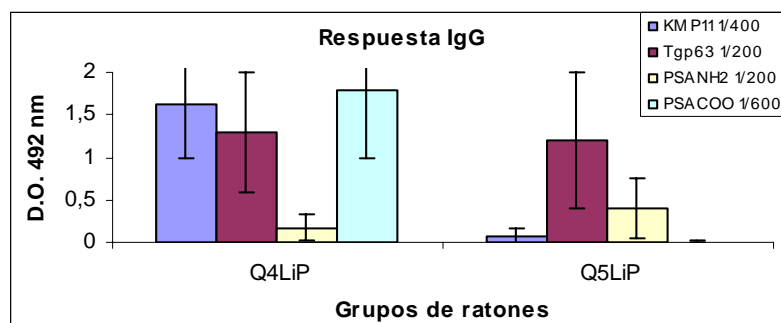


Figura 26. Respuesta IgG frente a las distintas proteínas componentes de la quimera Q4LiP, en ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea 5 semanas tras la 2ª inmunización. Q4LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q4LiP y Q5LiP es el grupo inmunizado con Q5LiP. Los datos expresados son representativos de 3 experimentos diferentes.

Respecto al subtipo de las inmunoglobulinas generadas, observamos que en el grupo 1 la respuesta es predominantemente del subtipo IgG1. En el grupo 2 solo se observan anticuerpos frente a los antígenos Tgp63Li y PSA-NH₂Li, siendo esta respuesta únicamente de subtipo IgG2a.

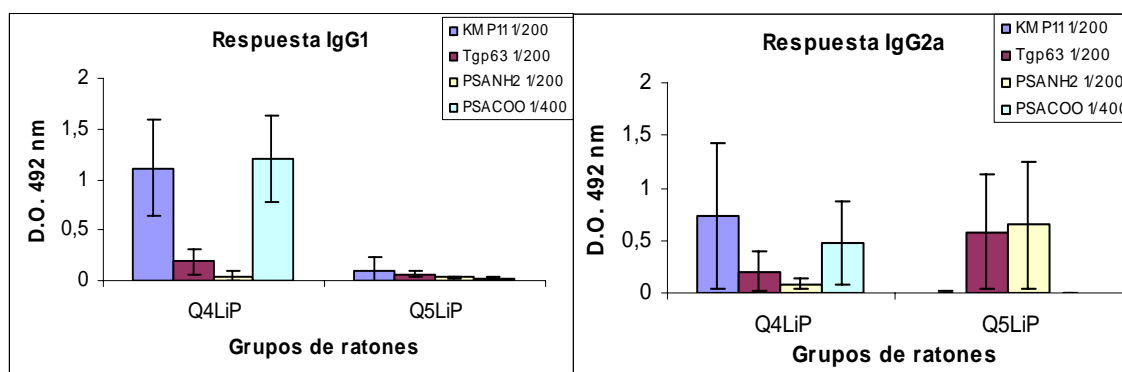


Figura 27. Respuesta humoral 5 semanas post-segunda inmunización. IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea. Q4LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q4LiP y Q5LiP es el grupo inmunizado con Q5LiP. Los datos expresados son representativos de 3 experimentos diferentes.

En todas las determinaciones de respuesta humoral se analizaron sueros procedentes de ratones salinos y en ningún caso se obtuvo valor positivo.

11 semanas tras la segunda inmunización se llevó a cabo la determinación de la respuesta humoral para ver el comportamiento a largo

plazo y pudimos observar como la respuesta humoral generada por las moléculas quiméricas frente a los antígenos componentes de las mismas, se mantenía en general con similares valores salvo pequeños cambios.

Así, en el caso de respuesta IgG, los ratones inmunizados con Q4LiP presentan mayor respuesta frente Tgp63Li y los inmunizados con Q5LiP aumentan respuesta frente PSA-NH₂Li, a la observada 5 semanas post-segunda inmunización.

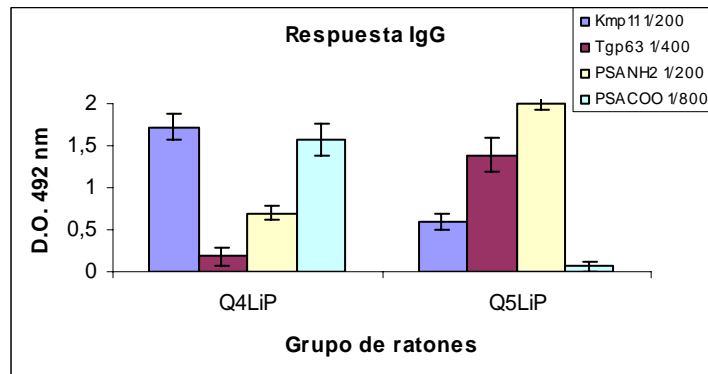


Figura 28. Respuesta humoral (IgG) 11 semanas post-segunda inmunización en ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea. Q4LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q4LiP y Q5LiP es el grupo inmunizado con Q5LiP. Los datos expresados son representativos de 3 experimentos diferentes.

En cuanto a los isotipos de las inmunoglobulinas, la respuesta IgG1 disminuye levemente en los ratones inmunizados con Q4LiP salvo frente PSA-NH₂Li donde aumenta ligeramente. La respuesta IgG2a aumenta frente Tgp63Li en ambos grupos de ratones y frente al antígeno PSA-NH₂Li en los ratones inmunizados con Q4LiP.

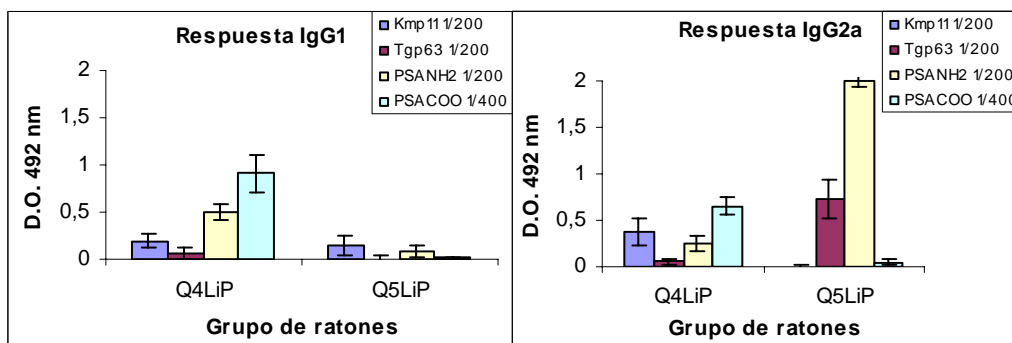


Figura 29. Respuesta humoral (IgG1 e IgG2a) 11 semanas post-segunda inmunización en ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea. Q4LiP es el grupo de ratones inmunizado con Q4LiP y Q5LiP es el grupo inmunizado con Q5LiP. Los datos expresados son representativos de 3 experimentos diferentes.

4.2.1.3. Respuesta celular. Proliferación celular frente a la proteína quimérica Q4LiP y los distintos antígenos que la componen

Con el objetivo de determinar la respuesta celular producida en los ratones inmunizados con las moléculas quiméricas Q4LiP y Q5LiP, 5 semanas tras la segunda inmunización, se realiza un ensayo de proliferación de esplenocitos en respuesta al antígeno Q4LiP y de modo individual frente a sus antígenos componentes. Analizamos los ratones inmunizados con dos dosis de Q4LiP (grupo 1) y los inmunizados con dos dosis de Q5LiP (grupo 2), tanto por vía subcutánea como intraperitoneal. El estudio de proliferación se lleva a cabo estimulando *in vitro* los esplenocitos con distintas concentraciones de las distintas proteínas recombinantes, para ver si se trata de un efecto dosis dependiente. También se analizan células estimuladas con un mitógeno como control positivo (CoA) y células sin estimular como control negativo. Así se utilizan esplenocitos de ratón extraídos en esterilidad y estimulados *in vitro* con Q4LiP, PSA-NH₂Li, PSA-COOLi, Tgp63Li y KMP11Li y mantenida durante 72 horas en estufa a 37°C y 5% de CO₂. La estimulación, tal y como hemos mencionado anteriormente, se hace a distintas concentraciones de proteína de 0,4, 2 y 10 µg/ml de proteína respectivamente. El índice de proliferación celular inducido en cada grupo es medido por la incorporación de timidina tritiada al ADN de nueva síntesis.

Los resultados obtenidos indican que en las células procedentes de los cuatro grupos de ratones, la estimulación *in vitro* con la proteína recombinante quimérica Q4LiP induce índice significativo de estimulación celular independientemente de la vía de inoculación (datos mostrados en figura 30). El grupo con mayor respuesta proliferativa es el inmunizado con la molécula quimérica Q5LiP por vía subcutánea, con un índice de estimulación alrededor de 8 al ser estimulado con 10µg/ml de Q4LiP. Los ratones inmunizados con Q4LiP o Q5LiP (vía ip) presentan una estimulación similar entre ellos y algo menor que aquellos pertenecientes al grupo indicado anteriormente.

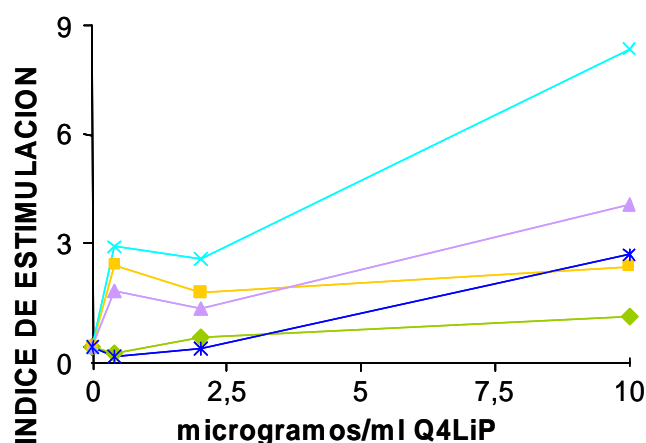


Figura 30. Índice de estimulación de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea e intraperitoneal y estimulados con la quimera Q4LiP. Estimulo a distintas concentraciones de proteína (0,4, 2 y 10 µg/ml). Q4LiP sb — Q4LiP ip — Q5LiP sb — Q5LiP ip — Salinos —

El índice de estimulación obtenido, al usar como moléculas estimuladoras los antígenos PSA-COOLi, Tgp63Li, PSA-NH₂Li y KMP11Li respectivamente, es en general menor al observado al estimular con la molécula quimérica completa, sin embargo, el perfil cualitativo de respuesta es similar (figura 31). Los ratones inmunizados vía ip con la molécula quimérica Q5LiP no presenta proliferación salvo tras la estimulación con el antígeno PSA-COOLi. El índice de estimulación es dosis dependiente a excepción de las células estimuladas con el antígeno Tgp63Li, donde la máxima estimulación se produce con 0,4 µg/ml, observándose un efecto supresor a mayor concentración. Los ratones inmunizados por vía subcutánea presentan una mayor respuesta celular que aquellos inmunizados por vía intraperitoneal, especialmente al usar como inmunógeno la proteína quimérica Q5LiP.

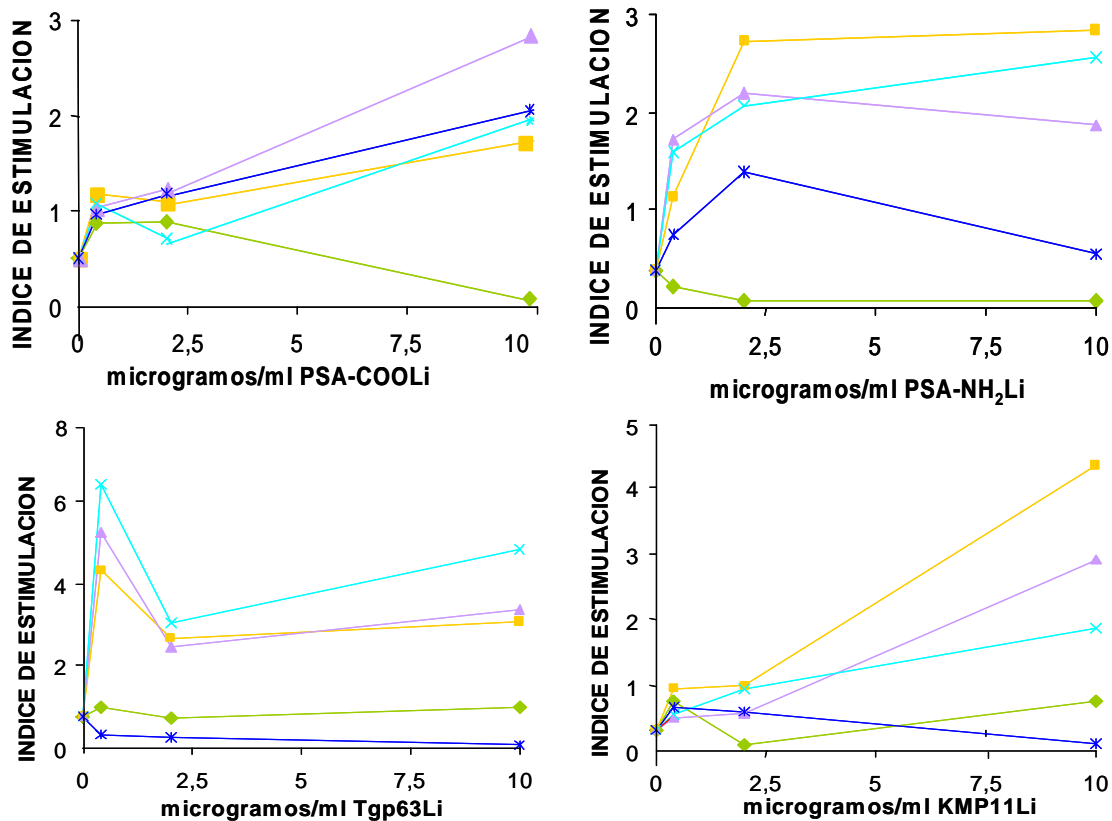


Figura 31. Índice de estimulación de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea e intraperitoneal y estimulados con los distintos antígenos componentes de la molécula quimérica Q4LiP. Estimulo a distintas concentraciones de proteína (0,4, 2 y 10 µg/ml) Q4LiP sb — Q4LiP ip — Q5LiP sb — Q5LiP ip — Salinos —

4.2.1.4 Respuesta citotóxica inducida por las proteínas quiméricas Q4LiP y Q5LiP

Al objeto de determinar si las moléculas quiméricas a estudio son capaces de generar activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos de antígeno se realizan ensayos de lisis celular usando para ello ratones C57BL/6-A2K^b inmunizados siguiendo el mismo esquema que el anteriormente mencionado para los ratones BALB/c. La utilización de estos ratones está justificada en que los mismos son portadores, tal como mencionamos en anteriores apartados, de una molécula de presentación de clase I quimérica, con las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ humanas y el resto murino. Así las células de estos ratones transgénicos A2/K^b presentan los antígenos por MHC I del mismo modo que lo harían las células humanas de haplotipo A2 lo cual facilita que los resultados obtenidos en este tipo de ensayos puedan ser extrapolables a lo que

podría suceder en humanos. Para el ensayo de lisis celular se utilizan como células presentadoras células Jurkat-A2K^b y p815, respectivamente transfectadas con la molécula quimérica Q4LiP clonada en el vector de transfección pCMV4 y tratadas con mitomicina. Como células efectoras usamos la población esplénica de ratones inmunizados con 2 dosis de las moléculas quiméricas Q4LiP o Q5LiP. Las células presentadoras empleadas, Jurkat-A2K^b están transfectadas con el gen A2-K^b presentando resistencia a geneticina (antibiótico de selección). Dado que el vector eucariota empleado en nuestras construcciones, pCMV4, confiere resistencia a este mismo antibiótico, no era posible realizar una transfección estable de estas líneas celulares. Esto nos llevó a realizar transfecciones transitorias mediante electroporación. Para poner a punto estas transfecciones seguimos el protocolo detallado en material y métodos, y comprobamos que la máxima expresión, determinada mediante *western blot*, tanto en células Jurkat-A2K^b, como en p815, se producía entre 48 y 60 horas post-electroporación. En base a este resultado, estas células serían electroporadas en este margen de tiempo antes del ensayo y posteriormente centrifugadas en un gradiente de ficoll, para eliminar las células muertas y finalmente añadirlas a los esplenocitos.

Tras la extracción de los bazos de los ratones inmunizados, 7 semanas tras la segunda inoculación y su posterior homogenización, se realizaron un total de tres estimulaciones *in Vitro* con las mencionadas células transfectadas. Así, por una parte un grupo de células se estimula con células Jurkat-A2K^b transfectadas con el gen de Q4LiP. Otro grupo con estas mismas células sin transfectar y un tercer grupo con células p815 transfectadas con el gen de Q4LiP, como control. Seguidamente se procede a realizar un ensayo clásico de liberación de ⁵¹Cr utilizando como células diana las mismas células presentadoras marcadas con ⁵¹Cr.

Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 32, indican que en los ratones inmunizados vía subcutánea, el porcentaje mayoritario de lisis específica se produce en el grupo de ratones inmunizado con la molécula quimérica Q5LiP, con un índice superior a 20. Los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q4LiP tienen un porcentaje de lisis de alrededor de 10. Los esplenocitos enfrentados con células Jurkat-A2k^b sin transfectar y células control, p815, tienen un porcentaje de lisis basal no significativo.

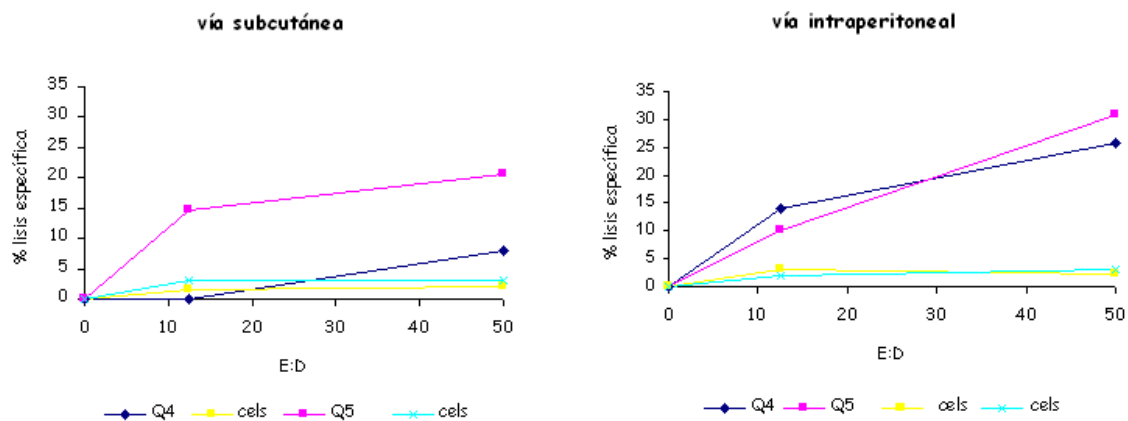


Figura 32. Porcentaje de lisis celular en ratones C57BL/6-A2K^b inmunizados con las moléculas quimérica Q4LiP y Q5LiP por vía subcutánea e intraperitoneal, estimuladas con distintos índices de relación células estimuladoras:diana (12,5:1, 50:1). En rojo y azul la lisis obtenida frente a células Jurkat-A2K^b transfectadas con el gen pQ4Li. En turquesa las células Jurkat-A2K^b sin transfectar y en amarillo las células p815 transfectadas con pQ4LiP.

En el caso de inmunización por vía intraperitoneal, los ratones inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP o con Q5LiP, muestran un porcentaje de lisis específica muy similar, siendo algo mayor en los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP. Ambos grupos de ratones tienen un porcentaje de lisis específica alrededor de 25. Al igual que mencionamos anteriormente, no se observa lisis alguna frente a células Jurkat-A2k^b sin transfectar o células p815 transfectadas con el plásmido que contiene el gen Q4Li.

4.2.2. Determinación de la capacidad inmunomoduladora de específicos oligonucleótidos conteniendo secuencias CpG asociados a la molécula quimérica Q5LiP

Las secuencias CpG son secuencias conocidas por su capacidad inmunoestimuladora, razón por la cual, inoculamos ratones con la proteína recombinante Q5LiP, acompañada de distintos oligonucleótidos portando secuencias CpG a las que denominamos respectivamente: IPB; LN; IPB mod y LN mod, con el objeto de analizar su capacidad inmunomoduladora (la secuencia de los mencionados oligonucleótidos se indica en la sección de material y métodos)

A tal fin grupos de 6 ratones BALB/c de 7 semanas, son inmunizados dos veces a intervalos de 3 semanas con la proteína quimera y con los

oligonucleótidos a estudio. La primera inmunización se realiza con 5 µg por ratón de proteína recombinante Q5LiP y la segunda de 2 µg por ratón. A los ratones a los que se inocula junto con la proteína quimérica recombinante Q5LiP, secuencias CpG, se le inoculan 100µg del correspondiente oligonucleótido. La inmunización se realiza tanto por vía subcutánea como intraperitoneal y en un volumen final de 100 µl. Por vía intraperitoneal solo empleamos los oligonucleótidos IPB mod y LN mod.

Para el análisis de la respuesta inmunológica generada determinamos el nivel de anticuerpos antígeno específicos generados, producción de citocinas, marcadores celulares y estimulación proliferativa celular. La respuesta humoral (nivel de anticuerpos) se analiza 2 semanas tras la segunda inmunización y la respuesta celular (citocinas, marcadores y linfoproliferación) se analiza 4 semanas tras la segunda inmunización. Los datos que aquí se muestran corresponden a la media de los valores obtenidos en el total de ratones inmunizados y analizados.

4.2.2.1. Respuesta humoral frente a los antígenos de *L. infantum* componentes de la molécula quimera Q5Li

La respuesta humoral se analiza mediante ELISA determinando el nivel de anticuerpos generado frente a cada uno de los antígenos de *L. infantum* componentes de la molécula quimérica (KMP11Li, Tgp63Li, PSA-NH₂Li y PSA-COOLi). Llevamos a cabo una única medida 2 semanas tras la segunda inmunización y analizamos los sueros a dilución 1/200 determinando el nivel de anticuerpos IgG1 e IgG2a (Figura 33). Los resultados obtenidos indican que la adición de los oligonucleótidos conteniendo secuencias CpG modifican la respuesta humoral inducida por la proteína quimérica Q5LiP, observándose una dependencia del oligonucleótido y antígeno en cuestión usado, así como de la vía de inoculación.

El análisis de la respuesta de isotipo IgG1 e IgG2a, muestra en general que está significativamente desbalanceada hacia el subtipo IgG2a, especialmente en aquellos ratones inmunizados con la proteína quimérica Q5LiP junto con los oligonucleótidos modificados conteniendo grupos tioles en los extremos 3´ y 5´ Este efecto es más significativo en los ratones inmunizados por vía intraperitoneal.

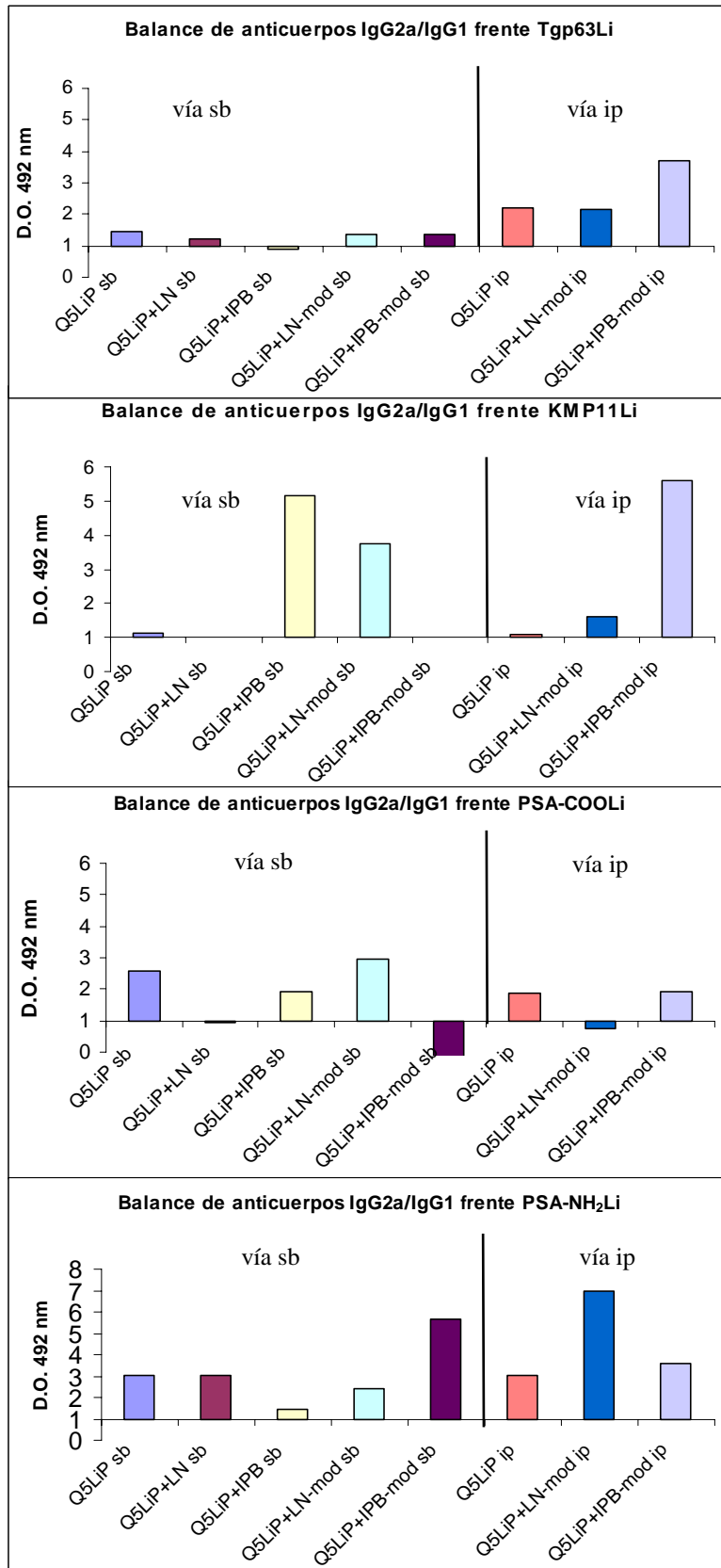


Figura 33. Determinación del balance de anticuerpos IgG2a/IgG1 frente a los antígenos Tgp63Li, KMP11Li, PSA-COOLi y PSA-NH₂Li en ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP aislada y Q5LiP junto a distintos oligonucleótidos. Sueros analizados a dilución 1/200. Los ratones salinos no dieron respuesta.

En ratones inmunizados vía subcutánea con la molécula quimérica Q5LiP aislada o en presencia de los distintos oligonucleótidos ensayados la respuesta generada frente al antígeno Tgp63Li es mixta (IgG1 e IgG2a) Sin embargo, esta respuesta está inclinada hacia el subtipo IgG2a en aquellos inoculados por vía intraperitoneal, especialmente los inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y el oligo IPB mod.

La respuesta generada frente al antígeno KMP11Li es mayoritariamente de subtipo IgG2a en los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP junto al oligo IPB (vía subcutánea) o con el oligonucleótido IPB mod inoculado por vía intraperitoneal. La respuesta generada frente al fragmento carboxilo de la proteína PSA es mayoritariamente del subtipo IgG2a especialmente en los ratones inmunizados vía intraperitoneal con la proteína quimérica Q5LiP o con Q5LiP y el oligonucleótido IPB mod o por vía subcutánea al inmunizar con Q5LiP y el oligonucleótido LN mod. Frente al antígeno PSA-NH₂Li no se detecta respuesta IgG1 y la respuesta IgG2a es muy baja y solo se observa en los ratones inmunizados con la proteína quimérica Q5LiP y el oligonucleótido LN por vía subcutánea (D.O. 0,14; dato no mostrado) y aquellos inmunizados por vía intraperitoneal con la proteína quimérica Q5LiP y en presencia del oligonucleótido IPB mod observando valor de D.O. de 0,12 y 0,15 respectivamente (datos no mostrados)

4.2.2.2. Respuesta celular inducida frente a los antígenos de *L. infantum* componentes de la proteína quimérica Q5LiP

Al objeto de determinar el nivel de respuesta celular inducida frente a los antígenos KMP11Li, Tgp63Li, PSA-NH₂Li y PSA-COOLi tras la inmunización con la molécula quimera Q5LiP y las secuencias CpG, se realizan ensayos de proliferación celular en respuesta a los distintos antígenos de *Leishmania* componentes de la molécula quimérica Q4LiP, 4 semanas tras la segunda inmunización. Para ello se utilizan esplenocitos de ratón extraídos en esterilidad, estimulados *in vitro* con las distintas proteínas recombinantes correspondientes a los mencionados antígenos a una concentración de 5µg/ml, durante 72 horas. Como control positivo se adiciona Concanavalina A y como control negativo, analizamos los esplenocitos sin estimular.

Los valores obtenidos de proliferación celular mostrados en la figura 34 indican que la mayor respuesta celular se observa en esplenocitos de ratones

inmunizados por vía intraperitoneal con la molécula quimérica Q5LiP y el oligonucleótido IPB mod presentando altos índices de estimulación (I.E.) frente a todos los antígenos ensayados componentes de la mencionada molécula quimérica Q4LiP. Los ratones inmunizados con la molécula Q5LiP aislada presentan niveles similares a los anteriormente observando de forma llamativa un alto índice de estimulación frente al antígeno PSA-NH₂Li. Sin embargo, por vía subcutánea, responden mejor frente a todos los antígenos, las células de los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP+LN mod.

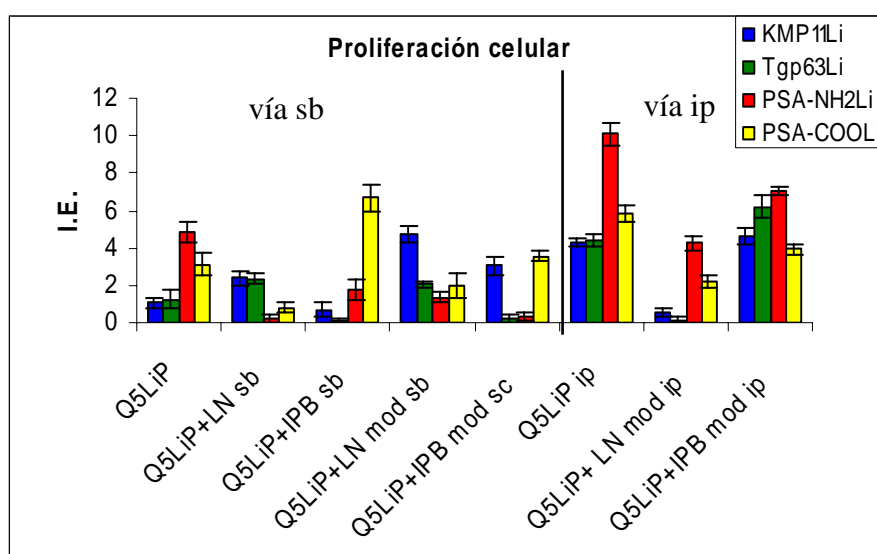


Figura 34. Índice de estimulación de esplenocitos en población celular procedente del bazo de ratones BALB/c inmunizados con la proteína recombinante Q5LiP aislada y Q5LiP junto a distintos oligonucleótidos conteniendo secuencias CpG, por vía de inoculación subcutánea e intraperitoneal. Estimuladas con concentración de proteína de 5µg/ml. I.E. es índice de estimulación celular.

Con el objetivo de analizar el tipo de respuesta celular inducida por las moléculas inmunomoduladoras a estudio realizamos la determinación de marcadores celulares (CD19⁺ y CD3⁺/CD4⁺) en esplenocitos procedentes de los ratones inmunizados con las moléculas a estudio. Así, los esplenocitos obtenidos 4 semanas post-segunda inmunización son estimulados *in vitro* de forma independiente durante 48 horas con los 4 antígenos de *L. infantum* componentes de la molécula quimérica Q4LiP.

Los resultados obtenidos (figura 35) muestran que en general se produce una discreta activación de células CD19⁺ al ser estimuladas con las proteínas componentes de la molécula quimérica relativa a las células control sin estimular. Una excepción de estos resultados son los esplenocitos estimulados

in vitro con PSA-NH₂Li donde en general se observa una supresión en el nivel de células CD19⁺ respecto a aquellos presentes en las muestras no estimuladas.

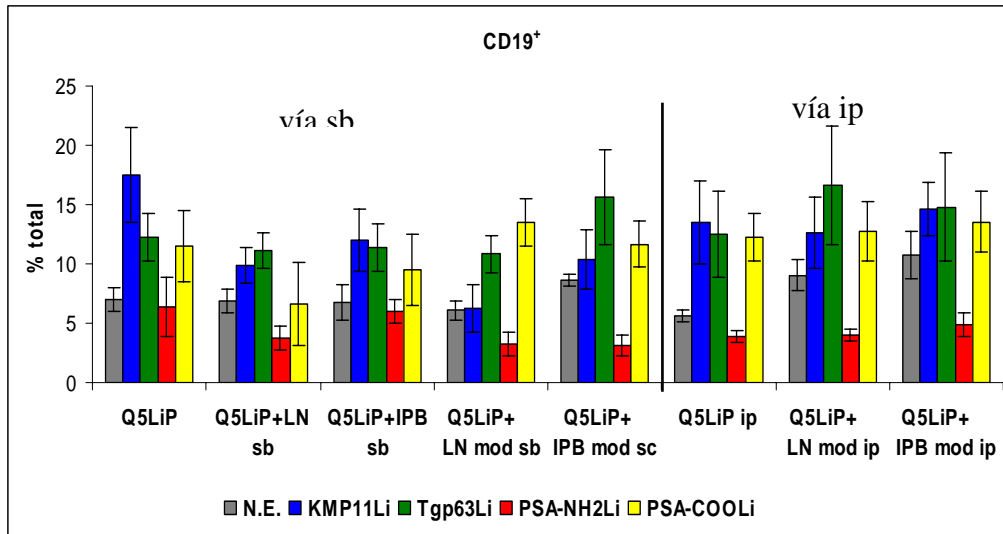


Figura 35. Porcentaje de células que expresan CD19⁺ en esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con Q5LiP aislada y Q5LiP junto a diferentes oligonucleótidos y estimulados *in Vitro* con los diferentes antígenos componentes de la molécula quimérica Q4LiP. sb – inoculación vía subcutánea e ip – inoculación vía intraperitoneal. Cada color indica la proteína con que se han estimulado las células. N.E. son las células sin estimular.

En cuanto al nivel de células CD3⁺/CD4⁺, en la figura 36 observamos que no hay diferencias significativas entre los distintos grupos de ratones inmunizados, tras su estimulación *in vitro* con los distintos antígenos de *Leishmania* a estudio y células sin estimular.

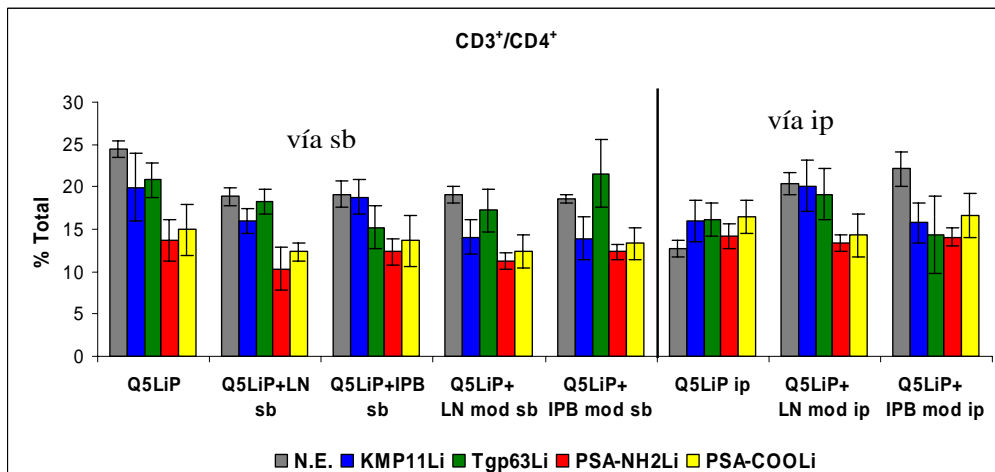


Figura 36. Porcentaje de células que expresan CD3/CD4 dentro de la población total de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con Q5LiP aislada y Q5LiP junto a diferentes oligonucleótidos y estimulados *in Vitro* con los diferentes antígenos componentes de la molécula quimérica Q4LiP. sb – inoculación vía subcutánea e ip – inoculación vía intraperitoneal. Cada color indica la proteína con que se han estimulado las células. N.E. son las células sin estimular.

Con el objeto de conocer el perfil de expresión de citocinas (Th1/Th2) en las células de bazo de los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y oligonucleótidos conteniendo secuencias CpG, analizamos la presencia de IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante celular de células procedentes de ratones BALB/c inmunizados con las moléculas a estudio, estimulando *in vitro* con los antígenos de *Leishmania* KMP11Li, PSA-NH₂Li, PSA-COOLi y Tgp63Li. La estimulación se lleva a cabo con una concentración de proteína recombinante de 4 μ g /ml. Se estimulan durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Como controles empleamos células sin estimular (control negativo) y células estimuladas con PDBu como control positivo de estimulación. Las células de los ratones son obtenidas 4 semanas tras la segunda inmunización y la determinación del nivel de citocinas se realiza mediante ELISA (Becton Dickinson).

El análisis de los resultados mostrados en la figura 37 muestran una fuerte producción de IFN- γ en las células procedentes de ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP en presencia de los oligonucleótidos LN mod e IPB mod, al ser estimuladas con los 4 antígenos componentes de la molécula quimérica. Esta producción adquiere valores en torno a 3000 pg/ml en todos los casos. No se observan diferencias significativas dependientes de la vía de inmunización (sb/ip) salvo en el grupo inmunizado con Q5LiP aislado donde el valor es mayor en el caso de inoculación por vía intraperitoneal. La inmunización por vía subcutánea de Q5LiP, Q5LiP y el oligonucleótido IPB y Q5LiP y el oligonucleótido LN, genera una respuesta de IFN- γ próxima a 1000 pg/ml salvo en los esplenocitos procedentes de ratones inmunizados con Q5LiP y el oligonucleótido IPB y estimulados *in vitro* con el antígeno Tgp63Li observándose una respuesta con valor próximo a 2000 pg/ml.

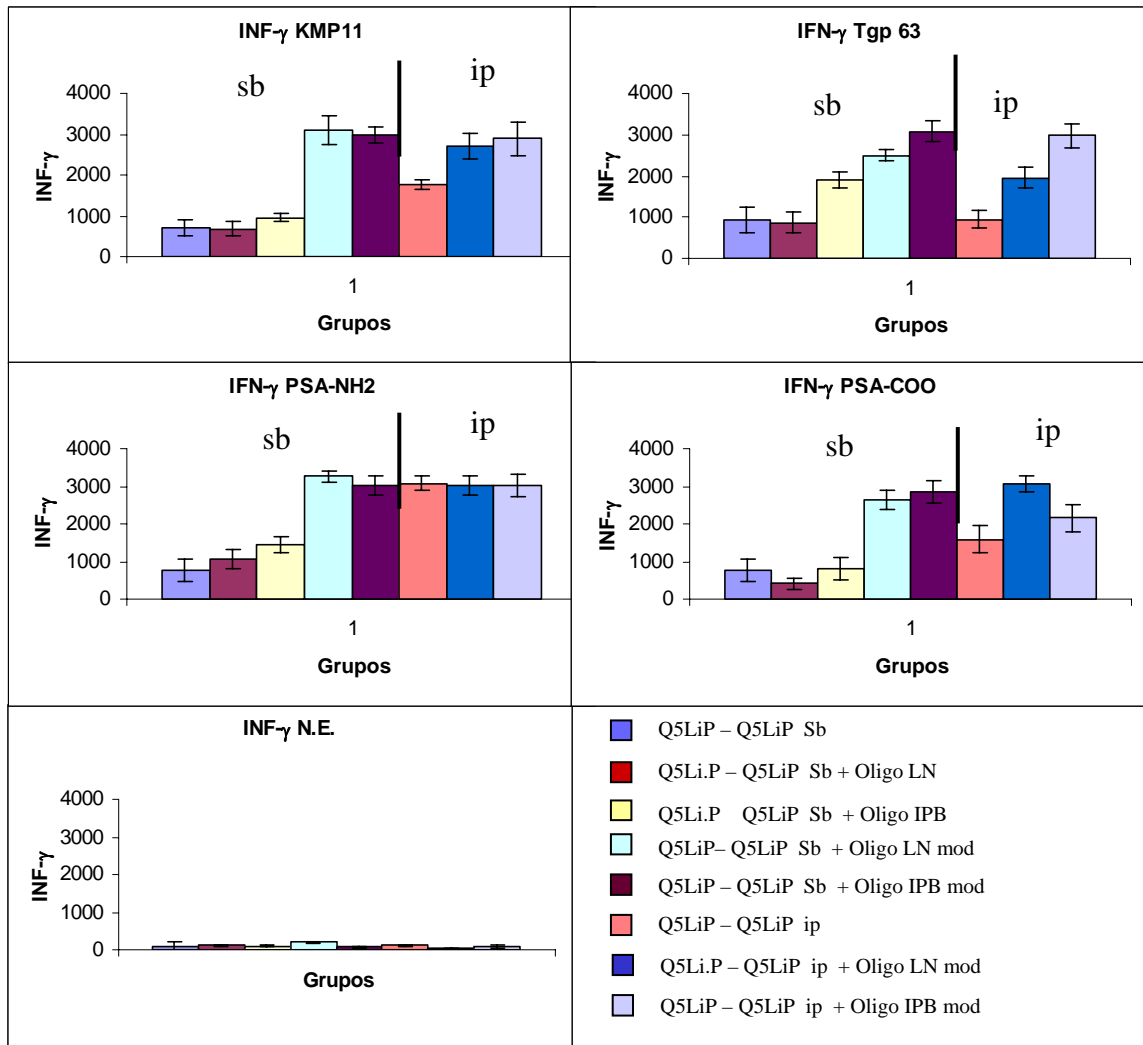


Figura 37. Producción de IFN- γ por parte de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados *in vitro* con la molécula quimérica Q5LiP aislada y Q5LiP junto a diferentes oligonucleótidos, estimulados con las 4 proteínas de *Leishmania infantum* componentes de la molécula quimérica Q5LiP.

El análisis de la producción de IL-4 muestra que la misma es significativamente menor a los valores observados para IFN- γ . Además los datos obtenidos muestran una disminución en el valor de producción de IL-4 en las células procedentes de ratones inmunizados por vía intraperitoneal con la proteína quimérica Q5LiP en presencia de los oligonucleótidos IPB mod y LN mod, relativa a aquella obtenida en las células de ratones inmunizados con la molécula Q5Li aislada. (Figura 38)

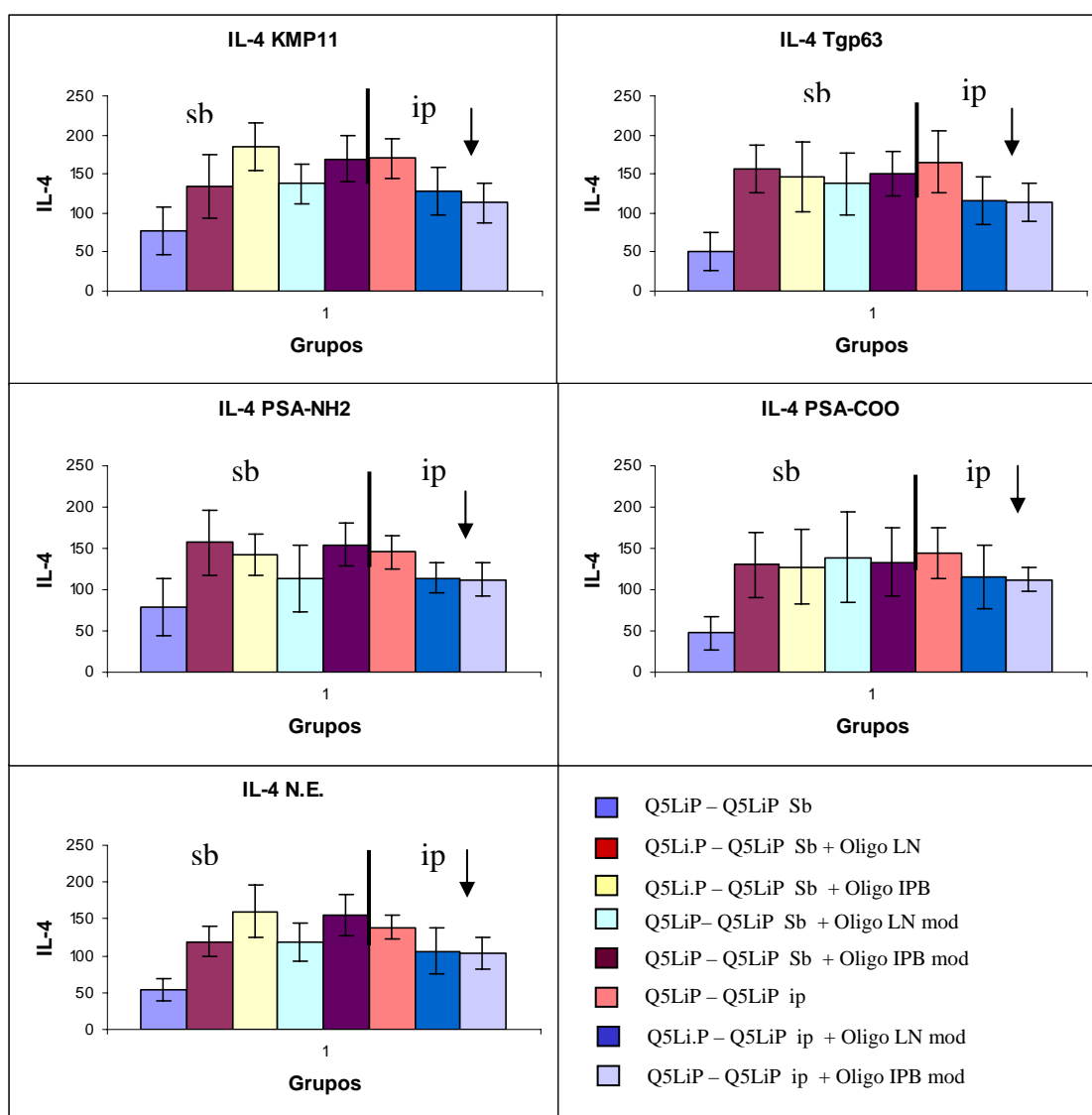


Figura 38. Producción de IL-4 por parte de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP aislada y Q5LiP junto a diferentes oligonucleótidos, estimulados *in vitro* con las 4 proteínas de *Leishmania infantum* componentes de la molécula quimérica Q5LiP.

La determinación del nivel de expresión de la citocina IL-10 la analizamos mediante marcaje en superficie celular con el correspondiente anticuerpo anti-IL-10 y análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 39, evidencian que solo se produce activación leve en 3 de los 8 grupos de ratones. Así observamos un aumento de IL-10 en células estimuladas con KMP11Li y en menor medida en aquellas estimuladas con Tgp63Li procedentes de los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP aislada y en presencia del oligonucleótido IPB, en

ambos casos inoculados por vía subcutánea. Así mismo se observa una pequeña activación de IL-10 en los esplenocitos de los ratones inmunizados vía intraperitoneal con Q5LiP en presencia del oligonucleótido LN mod y estimulados con KMP11Li.

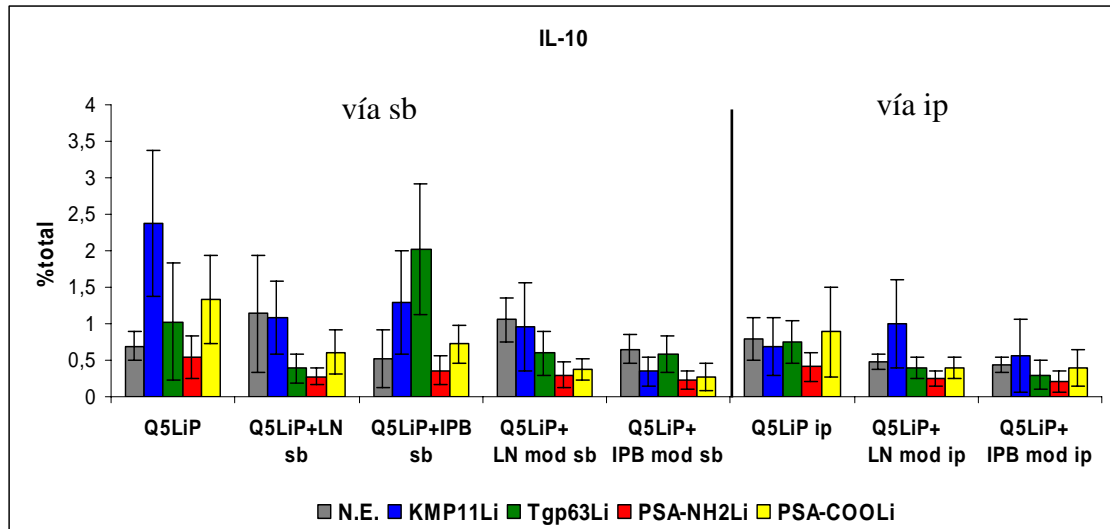


Figura 39. Porcentaje de células que expresan en su superficie la citosina IL-10, dentro de la población total de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP aislada y Q5LiP junto a diferentes oligonucleótidos, estimulados *in vitro* con las 4 proteínas de *Leishmania infantum* componentes de la molécula quimérica Q5LiP. sb- inoculación vía subcutánea e ip- inoculación vía intraperitoneal. Cada color indica la proteína con que se han estimulado las células. N.E. son las células sin estimular.

4.2.3. Determinación de la capacidad de inducir protección frente a la infección por *Leishmania infantum* de las moléculas Q5LiP y Q5LiP+IPB mod

Ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP+IPB mod vía intraperitoneal generan frente a los antígenos de *L. infantum* componentes de la molécula quimérica Q5LiP una respuesta humoral de IgG desbalanceada hacia el subtipo IgG2a. Asimismo, las células de bazo de los ratones inmunizados con dicha molécula quimérica en presencia del oligo IPB mod presentan, al ser estimulados con los antígenos componentes de la molécula quimérica Q5LiP, una significativa respuesta celular proliferativa con producción de IFN- γ y descenso en los niveles de IL-4 e IL-10. Bajo esta premisa nos planteamos si estas respuestas inmunológicas estarán asociadas con protección frente a la infección.

Con el fin de realizar tal estudio, ratones BALB/c de 7 semanas fueron inmunizados con las moléculas quiméricas Q5LiP aislada o en presencia del oligonucleótido IPB mod por vía intraperitoneal. Se llevaron a cabo 2 inmunizaciones separadas 3 semanas en grupos de 12 ratones. En la primera inmunización se inoculan 5 μg de la molécula quimérica Q5LiP y 100 μg de oligonucleótido IPB mod. En la segunda inmunización, la dosis de molécula quimérica inoculada es de 2 μg de Q5LiP y 100 μg del oligonucleótido IPB mod. Como grupo control se inocula un número igual de ratones con 100 μg del oligonucleótido IPB mod aislado y otro grupo con solución salina.

Pasadas 12 semanas de la segunda inmunización, llevamos a cabo la infección con formas promastigotes metacíclicos de *L. infantum* procedentes de un cultivo primario realizado a partir de formas amastigotes aisladas de bazo de un perro infectado (descrito en material y métodos). La infección en 9 ratones por grupo la realizamos por vía intravenosa, inoculando 10^4 parásitos/ratón en la cola del mismo.

El estudio de la presencia de parásitos en hígado, bazo y médula ósea, realizado 3, 6 y 25 semanas tras la infección (figura 40), muestra que únicamente los ratones control inoculados con el oligonucleótido IPB mod aislado y aquellos inoculados con solución salina, presentan un significativo número de parásitos en médula ósea a las 3 semanas post-infección (valores de \log_{10} de aproximadamente 3 y 2 respectivamente). En este tejido no se detectan parásitos en ningún grupo (problema o control) a las 6 semanas post-infección ni a las 25 semanas. De forma similar, únicamente los ratones de los grupos control (inoculados con el oligonucleótido aislado o con solución salina) presentan a las 3 semanas post-infección parásitos en tejido hepático con valores de \log_{10} de 4,5 y 4 respectivamente. Al igual que ocurre en médula ósea, no se detectaron parásitos en tejido hepático a las 6 y 25 semanas post-infección en ninguno de los grupos a estudio (control o problema).

La determinación de parásitos en bazo muestra que tanto los ratones inoculados con el oligonucleótido IPB mod aislado como los controles salinos, presentan un alto nivel de parásitos a las 3 semanas post-infección con valores de \log_{10} próximo a 4. La carga de parásitos en bazo se mantiene a las 6 y 25 semanas post-infección en el grupo de ratones inoculado con IPB mod y se incrementa a las 25 semanas en el grupo control inoculado con solución salina. En los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP

únicamente observamos parásitos, con carga moderada, a las 6 semanas post-infección y posteriormente se aclara. Interesantemente los ratones inmunizados con Q5LiP junto con el oligonucleótido IPB mod no presentan carga parasitaria en ningún momento analizado post-infección.

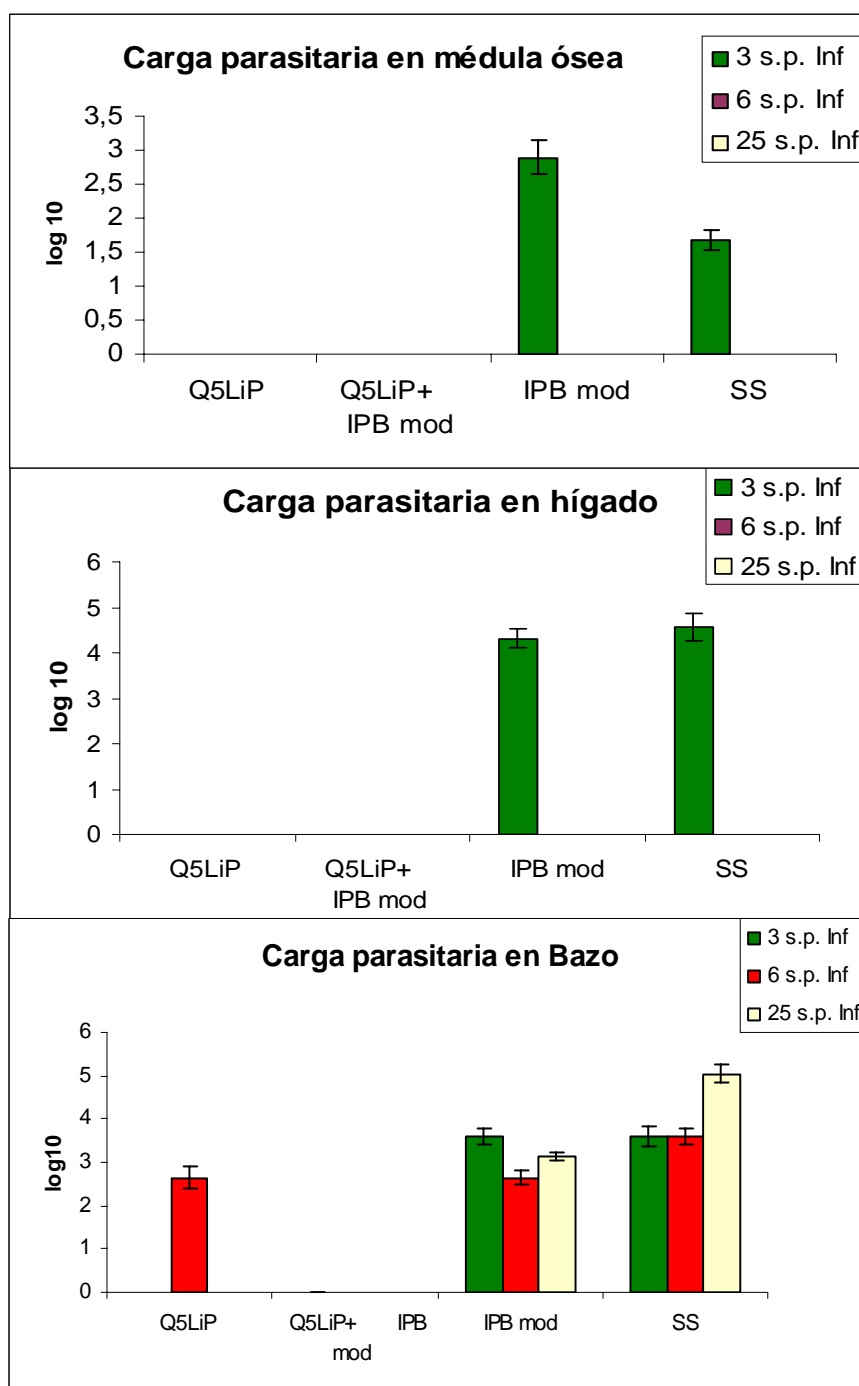


Figura 40. Carga parasitaria en bazo de ratones BALB/c inmunizados vía intraperitoneal con la molécula quimérica Q5LiP aislada o en presencia del oligonucleótido IPB mod e infectados con *L. infantum*. Los valores representan la media de los valores observados en dos ratones por grupo.

4.2.4. Respuesta humoral frente a los antígenos Tgp63Li, KMP11Li, PSA-COOLi y PSA-NH₂Li en ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y Q5LiP+IPB mod e infectados con *L. infantum*

Al objeto de correlacionar una determinada protección frente a la infección con *Leishmania* inducida por las moléculas a estudio y la respuesta inmunológica inducida por las mismas, determinamos la respuesta humoral generada frente a los 4 antígenos de *L. infantum* formadores de la molécula quimérica Q5LiP en los distintos grupos de ratones a ensayo. El nivel de anticuerpos es determinado 2 semanas y media, 5 semanas y media y 25 semanas tras la infección. En las 2 primeras determinaciones analizamos los sueros a dilución 1/200 y en la tercera lo hacemos a dilución 1/100. Los resultados mostrados en las figuras de 41 a 44, incluyen la respuesta humoral observada antes de la infección, 11 semanas post-segunda inmunización, con el fin de facilitar el análisis comparativo de la evolución post-infección de dicha respuesta inmunológica dependiendo del inmunógeno. Así observamos que frente al antígeno Tgp63Li, para ambos inmunógenos (Q5LiP aislada y Q5LiP junto a IPB mod), el nivel de anticuerpos IgG2a generado es significativamente superior a los de subtipo IgG1.

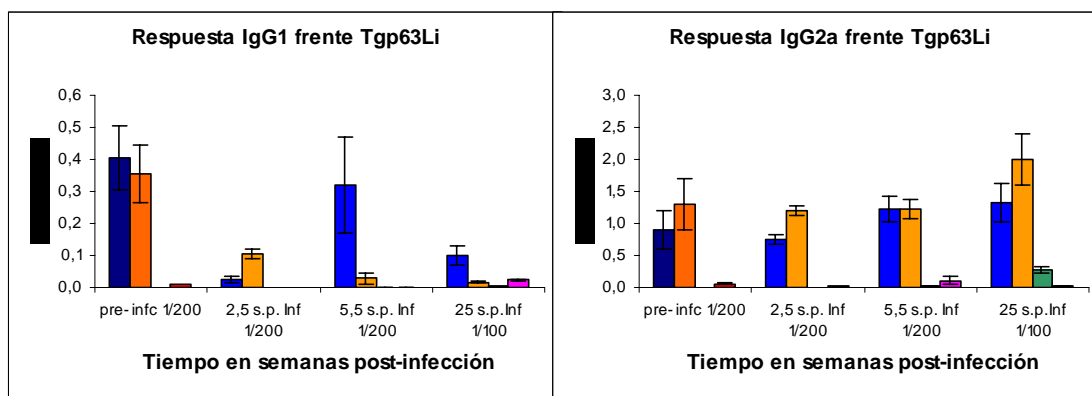


Figura 41. Respuesta humoral frente Tgp63Li. Evolución de la respuesta IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y Q5LiP+IPB mod tras la infección con *L. infantum*. El color azul corresponde a los ratones inmunizados con Q5LiP, el color naranja a los inmunizados con Q5LiP+IPB mod, el color verde a los inmunizados con IPB mod y el color rosa a los ratones salinos. Estos mismos colores en oscuro, corresponden a los valores previos a la infección.

Frente al antígeno KMP11Li la respuesta específica de anticuerpos post-infección está igualmente desbalanceada hacia el subtipo IgG2 tanto en el grupo de ratones inmunizado con la molécula quimérica Q5LiP como con Q5LiP+IPB mod. A las 25 semanas post-infección el nivel de anticuerpos IgG2a

anti-KMP11Li observado en los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP+IPB mod es algo mayor al mostrado por los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP aislada. El grupo de ratones inmunizados con IPB mod aislado presenta respuesta de anticuerpos IgG2a anti-KMP11Li con un valor de D.O. de 0,6 a las 25 semanas de la infección.

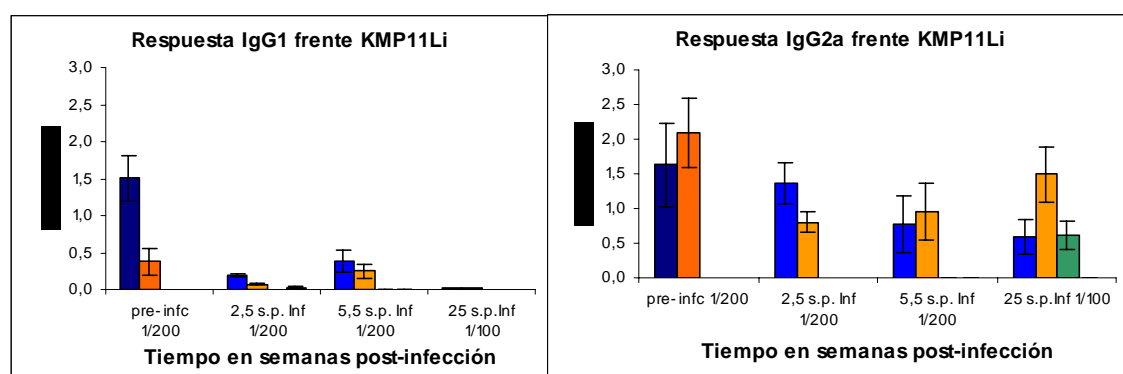


Figura 42. Respuesta humoral frente KMP11Li. Evolución de la respuesta IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y Q5LiP+IPB mod tras la infección con *L. infantum*. El color azul corresponde a los ratones inmunizados con Q5LiP, el color naranja a los inmunizados con Q5LiP+IPB mod, el color verde a los inmunizados con IPB mod y el color rosa a los ratones salinos. Estos mismos colores en oscuro, corresponden a los valores previos a la infección.

Frente al antígeno PSA-COOLi observamos a las 2 semanas y media post-infección, una significativa respuesta de anticuerpos en el grupo de ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP, mostrando una respuesta mixta de anticuerpos IgG1 e IgG2a. Sin embargo, en los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP+IPB mod, la respuesta es mayoritariamente de tipo Th1 con un claro desbalance de anticuerpos hacia el subtipo IgG2a, mostrando una respuesta con valores de D.O. de 1,5 a las 25 semanas post-infección, frente al valor inferior a 0,5 de IgG1.

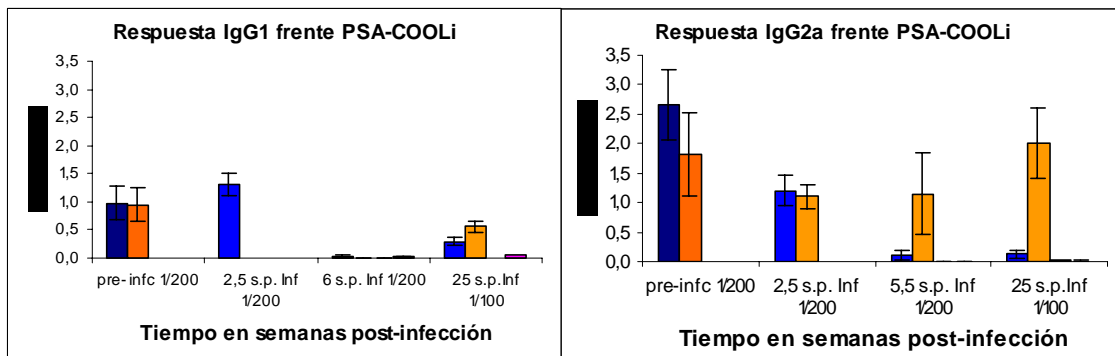


Figura 43. Respuesta humoral frente PSA-COOLi. Evolución de la respuesta IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y Q5LiP+IPB mod tras la infección con *L. infantum*. El color azul corresponde a los ratones inmunizados con Q5LiP, el color naranja a los inmunizados con Q5LiP+IPB mod, el color verde a los inmunizados con IPB mod y el color rosa a los ratones salinos. Estos mismos colores en oscuro, corresponden a los valores previos a la infección.

En cuanto al antígeno PSA-NH₂Li la respuesta de anticuerpos generada es igualmente mayoritaria de subtipo IgG2a, tanto en los ratones inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP aislada, como en aquellos inmunizados con Q5LiP y el oligonucleótido IPB mod. Los ratones inmunizados con Q5LiP+IPB mod presentan un claro incremento en la respuesta de anticuerpos. Así tras 2 semanas y media post-infección, observamos valores de D.O. cercanos a 1,5, incrementándose este valor a las 25 semanas post-infección. El grupo inmunizado con IPB mod aislado presenta anticuerpos anti-PSA-NH₂Li 5 semanas y media post-infección en el 50% de los ratones con valores de D.O. de 1. A las 25 semanas post-infección este valor de anticuerpos disminuye significativamente.

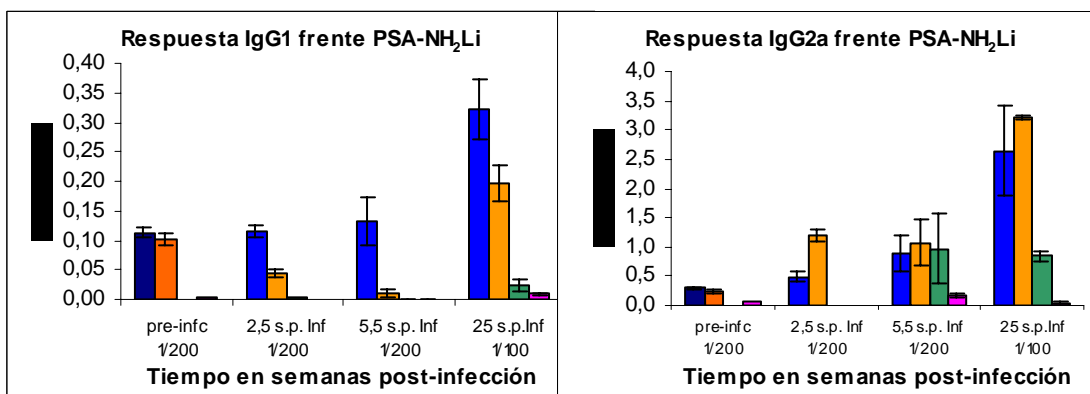


Figura 44. Respuesta humoral frente PSA-NH₂Li. Evolución de la respuesta IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados con la molécula quimérica Q5LiP y Q5LiP+IPB mod tras la infección con *L. infantum*. El color azul corresponde a los ratones inmunizados con Q5LiP, el color naranja a los inmunizados con Q5LiP+IPB mod, el color verde a los inmunizados con IPB mod y el color rosa a los ratones salinos. Estos mismos colores en oscuro, corresponden a los valores previos a la infección.

4.3. Ensayo de vacunación con la molécula quimérica de ADN que codifica los antígenos KMP11, Tgp63, PSA-NH₂ y PSA-COO de *Leishmania* (pQ4Li) y con dicha molécula fusionada al antígeno h70T, usado como adyuvante (pQ5Li)

4.3.1. Capacidad inmunogénica de las moléculas pQ4Li y pQ5Li.

Con el objetivo de determinar la capacidad inmunogénica y de inducir protección frente a la infección por *Leishmania*, de los vectores vacuna pCMV4-Q4Li (pQ4Li) y pCMV4-Q5Li (pQ5Li) (figura 45), llevamos a cabo ensayos de inoculación con cada uno de estos vectores (2 ensayos independientes) en un sistema de experimentación animal murino. pQ4Li contiene genes codificantes de 4 antígenos de *Leishmania infantum*: KMP11, PSA-NH₂, PSA-COO y Tgp63. pQ5Li contiene estos mismos genes más el gen que codifica el fragmento truncado de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi*-h70T. Como controles empleamos el vector sin ningún inserto y solución salina. Este ensayo se hace con 12 ratones hembras C57BL/6 de 6 semanas de edad, por grupo y 5 ratones C57BL/6-A2K^b, igualmente por cada grupo. Se inoculan 100 µg de plásmido por ratón en un volumen de 100 µl, vía intramuscular (en el músculo tibial anterior) Se inoculan un total de 4 dosis de 50 µg por pata, en intervalos de 2 semanas.

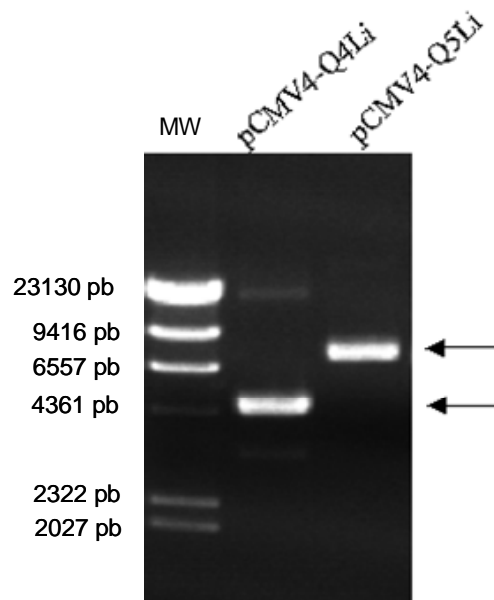


Figura 45. Visualización de los plásmidos pCMV4-Q4Li y pCMV4-Q5Li, linealizados mediante digestión con la enzima Hind III y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

4 semanas tras la cuarta inoculación, llevamos a cabo la infección con *Leishmania major*, para analizar el potencial nivel de protección generado frente a la infección por el parásito. Así mismo, post-infección determinamos la lesión en el punto de inoculación del parásito (oreja derecha e izquierda del animal) y carga parasitaria en dichos tejidos.

4.3.1.1. Respuesta humoral inducida por las moléculas de ADN pQ4Li y pQ5Li

La respuesta humoral generada por las moléculas a estudio, la analizamos mediante la técnica de ELISA determinando el nivel de anticuerpos (IgG1 e IgG2a) frente a cada una de las cuatro proteínas de *L. infantum* componentes de la quimera pQ4Li. Así, determinamos los anticuerpos generados a una dilución 1/100 de los sueros en tres puntos distintos post-inoculación: 1 semana tras la tercera inoculación y dos y cuatro semanas tras la cuarta inoculación.

En la primera medida, una semana tras la tercera inoculación, no se observa respuesta IgG1 en ningún caso (figura no mostrada), existiendo una escasa respuesta IgG2a (figura 46).

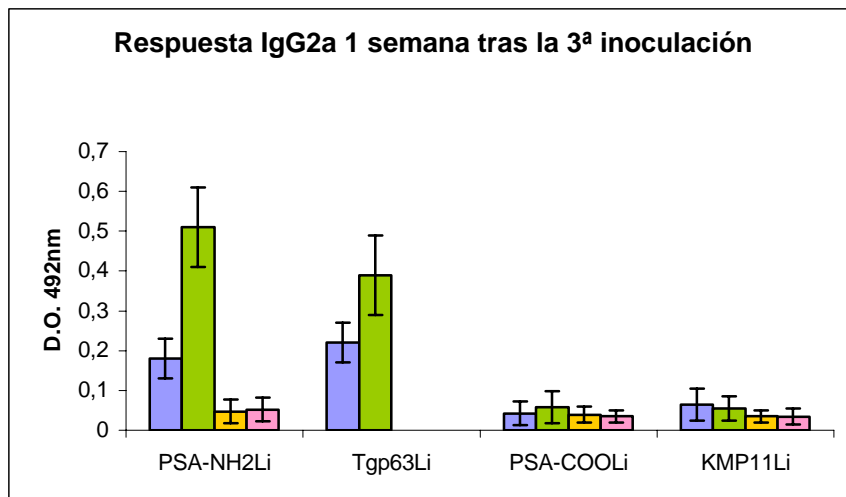


Figura 46. Nivel de anticuerpos IgG2a observados 1 semana tras la 3ª inoculación frente a cada una de las 4 proteínas de *L. infantum* componentes de la molécula pQ4Li. En azul se representan los valores obtenidos por los ratones inmunizados con pQ4Li, en verde los inmunizados con pQ5Li, naranja los inoculados con pCMV4 y en rosa los ratones salinos. Los valores indicados en la figura se corresponden con la media de los valores obtenidos en los ratones respondedores.

Responden el 17% de los ratones inmunizados con pQ4Li frente a PSA-NH₂Li con valor medio de D.O. de 0,18 y el 33% frente Tgp63Li con valor medio de D.O. de 0,22. El 30% de los ratones del grupo inmunizado con pQ5Li responden frente PSA-NH₂Li con valor medio de D.O. de 0,51 y con valor de D.O. de 0,39 frente Tgp63Li. Los ratones inoculados con pCMV4 y los salinos, no responden frente a ninguna de las proteínas recombinantes ensayadas.

Dos semanas tras la cuarta inoculación responde el 25% de los ratones inmunizados con pQ4Li frente PSA-NH₂Li observándose un valor medio de D.O. de 0,2. Así mismo, responden el 33% frente Tgp63Li con valor medio de 0.3 y el 50% frente PSA-COOLi con valor medio de 0,23. Todos los ratones inmunizados con pQ5Li responden frente PSA-NH₂Li y Tgp63Li con valores medios de 0,5 y 0,27 respectivamente. Toda esta respuesta es de subtipo IgG2a. Anticuerpos IgG1 únicamente se produce en el 25% de los ratones inmunizados con pQ5Li, frente PSA-NH₂Li y Tgp63Li con valores de 0,12 y 0,26 respectivamente (figura 47).

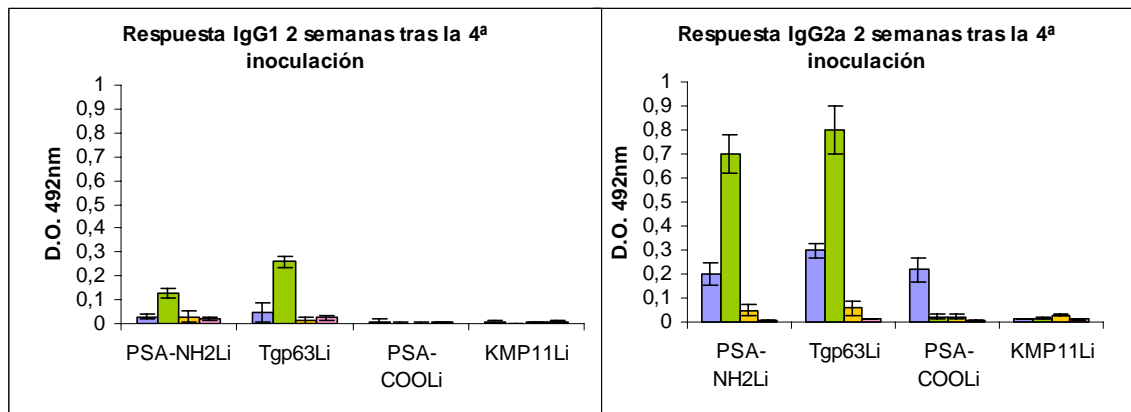


Figura 47. Respuesta humoral 2 semanas tras la 4^a inoculación frente a cada una de las 4 proteínas de *L. infantum* componentes de la molécula pQ4Li. En azul se representan los valores obtenidos por los ratones inmunizados con pQ4Li, en verde los inmunizados con pQ5Li, naranja los inoculados con pCMV4 y en rosa los ratones salinos. Los valores indicados en la figura se corresponden con la media de los valores obtenidos en los ratones respondedores.

Respecto a la respuesta IgG2a, observamos (figura 48) en cuatro semanas tras la cuarta inoculación, el 25% de los ratones inmunizados con pQ4Li responde frente PSA-NH₂Li con un valor medio de D.O. de 0,27; el 33% responde frente a Tgp63Li con valor medio de D.O. de 0,28 y el 8,5% responde frente PSA-COOLi con un valor medio de D.O. de 0,16. Los ratones inmunizados con pQ5Li responden el 100% frente PSA-NH₂Li y Tgp63Li con

valores de D.O. de 0,54 y 0,3 respectivamente. La respuesta IgG1 solamente se detecta en ratones inmunizados con pQ5Li, frente PSA-NH₂Li en el 25% de los ratones con un valor medio de D.O. de 0,14 y en un 25% frente Tgp63Li, con valor medio de D.O. de 0,12. Los ratones inoculados con pCMV4 y salinos no presentan en ningún caso respuesta de anticuerpos frente a los antígenos componentes de la molécula pQ4Li.

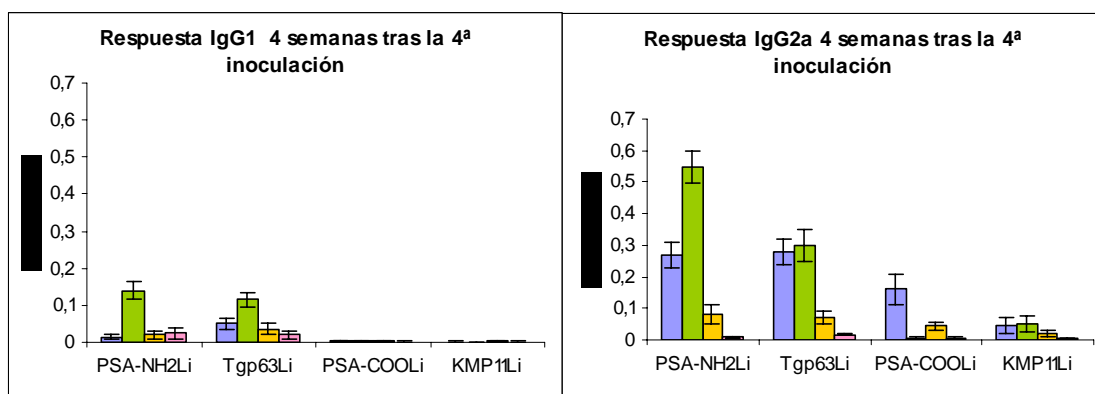


Figura 48. Respuesta humoral 4 semanas tras la 4ª inoculación frente a cada una de las 4 proteínas de *L. infantum* componentes de la molécula pQ4Li. En azul se representan los valores obtenidos por los ratones inmunizados con pQ4Li, en verde los inmunizados con pQ5Li, naranja los inoculados con pCMV4 y en rosa los ratones salinos. Los valores indicados en la figura se corresponden con la media de los valores obtenidos en los ratones respondedores.

4.3.1.2. Respuesta celular inducida por las moléculas de ADN pQ4Li y pQ5Li

Para determinar la respuesta celular derivada de las inoculaciones de las distintas vacunas de ADN a ensayo, llevamos a cabo la determinación de la capacidad de proliferación de los esplenocitos de los ratones inoculados, al ser estimuladas *in vitro* con las proteínas KMP11Li, Tgp63Li, PSA-NH₂Li y PSA-COOLi. Así mismo, determinamos la respuesta de citocinas liberadas al sobrenadante por parte de estas células procedentes de los ratones inmunizados y estimuladas *in vitro* con las mencionadas 4 proteínas y con la quimera Q4LiP. La inducción de linfocitos T citotóxicos antígeno-específicos, es analizada en ratones C57BL/6-A2K^b igualmente inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio y controles.

4.3.1.2.1. Determinación de la capacidad proliferativa antígeno-específica de los esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a ensayo

Para observar el efecto de la capacidad inmunogénica celular, de las moléculas a estudio, llevamos a cabo un ensayo de proliferación celular tal y como se explica en material y métodos. Realizamos este ensayo 4 semanas tras la cuarta inoculación. Los bazo se extraen en esterilidad y se procesan también en esterilidad. Los esplenocitos de 2 ratones por grupo son estimulados con cada una de las proteínas de *L. infantum* componentes de la proteína quimérica Q4LiP (KMP11Li, Tgp63Li, PSA-COOLi y PSA-NH₂Li) y con dicha proteína quimérica Q4LiP. La estimulación se hace a distintas concentraciones de proteína para determinar si la proliferación celular es dosis dependiente. También estimulamos células con un mitógeno (CoA) como control positivo y células sin estimular como control de proliferación espontánea. Se estimulan *in vitro* durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂ y la proliferación celular se mide mediante marcaje con timidina tritiada del ADN de nueva síntesis.

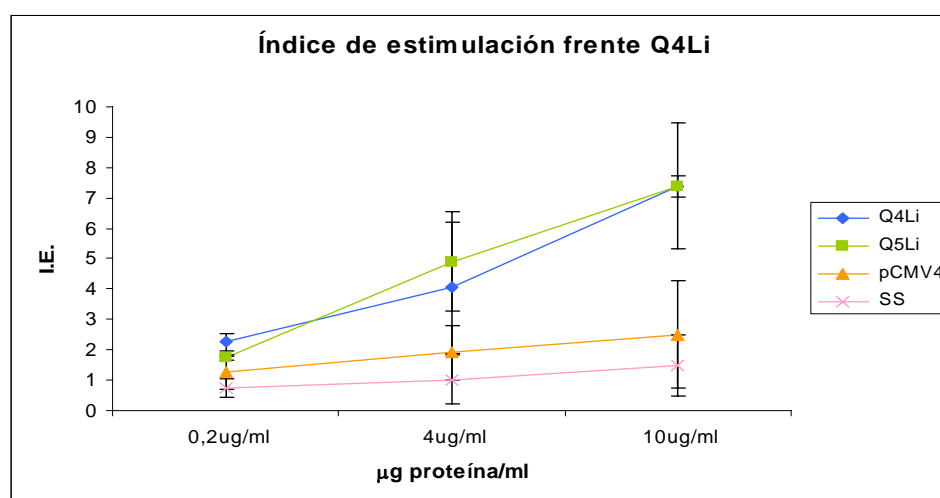


Figura 49. Índices de proliferación celular de esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas a estudio, tras la estimulación *in vitro* con la proteína quimérica Q4LiP a concentraciones de 0,2; 4 y 10 µg de proteína/ml.

Como se muestra en la figura 48, los ratones inmunizados con las moléculas pQ4Li y pQ5Li, presentan respuesta proliferativa frente a la proteína quimérica Q4LiP, siendo esta dosis dependiente. A 10 µg/ml, los ratones inmunizados con pQ4Li tienen un índice de estimulación de 7,3 y los inmunizados con pQ5Li, tienen un índice de estimulación cercano a 8. En cuanto a los ratones inoculados con pCMV4 o con solución salina, presentan un índice de estimulación basal con valor inferior a 2.

Al utilizar el antígeno PSA-NH₂Li como molécula estimuladora se observa igualmente un alto índice de estimulación en los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li (figura 50), con índices de estimulación que se incrementan con el aumento de concentración de antígeno. Así se obtienen índices de 9 y 10 respectivamente al ser estimulados con 10 µg de proteína/ml. Los ratones inoculados con pCMV4 o solución salina tienen un índice de estimulación basal con valores máximos de aproximadamente 2.

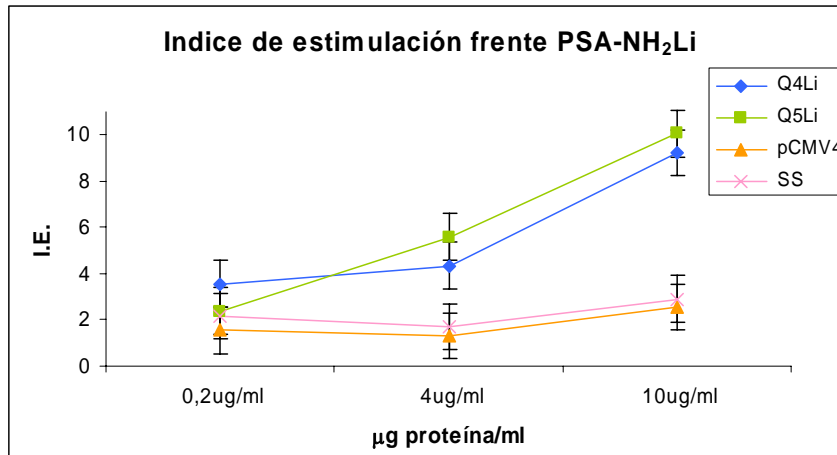


Figura 50. Índices de proliferación celular de esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas a estudio, tras la estimulación *in vitro* con la proteína PSA-NH₂Li a concentraciones de 0,2; 4 y 10 µg de proteína/ml.

Al usar el antígeno Tgp63Li como molécula estimuladora, el índice de estimulación observado con 4 µg de proteína/ml, presenta un valor cercano a 3,5 en los ratones inmunizados con pQ4Li y de aproximadamente 3 en ratones inmunizados con pQ5Li (Fig 51).

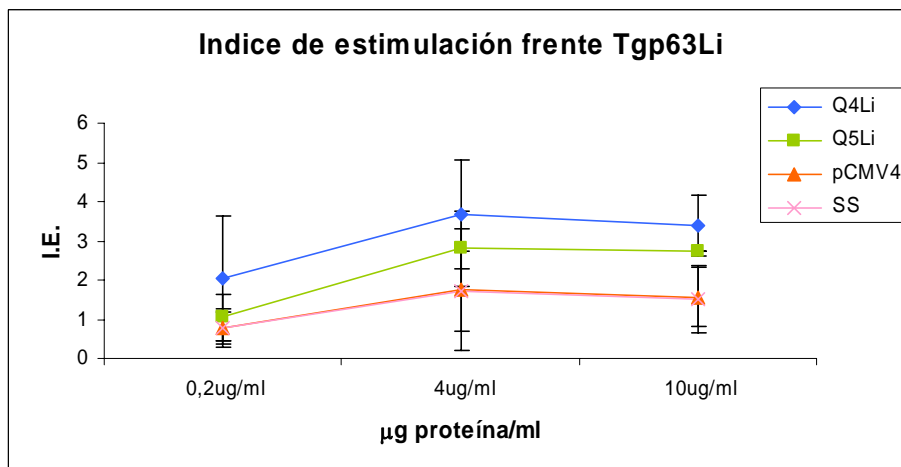


Figura 51. Índices de proliferación celular de esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas a estudio, tras la estimulación *in vitro* con la proteína Tgp63Li a concentraciones de 0,2; 4 y 10 µg de proteína/ml.

El incremento de la concentración de proteína a 10 µg/ml, produce tanto en ratones inmunizados con pQ4Li como pQ5Li, un índice de estimulación levemente inferior al anteriormente descrito. Los ratones inoculados con pCMV4 y salinos tienen valores basales muy similares en los 3 puntos de concentración, de aproximadamente 1.

Al emplear los antígenos PSA-COOLi Y KMP11Li como moléculas estimuladoras *in vitro* de los esplenocitos de los ratones inoculados con pQ4Li, pQ5Li y los ratones control inoculados con el vector pCMV4 vacío o solución salina, no se observa proliferación celular a ninguna concentración ensayada de proteínas.

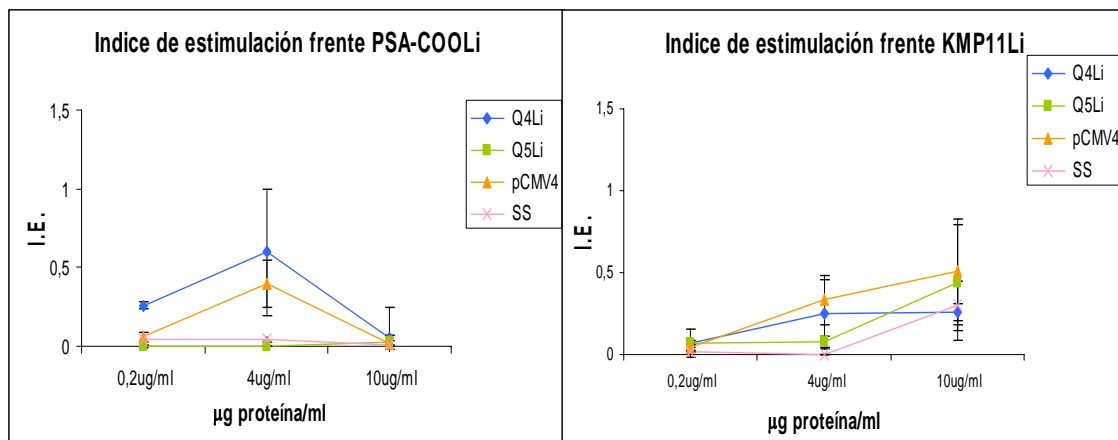


Figura 52. Índices de proliferación celular de esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas a estudio, tras la estimulación *in vitro* con las proteínas PSA-COOLi y KMP11Li a concentraciones de 0,2; 4 y 10 µg de proteína/ml.

4.3.1.2.2. Producción de citocinas por esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas pQ4Li y pQ5Li y estimuladas con las proteínas correspondientes a los antígenos de *Leishmania* componentes de las mismas

4 semanas tras la cuarta inoculación, determinamos la producción de las citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-5, IL-4 e IL-2 en esplenocitos de los ratones inmunizados y estimulados *in vitro* con los 4 antígenos componentes de la molécula quimérica Q4Li: KMP11Li, Tgp63Li, PSA-NH₂Li y PSA-COOLi. Los esplenocitos se estimulan con 4 µg /ml con cada uno de los antígenos correspondientes, durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras la estimulación con las distintas proteínas se procede a la medida de las citocinas mediante el Kit CBA Th1/Th2 de ratón (Becton-Dickinson).

Los resultados obtenidos evidencian que la mayor secreción producida es de TNF- α , tanto en las células de los ratones inmunizados con pQ4Li como pQ5Li y tras ser estimuladas con las proteínas PSA-NH₂Li y Tgp63Li (Fig 53). Esta respuesta es algo superior en los ratones inmunizados con pQ4Li con valores de 2500 y 2000 pg/ml, respectivamente. Para las células de ambos grupos de ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li y estimulados con KMP11Li y PSA-COOLi, el nivel de secreción de TNF- α es significativamente menor, con valores inferiores a 100 pg/ml respectivamente (Fig 53).

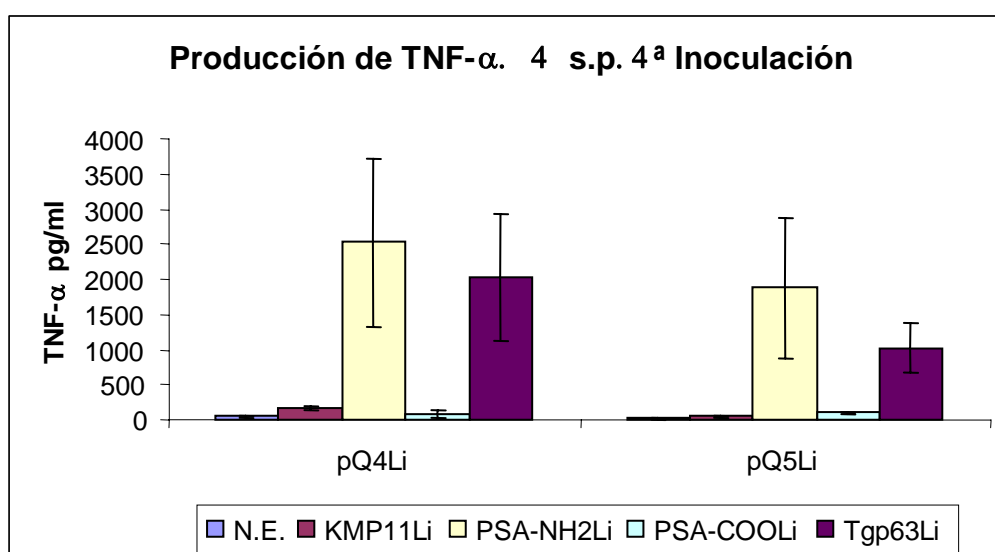


Figura 53. Secreción de TNF- α en esplenocitos estimulados con las proteínas correspondientes a los antígenos componentes de la proteína quimérica Q4LiP. En todos los casos se estimulan con 4 μ g/ml de las distintas proteínas.

La secreción de IFN- γ es mayor en las células de los ratones inmunizados con pQ4Li y estimulados *in vitro* con PSA-NH₂Li y Tgp63Li, con valores de 540 y 340 pg/ml respectivamente (fig. 54). En los esplenocitos estimulados con la proteína PSA-COOLi, se observan 1 valores de IFN- γ de 15 μ g/ml, similares a los observados en las células sin estimular (Fig 54). En el caso de ratones inmunizados con pQ5Li, observamos un valor de IFN- γ de 100 pg/ml al estimular con PSA-NH₂Li y de 45 pg/ml al estimular con Tgp63Li. Para las células estimuladas con el resto de las proteínas los valores de IFN- γ secretados son muy inferiores a los anteriormente mencionados y similares a los obtenidos en las células sin estimular.

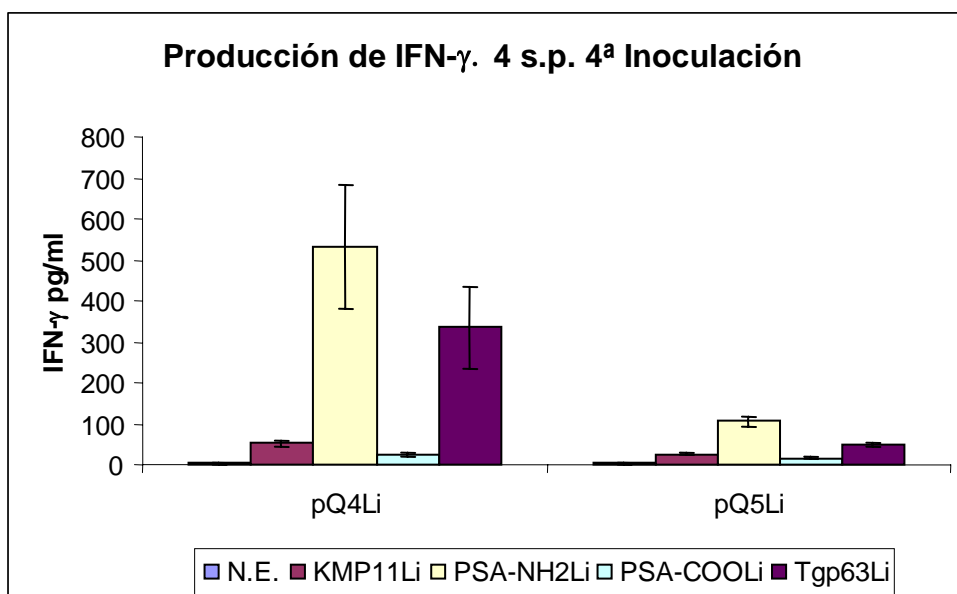


Figura 54. Producción de IFN- γ al estimular los esplenocitos con KMP11Li, PSA-NH₂Li, Tgp63Li y PSA-COOLi. Estimulo con 4 μ g/ml.

Por otra parte, las células de bazo de los ratones inmunizados con las moléculas pQ4Li y pQ5Li y estimuladas con las distintas proteínas correspondientes a los antígenos de *Leishmania* componentes de las mismas, no muestran un aumento en el nivel de citocinas IL-5, IL-4 e IL-2 secretadas, relativo al detectado en esplenocitos no estimulados (figura no mostrada).

Las células de los ratones inoculados con el vector vacío o solución salina no muestran una significativa producción de las citocinas analizadas, TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4 e IL-2, tanto en células no estimuladas como tras la estimulación con los distintos antígenos a estudio.

4.3.1.2.3. Inducción de linfocitos T citotóxicos (CTLs) antígeno específicos

Al objeto de determinar si los vectores vacuna a estudio son capaces de generar activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos de antígeno, se realizan ensayos de lisis celular usando para ello ratones C57BL/6-A2K^b inmunizados con las moléculas pQ4Li y pQ5Li siguiendo el mismo esquema de inmunización que el anteriormente mencionado para los ratones C57BL/6. Así mismo se inoculan ratones con el vector vacío y con solución salina. La utilización de estos ratones transgénicos (C57BL/6-A2K^b) está justificada en el hecho de que los mismos son portadores de una molécula de presentación de

clase I quimérica, con las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ humanas y el resto murino tal como se ha detallado en anteriores apartados.

Tras 4 semanas de la última inoculación (cuarta), se extraen los bazo en esterilidad y obtenemos los esplenocitos por su posterior homogeneización. Se realizaron un total de tres estimulaciones *in vitro*, con células presentadoras, células Jurkat-A2K^b, 60 horas post-transfección con el gen de fusión codificante de la molécula Q4LiP clonada en el vector de transfección pCMV4 y tratadas con mitomicina.

Tras las mencionadas estimulaciones *in vitro* se realizó un ensayo clásico de liberación de cromo utilizando como células diana células Jurkat-A2K^b y p815, transfectadas con el gen de fusión codificante de la molécula quimérica Q4Li y marcadas con ⁵¹Cr. Como células efectoras usamos la población esplénica de ratones inmunizados con 4 dosis de los vectores vacuna pQ4Li y pQ5Li y estimuladas con las mencionadas células presentadoras y tal como se ha descrito en el párrafo anterior.

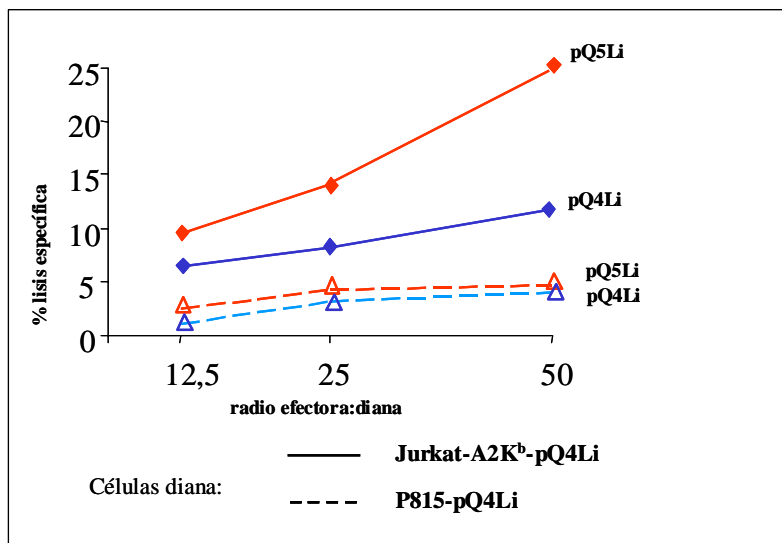


Figura 55. Inducción de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno en ratones inmunizados con las moléculas pQ4Li y pQ5Li. Los valores obtenidos se miden como % de lisis de las células diana a distintas concentraciones de células efectoras:diana. La raya continua corresponde al porcentaje de lisis de los esplenocitos enfrentados a células Jurkat-A2K^b transfectadas con pQ4Li y las rayas punteadas corresponden al porcentaje de lisis de los esplenocitos enfrentados con células p815 transfectadas con pQ4Li.

Los resultados obtenidos (Fig 55) muestran que los ratones del grupo inmunizado con pQ5Li presenta un significativo índice de lisis con valores cercanos al 25% al enfrentarlo a células Jurkat-A2K^b transfectadas con pQ4Li, en la relación de células efectoras:células diana (E:D) de 50:1. Al incubar estas

células efectoras con células diana p815 transfectadas con pQ4Li, el porcentaje de lisis es del 4%. Las células de los ratones inmunizados con pQ4Li presentan un porcentaje de lisis de aproximadamente el 10% frente a células Jurkat-A2K^b transfectadas con pQ4Li (proporción E:D de 50:1) y del 2% frente a células p815 igualmente transfectadas con pQ4Li. Las células de los ratones del grupo control inoculados con solución salina o con el vector vacío pCMV4, presentan porcentajes basales de lisis similares a los de la lisis espontánea.

4.4. Determinación de la capacidad de inducir protección frente a la infección con *Leishmania major* de las moléculas de ADN pQ4Li y pQ5Li

Cuatro semanas tras la cuarta inoculación se lleva a cabo la infección con *L. major* en 8 ratones por grupo. La infección se realiza subdérmica en las 2 orejas del ratón, inoculando 500 parásitos por oreja en un volumen de 15 μ l (1000 parásitos por ratón). Se inoculan parásitos en el estadio de promastigote metacíclico de *L. major*, que es el estadio infeccioso, obtenidos por selección negativa usando aglutinina PHA que se une específicamente a las formas no metacíclicas.

4.4.1. Determinación de las lesiones en orejas en los ratones infectados con *L. major*

Al objeto de estudiar la capacidad de inducir protección frente a la infección con *L. major* por las moléculas a estudio, analizamos el daño tisular en la zona de inoculación del parásito realizando observaciones semanales y medidas, en su caso, de las lesiones y evolución de las mismas.

Los resultados obtenidos (mostrados en la figura 56) evidencian que las lesiones comienzan a ser aparentes hacia las 4 o 5 semanas tras la infección, siendo estas de diferente grado dependiendo del grupo de ratones analizado. En los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li se observa el mayor daño a las 6 semanas post-infección con valores entre 1 y 1,8 mm. A partir de las 6 semanas el daño comienza a disminuir hasta desaparecer completamente a las 11 semanas post-infección en el caso de los ratones inmunizados con pQ5Li y mantenerse con valores de aproximadamente 0,3 mm, en los ratones inoculados con pQ4Li.

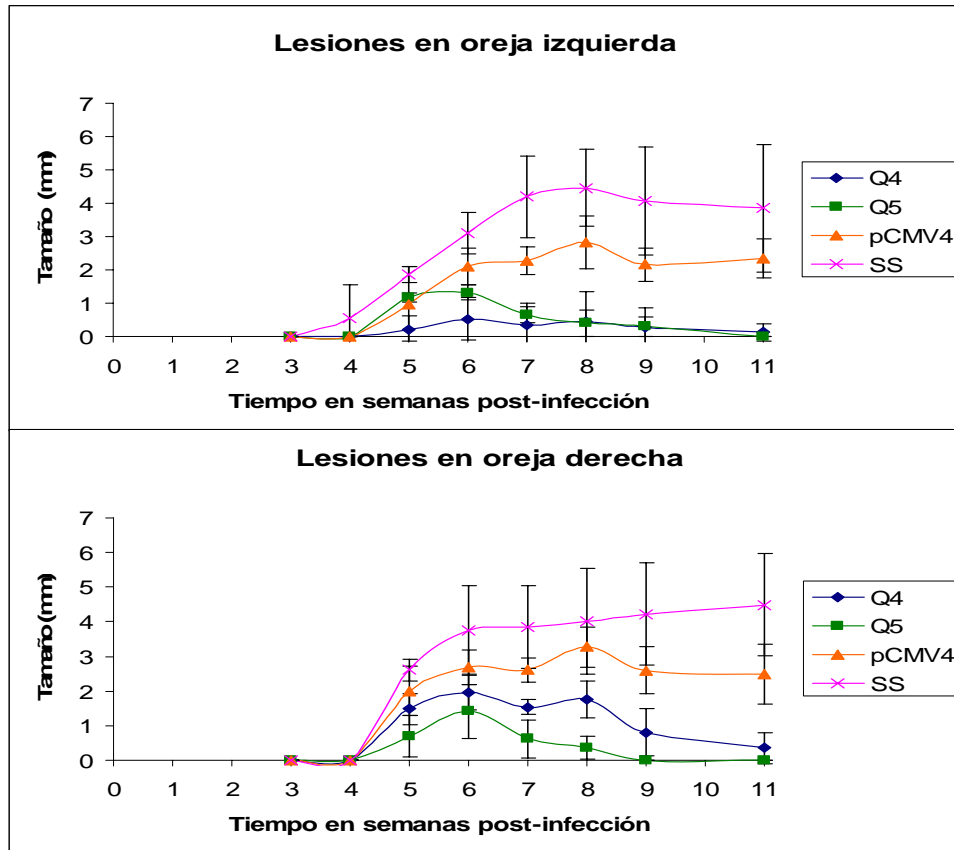
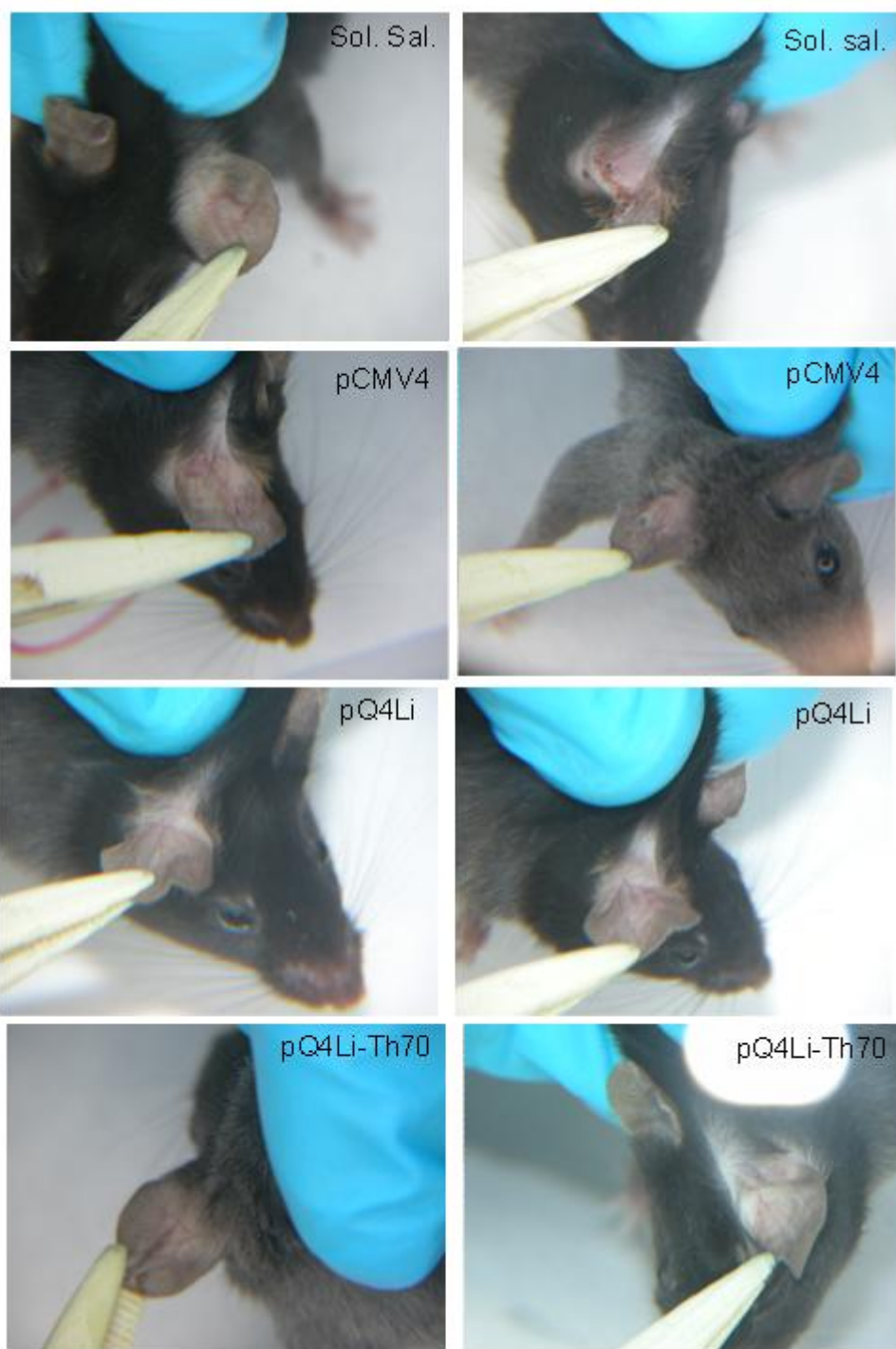


Figura 56. Tamaño de las lesiones en las orejas de los ratones infectados con *L. major*. Se representa el tamaño de la lesión en mm respecto al tiempo en semanas pasadas tras la infección. A la derecha de cada panel (oreja izquierda y oreja derecha), se indica la molécula con que se han inmunizado los ratones.

En los ratones inoculados con pCMV4 y ratones inoculados con solución salina, las lesiones adquieren tamaños significativamente mayores con valores de 3 a 4 mm de diámetro de la lesión a las 6-7 semanas post-infección y manteniéndose estos con valores similares a las 11 semanas post-infección. El 75% de los ratones inoculados con solución salina y el 50% de aquellos inoculados con el vector vacío muestran lesiones ulcerativas que en ningún caso se observan en los ratones inmunizados con los plásmidos recombinantes pQ4Li y pQ5Li.

En la figura 57 mostramos unas fotos representativas de los daños observados en cada grupo de ratones a las 6 y 11 semanas post-infección, respectivamente.



6 semanas post-infección

11 semanas post-infección

Figura 57. Fotografías de las lesiones producidas a las 6 y 11 semanas post-infección en las orejas de los ratones control inoculados con pCMV4 o solución salina y los ratones inoculados con pQ4Li y pQ5Li.

4.4.2. Determinación de la carga parasitaria en las orejas de los ratones infectados con *L. major*

9 semanas post-infección realizamos el análisis de carga parasitaria en el tejido inoculado en 5 ratones por grupo, tomando ambas orejas y homogeneizándolas en esterilidad en medio Schneider. Seguidamente hacemos dilución 1/3 del homogeneizado y se cultiva cada uno de ellos por triplicado durante 7 días a 26°C. Pasado este tiempo se determina el valor de carga parasitaria siguiendo el modelo de dilución límite descrito por Buffet y col. 1995. La determinación de la carga se realiza en ratones individuales y se representa como la media más/menos la desviación estandar obtenida en los triplicados (Fig 58)

Los resultados obtenidos muestran que los ratones inmunizados con las moléculas pQ4Li y pQ5Li, presentan una carga de parásitos significativamente inferior a los ratones control inoculados con el vector vacío o solución salina. En los ratones inmunizados con pQ4Li, encontramos 2 ratones de reducida carga parasitaria y en el caso de aquellos inmunizados con pQ5Li observamos 4 de 5 ratones que presentan reducción de carga parasitaria, en ambos casos relativa a los ratones control inoculados con solución salina o pCMV4.

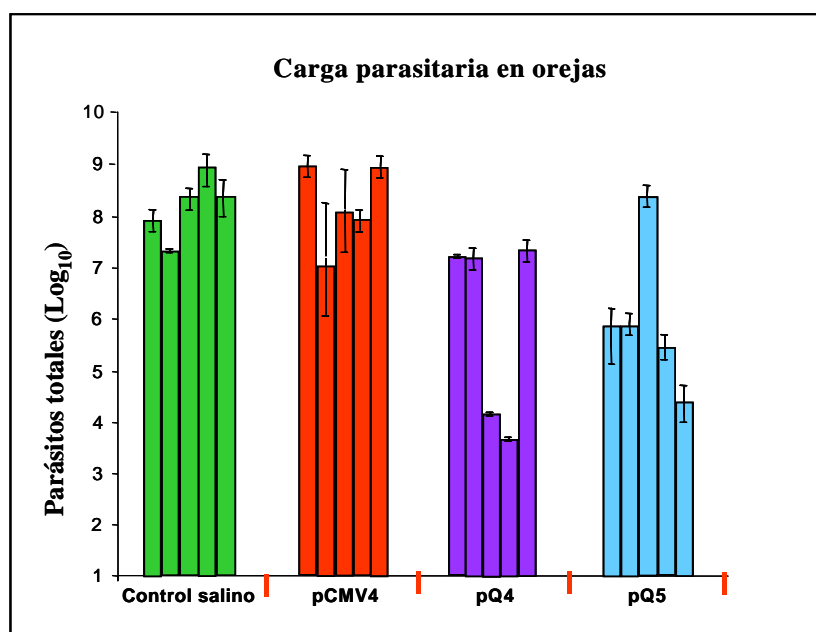


Figura 58. Carga parasitaria en tejido infectado (orejas) de los ratones inmunizados con las moléculas pQ4Li y pQ5Li e infectados con *L. major*. La determinación del nivel de parásitos se realiza en un solo homogeneizado de ambas orejas. Los valores corresponden a los observados 9 semanas post-infección y están representados en escala logarítmica como la media +/- la desviación estandar obtenida en los triplicados analizados para cada ratón.

4.4.3. Respuesta humoral en ratones inoculados con las moléculas a estudio e infectados con *Leishmania major*

Al objeto de poder asociar una determinada respuesta inmunológica con la potencial protección inducida frente a la infección por *L. major* en los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li, procedimos a estudiar en los ratones de los distintos grupos a ensayo, el nivel de anticuerpos existente frente a los antígenos KMP11Li, PSA-NH₂Li, PSA-COOLi y Tgp63Li, componentes de la molécula quimera. La determinación de anticuerpos se realiza mediante la técnica de ELISA a las 2, 11 y 16 semanas de la infección, en suero de los distintos ratones y a dilución 1/100 de dichos sueros.

Los resultados obtenidos muestran (figura 59) que frente PSA-NH₂Li, la respuesta es exclusivamente de subtipo IgG2a. Así, a las 2 semanas de la infección, responde el 25% de los ratones inmunizados con la molécula pQ4Li, con un valor de D.O. de 0,7, lo que representa un incremento del nivel de anticuerpos relativo al que presentaban estos ratones antes de la infección (valor de D.O. 0,27), detectándose en este caso igual porcentaje de ratones respondedores al observado pre-infección. El 50% de los ratones inmunizados con pQ5Li presentan anticuerpos anti PSA-NH₂Li con valores de D.O. de 0,38, nivel de anticuerpos similar al observado previamente a la infección (D.O. de 0,54), si bien, previamente a la infección respondía el 100% de los ratones. Los ratones inoculados con pCMV4 presentan respuesta con valor de D.O. de 0.26 en el 75% de los ratones. Estos ratones no presentaban respuesta de anticuerpos anti PSA-NH₂Li antes de la infección. Los ratones salinos no presentan respuesta. A las 11 semanas de la infección, los ratones inmunizados con pQ4Li, mantienen valores similares de anticuerpos, tanto en porcentaje de ratones respondedores como del nivel de anticuerpos detectado. Los ratones inmunizados con pQ5Li aumentan a 100% el porcentaje de ratones que responde y muestran un similar valor de anticuerpos con valores de D.O. de aproximadamente 0,3. También responde el 100% de los ratones inoculados con pCMV4. Los ratones inoculados con solución salina siguen sin responder. A las 16 semanas post-infección el nivel de anticuerpos detectados frente al antígeno PSA-NH₂Li, disminuye en todos los grupos de ratones analizados.

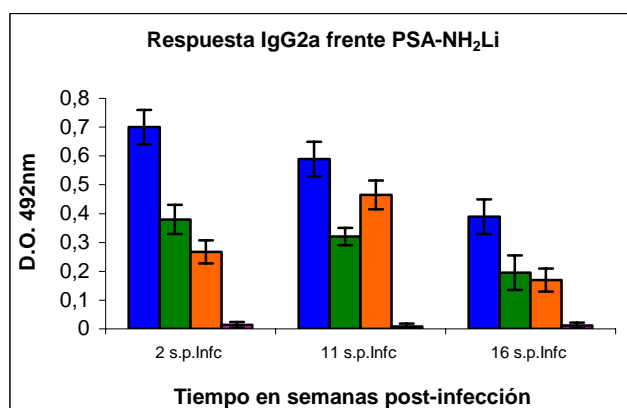


Figura 59. Respuesta humoral inducida frente al antígeno PSA-NH₂Li a distintos tiempos tras la infección. Respuesta IgG2a en distintos tiempos y a dilución 1/100 de los sueros. En azul se representan los valores obtenidos por los ratones inoculados con pQ4Li, en verde los de los ratones inoculados con pQ5Li, en naranja aquellos inoculados con pCMV4 y en rosa los ratones salinos.

La respuesta de anticuerpos frente al antígeno Tgp63Li, es igualmente de subtipo IgG2a y únicamente presente en los ratones inmunizados con la molécula pQ4Li. Así observamos que 2 semanas post-infección, presenta respuesta de anticuerpos el 25% de los ratones inmunizados con dicha molécula frente al 33% de respondedores previo a la infección, con valor de D.O. de 0,29, valor de densidad óptica similar al observado antes de la infección. A las 11 semanas de la infección, los ratones inmunizados con pQ4Li mantienen el porcentaje y el índice de respuesta y el resto de grupos de ratones siguen sin respuesta.

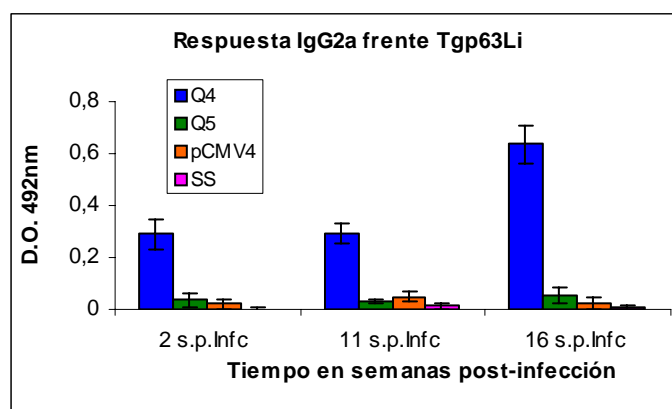


Figura 60. Respuesta humoral inducida frente al antígeno Tgp63Li a distintos tiempos tras la infección. Respuesta IgG2a en distintos tiempos y a dilución 1/100 de los sueros. En azul se representan los valores obtenidos por los ratones inoculados con pQ4Li, en verde los de los ratones inoculados con pQ5Li, en naranja aquellos inoculados con pCMV4 y en rosa los ratones salinos.

A las 16 semanas de la infección, se observa un ligero aumento en el nivel de anticuerpos anti-Tgp63 en los ratones inmunizados con pQ4Li mostrando valor de D.O. de 0,63, si bien se mantiene parecido porcentaje de respondedores (25%). Los ratones inmunizados con la molécula pQ5Li, así como aquellos inoculados con el vector vacío o solución salina, no presentan respuesta de anticuerpos frente al antígeno Tgp63 en ninguno de los puntos determinados post-infección (Fig 60).

Frente al antígeno PSA-COOLi únicamente hay respuesta de anticuerpos, subtipo IgG2a, 16 semanas tras la infección, con valor de D.O. en torno a 0,1 tanto en los ratones inmunizados con pQ4Li como en los inoculados con pCMV4. En ningún caso se observa respuesta de anticuerpos de isotipo IgG1. Igualmente frente al antígeno KMP11Li no hay respuesta de anticuerpos detectable (IgG1 e IgG2a) en ningún momento post-infección, ni en ningún grupo de ratones a ensayo (figura no mostrada)

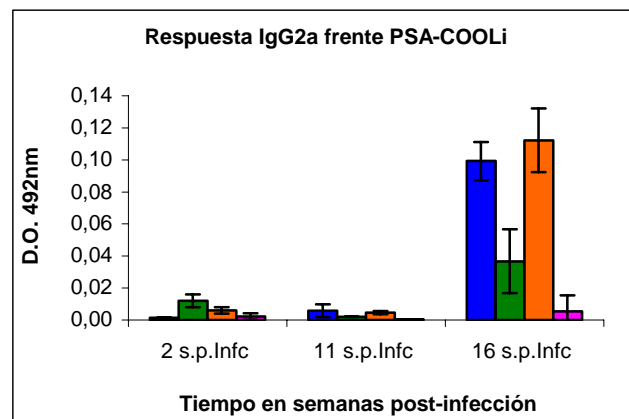


Figura 61. Respuesta humoral inducida frente al antígeno PSA-COOLi a distintos tiempos post-infección. Respuesta IgG2a en distintos tiempos y a dilución 1/100 de los sueros. En azul se representan los valores obtenidos por los ratones inoculados con pQ4Li, en verde los de los ratones inoculados con pQ5Li, en naranja aquellos inoculados con pCMV4 y en rosa los ratones salinos.

4.4.4. Producción de citocinas por esplenocitos de ratones inoculados con las moléculas a estudio e infectados con *L. major*

Realizamos dos determinaciones de las citocinas liberadas al sobrenadante de esplenocitos de ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li, 9 y 16 semanas tras la infección con *L. major*. Las células esplénicas son estimuladas con las 4 proteínas componentes de la molécula quimerica Q4Li (9 semanas post-infección), o con dicha proteína quimerica Q4LiP (16 semanas

post-infección). Las células se incuban *in vitro* con las mencionadas proteínas durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂ y se determina el nivel secretado de las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-5 mediante el kit CBA Th1/Th2 de ratón (Becton-Dickinson).

Los resultados obtenidos mostrados en la figura 62, evidencian que 9 semanas tras la infección con *L. major* la producción de TNF- α en las células de los ratones inmunizados con pQ4Li, pQ5Li y pCMV4, muestran una respuesta muy similar. Así, al estimular las células con los antígenos PSA-NH₂Li, Tgp63Li y PSA-COOLi, presentan valores en torno a 900, 500 y 300 pg/ml respectivamente. Las células estimuladas con KMP11Li y aquellas no estimuladas, presentan valores muy inferiores, entre 10 y 30 pg/ml. Los ratones salinos infectados con *L. major* y estimulados con PSA-NH₂Li, Tgp63Li y PSA-COOLi presentan los mayores niveles de producción de citocinas con valores de 1800, 1200 y 725 pg/ml, respectivamente. Al estimular con la proteína KMP11Li se detecta un valor de 25 pg/ml de TNF- α , similar al observado en aquellas células no estimuladas.

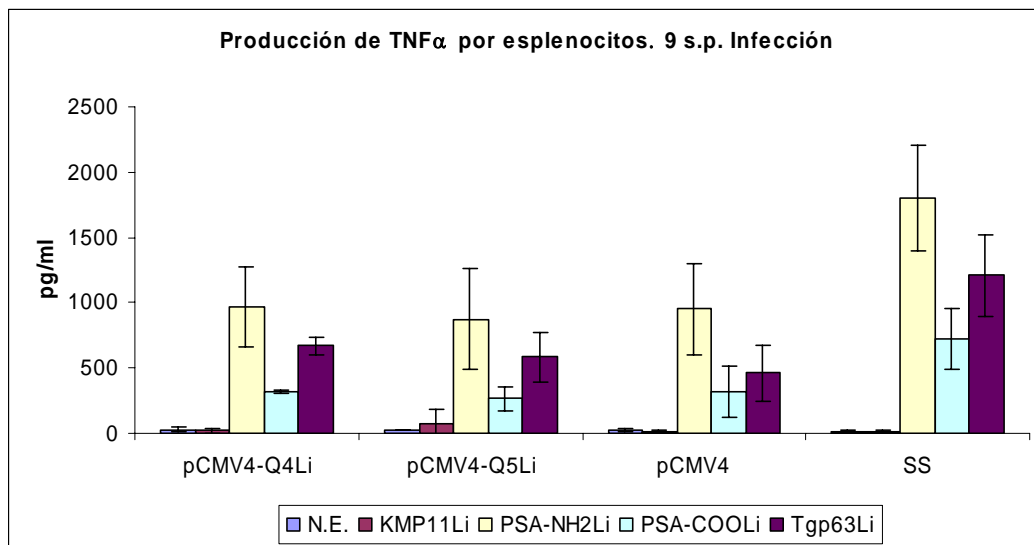


Figura 62. Nivel de secreción de TNF- α por parte de esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *L. major*. Las células esplénicas de los ratones son estimuladas con PSA-NH₂Li (amarillo), Tgp63Li (morado), PSA-COOLi (turquesa) y KMP11Li (fucsia).

Las células de los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li presentan un alto nivel de producción de IFN- γ al ser estimuladas *in vitro* con las proteínas PSA-NH₂Li y Tgp63Li con valores algo superiores a 100 pg/ml. Las células de dichos ratones estimuladas con PSA-COOLi y KMP11Li, así como las células

sin estimular, no presentan secreción de niveles detectables de esta citocina. Las células de los ratones inoculados con el vector vacío pCMV4, tienen una respuesta algo menor a la anteriormente mencionada para aquellos inmunizados con los plásmidos recombinantes. Al igual que ocurre para la citocina TNF- α , las células de los ratones salinos presentan tras la infección con *L. major*, altos valores de producción de IFN- γ tras la estimulación con las proteínas PSA-NH₂Li y Tgp63Li, 145 y 58 pg/ml respectivamente.

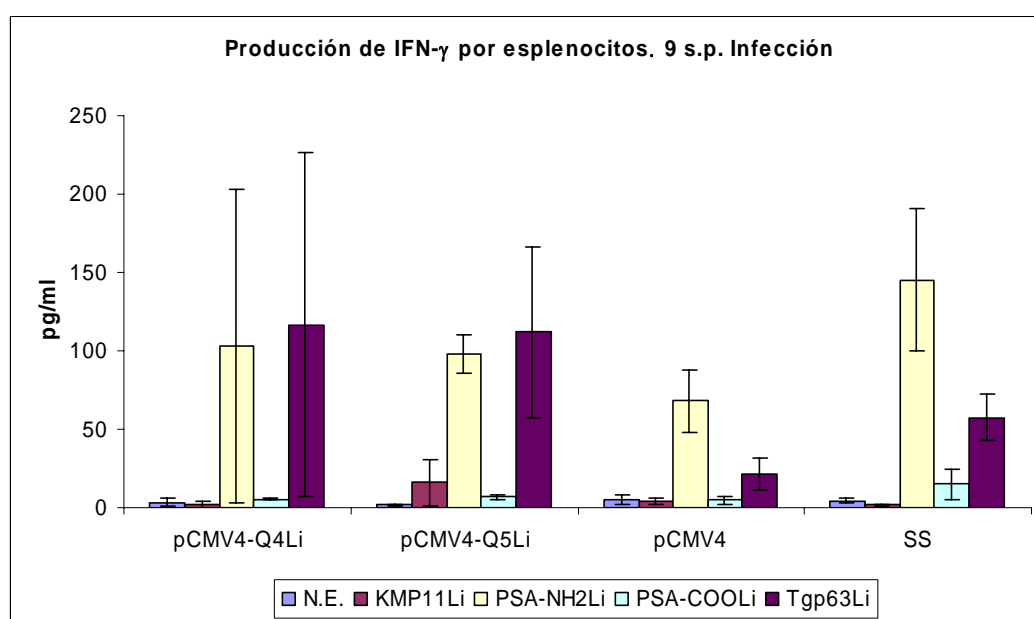


Figura 63. Nivel de secreción de IFN- γ por parte de esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *L. major*. Las células esplénicas de los ratones son estimuladas con PSA-NH₂Li (amarillo), Tgp63Li (morado), PSA-COOLi (turquesa) y KMP11Li (fucsia)

Respecto a la producción de las citocinas IL-4, IL-2 e IL-5 por parte de las células procedentes de los ratones inmunizados e infectados con *L. major*, observamos en términos generales (figura 64) un menor nivel que el anteriormente descrito para TNF- α e IFN- γ . Así, las células de ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li muestran valores en torno a 20-45 pg/ml, tras la estimulación con las distintas proteínas componentes de la molécula quimérica, a excepción de aquellos procedentes de ratones inmunizados con pQ5Li y estimulados con KMP11Li, donde los niveles de las tres mencionadas citocinas son prácticamente nulos. Las células de ratones inoculados con el vector vacío pCMV4 o con solución salina, presentan valores superiores a los anteriormente mencionados con niveles de producción entre 50 y 100 pg/ml

tras estimular con las distintas proteínas componentes de la molécula quimérica a estudio, siendo estos valores superiores para las citocinas IL-4 e IL-2.

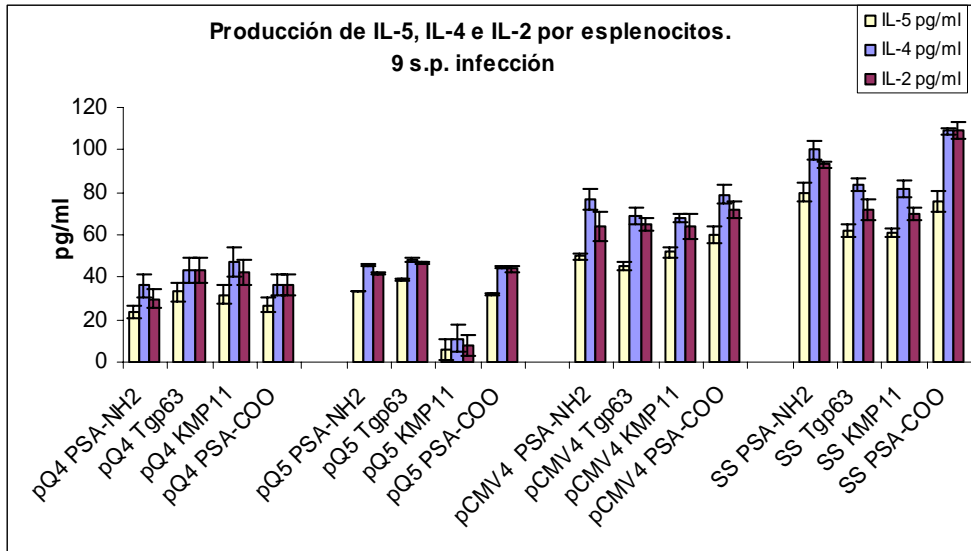


Figura 64. Nivel de secreción de citocinas IL-5, IL-4 e IL-2 por parte de esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *L. major*. Los valores se expresan en pg/ml y en abscisas se indica el grupo de raton y proteína usada como molécula estimuladora.

El nivel de citocinas secretadas por las células procedentes de los ratones inmunizados con pQ4Li, pQ5Li y controles inoculados con pCMV4 o solución salina e infectados con *L. major* (16 semanas post-infección) tras su estimulación con la proteína quimérica Q4LiP es mostrado en las figuras 65 y 66. Los resultados evidencian que las células procedentes de los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li presentan niveles similares de producción de IFN- γ con valores de 90 y 180 pg/ml respectivamente (Fig 65). Las células procedentes de los ratones inoculados con el vector vacío igualmente presentan niveles significativos de IFN- γ con valor de aproximadamente 100 pg/ml. Las células de los ratones inoculados con solución salina no presentan valores significativos de IFN- γ . En cuanto a la producción de TNF- α , observamos valores entre 250 y 500 pg/ml en las células procedentes de los grupos de ratones analizados, siendo el mayor valor para aquellos procedentes de ratones inoculados con pCMV4 (Fig 65).

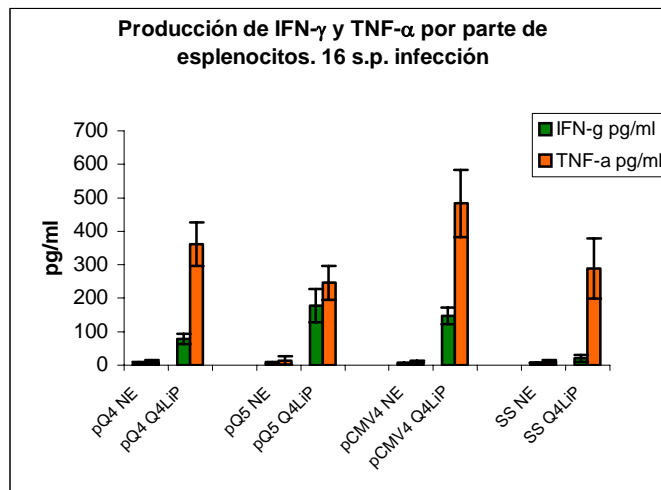


Figura 65. Nivel de secreción de las citocinas IFN- γ y TNF- α por parte de esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *L. major*. Las células esplénicas de los ratones son estimuladas con la proteína quimérica Q4LiP.

Respecto a las citocinas IL-4, IL-5 e IL-2, la producción es en todos los casos basal con valores inferiores a 10 pg/ml.

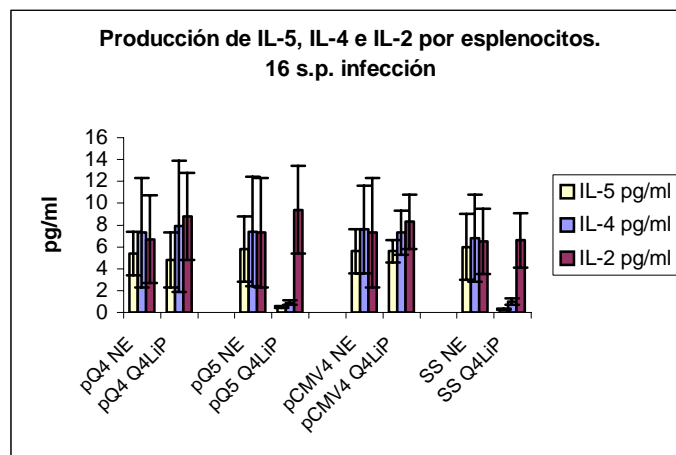


Figura 66. Nivel de secreción de las citocinas IL-5, IL-4 e IL-2 por parte de esplenocitos de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *L. major*. Las células esplénicas de los ratones son estimuladas con la proteína quimérica Q4LiP.

4.5. Transfección pasiva con células esplénicas procedentes de ratones inmunizados con las moléculas quiméricas a estudio e infectados con *Leishmania major*

Con el objetivo de analizar la respuesta inmunológica que inducirían las células esplénicas de los ratones infectados con *L. major* y previamente inmunizados con las moléculas quiméricas pQ4Li y pQ5Li y controles pCMV4 y solución salina, llevamos a cabo la inoculación de ratones naive (C57BL/6) con dichas células obtenidas 16 semanas post-infección, en 9 ratones por grupo. Como control empleamos un grupo de igual número de ratones, al que inoculamos con células procedentes de ratones *naive* y otro grupo únicamente inoculados con solución salina.

Las inoculaciones de las células se hacen vía intravenosa y se inoculan 10^6 células por ratón en un volumen de 30 μ l. En todos los grupos de ratones a ensayo llevamos a cabo en 3 ratones por grupo la inmunización con 0,05 μ g de la proteína quimérica Q4LiP, 1 semana tras la inoculación de las distintas células. 2 semanas tras la inoculación de las células realizamos la infección con *L. major* en las 2 orejas de cada ratón, inoculando por vía intradérmica 500 parásitos (promastigotes metacíclicos) por oreja, en un volumen de 15 μ l.

4.5.1. Respuesta humoral inducida en los distintos grupos de ratones usados en el ensayo de transfección pasiva de células

La respuesta humoral inducida por las células inoculadas se analiza en todos los ratones a ensayo determinando el nivel de anticuerpos generado frente a la proteína Q4LiP y proteínas solubles de *L. major* (SLA) presente 2 semanas tras la inoculación de las distintas células y 4 y 12 semanas post-reto, usando la técnica de ELISA. Los sueros son analizados a dilución 1/50.

Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 67, ponen de manifiesto que la respuesta IgG frente a la proteína quimérica Q4LiP, se produce únicamente en aquellos ratones que fueron inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li y 1 semana después, inmunizados con 0,05 μ g de la proteína quimérica Q4LiP. Así, observamos unos valores de D.O. de 0,4 y 0,57 para los grupos de ratones pQ4Li y pQ5Li respectivamente. Los ratones inoculados con células procedentes de ratones salinos (SS+) y de ratones inoculados con pCMV4 y posteriormente

inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP, presentan niveles de IgG significativamente inferiores a los anteriormente mencionados, con valores de D.O. 0,12 y 0,14 respectivamente. Los ratones salinos únicamente inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP, presentan IgG con un valor de D.O. de 0,18 y los ratones inoculados con células procedentes de ratones *naive* e inoculados con la proteína quimérica Q4LiP, presentan un valor de respuesta algo inferior con valor de D.O. de aproximadamente 0,1 (Fig 67). La determinación del nivel de anticuerpos frente SLA en los mencionados grupos de ratones inoculados con las distintas células esplénicas y controles y posteriormente inmunizados o no con la proteína quimérica Q4Li muestra la ausencia de IgG a niveles detectables frente a la misma en todos los ratones analizados (Figura no mostrada).

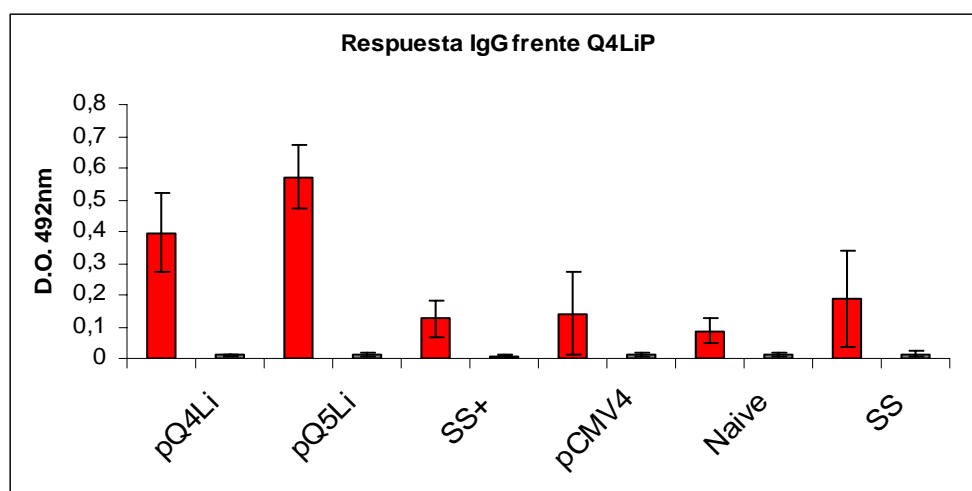


Figura 67. Nivel de anticuerpos IgG frente Q4LiP 2 semanas tras la inoculación celular, pre-infección con *L. major*. El color rojo corresponde a los ratones inmunizados post-inoculación celular con la proteína quimérica Q4LiP. El color gris corresponde a los ratones no inmunizados con dicha proteína.

Pasadas 4 semanas de la infección con *L. major*, observamos que el nivel de IgG frente a la proteína quimérica Q4LiP, desciende en términos generales, salvo excepciones, en todos los grupos de ratones a ensayo, si bien mantiene en general un patrón similar de anticuerpos al presente en el momento previo a la infección (Fig 68). Así, los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li y posteriormente inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP, mantienen el nivel de anticuerpos anti-Q4Li relativo al valor determinado pre-infección con valor de D.O. de 0,5, pero observando una

mayor dispersión en los valores de anticuerpos. Sin embargo, en los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ5Li y posteriormente inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP, se observa una disminución en el nivel de anticuerpos anti Q4LiP, con valor de D.O. de 0,13. Los ratones que no han sido inmunizados con la proteína Q4LiP, no presentan respuesta IgG frente a dicha proteína y sigue sin detectarse anticuerpos anti-SLA en todos los grupos de ratones a ensayo. Así mismo, ningún ratón perteneciente al resto de los grupos a ensayo presenta anticuerpos anti-Q4Li a nivel detectable.

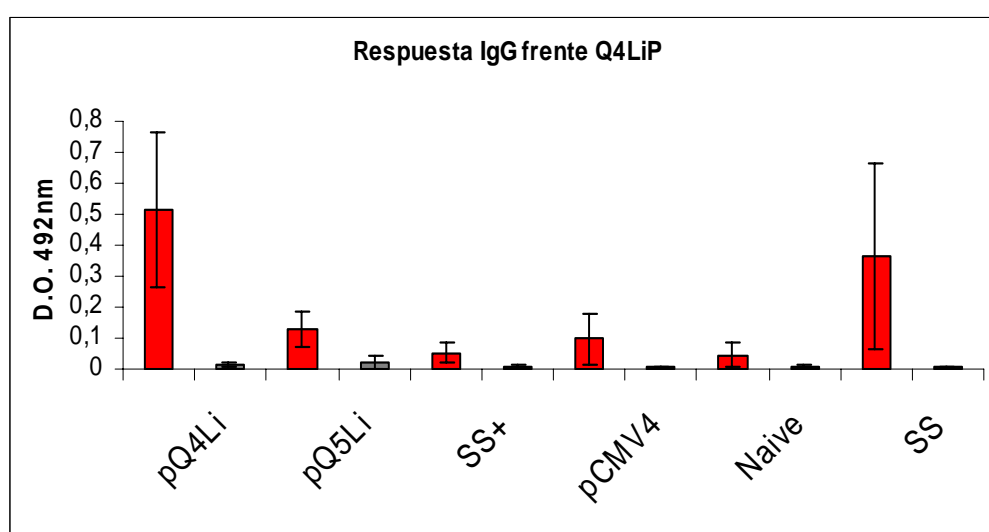


Figura 68. Respuesta IgG frente Q4LiP 4 semanas tras la infección con *L. major*. El color rojo corresponde a los ratones inmunizados post-inoculación celular con la proteína quimérica Q4LiP y el color gris corresponde a los ratones no inmunizados con dicha proteína.

La determinación y análisis de la respuesta IgG frente SLA en los distintos grupos a ensayo, muestra 12 semanas tras la infección la existencia de anticuerpos anti-SLA en todos los ratones infectados, sin evidenciarse diferencia entre los ratones que fueron inmunizados post-inoculación celular con la proteína Q4LiP y los que no lo fueron (Fig 69). Los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li, pQ5Li y con células procedentes de ratones inoculados con pCMV4, presentan valores de D.O. entre 0,2 y 0,35. Los ratones inoculados con células procedentes de ratones salinos, tienen un valor de D.O. de 0,47 y aquellos inoculados con células procedentes de un ratón *naive* o los ratones salinos no inoculados con células, muestran valores de D.O. en torno a 0,6.

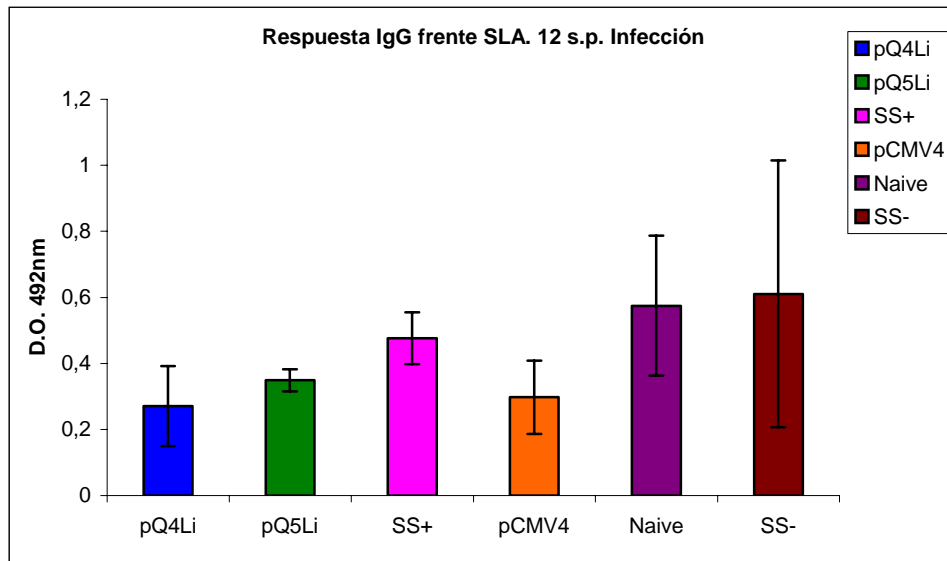


Figura 69. Respuesta IgG frente a SLA 12 semanas tras la infección con *L. major*. Los valores mostrados representan para cada grupo de ratones la media +/- la desviación estandar del valor de anticuerpos observado en cada uno de los ratones integrantes de los mismos.

4.5.2. Análisis de la capacidad proliferativa antígeno específica de los esplenocitos de ratones usados en el ensayo de transfección pasiva celular e infectados con *L. major*

12 semanas post-infección llevamos a cabo un ensayo de proliferación celular sobre esplenocitos obtenidos de los distintos grupos de ratones a ensayo, tras ser estimulados con la proteína quimérica Q4LiP y los componentes antigénicos de la misma a concentraciones de: 0,4; 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Como controles usamos células estimuladas con el mitógeno (CoA) y células sin estimular. Así mismo, determinamos el índice de estimulación de un ratón sin inocular y sin infectar (ratón *naive*) En todos los casos las células se incuban *in vitro* durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, las células se incuban durante 8 horas con timidina tritiada. Los resultados obtenidos, evidencian que no se observa diferencia en el índice de estimulación entre los ratones que fueron inmunizados con 0,05 μg de la proteína quimérica Q4LiP tras la inoculación celular y los que no lo fueron. Así, los valores de inducción de proliferación celular mostrados (Fig 70-74) para cada grupo de ratones, son media de los valores obtenidos con todos los ratones del grupo analizados hayan sido o no inmunizados con dicha proteína Q4Li.

Al estimular con la proteína quimérica Q4LiP, se produce proliferación celular en todos los ratones infectados. Los ratones de los grupos inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li, presentan los mayores índices de estimulación. Así observamos que los ratones inoculados con las células de ratones inmunizados con pQ4Li e infectados, presentan un índice de estimulación igual a 6 al estimular con 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. El índice se incrementa hasta un valor de 8,5 a una concentración de proteína de 2 $\mu\text{g/ml}$. Los ratones inoculados con las células de ratones inmunizados con pQ5Li e infectados, presentan un índice de estimulación cercano a 7 al estimular con 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. El resto de los ratones muestran índices de estimulación de aproximadamente 4 o valores inferiores independientemente de la concentración de proteína usada.

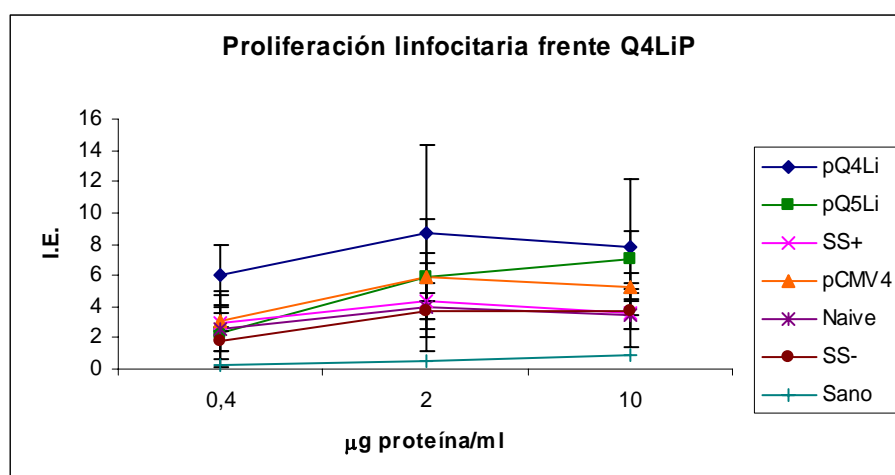


Figura 70. Proliferación celular de esplenocitos de ratones inoculados con células de los distintos grupos a ensayo e infectados con *L. major*, tras estimular con la proteína quimérica Q4LiP. Estimulación a distintas concentraciones de proteína: 0,4; 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

La estimulación con la proteína PSA-NH₂Li, únicamente genera un índice de estimulación significativo (I.E.= 2,5) (Fig 71) en los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li e infectados y tras estimular con 10 μg proteína/ml. El resto de los grupos de ratones presentan índices de estimulación similares entre ellos. Los ratones control no inmunizados ni infectados, no muestran un índice de estimulación detectable.

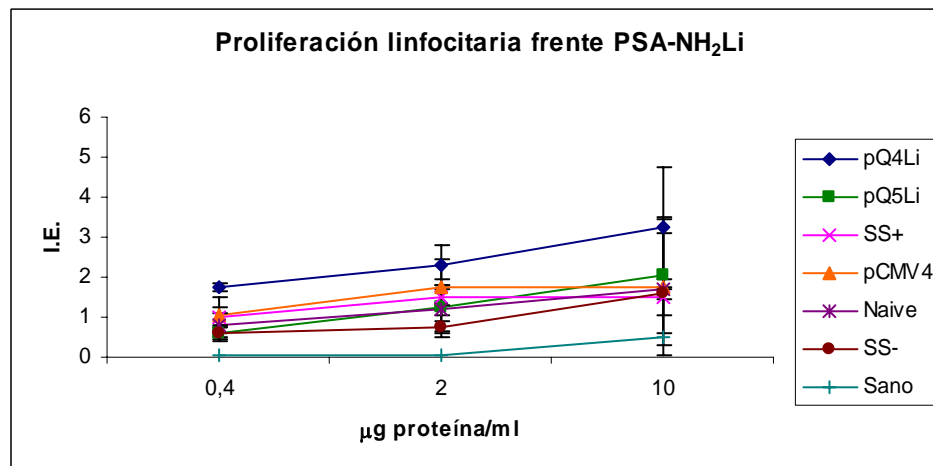


Figura 71. Proliferación celular de esplenocitos de ratones inoculados con células de los diferentes grupos a ensayo e infectados con *L. major*, tras estimular con la proteína PSA-NH₂Li. Estimulación a distintas concentraciones de proteína: 0,4; 2 y 10µg/ml.

Al estimular con la proteína recombinante Tgp63Li, a una concentración de 10 µg/ml observamos que los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ5Li presentan el mayor índice de estimulación detectado con valor de 10 aproximadamente (Fig 72). Los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li, presentan índices de estimulación en torno a 6. Los ratones inoculados con pCMV4 o inoculados con solución salina, presentan índices de estimulación en torno a 8,5 y los ratones salinos, así como los inoculados con células procedentes de ratones naive, presentan índices de estimulación inferiores a 5 (Fig 72).

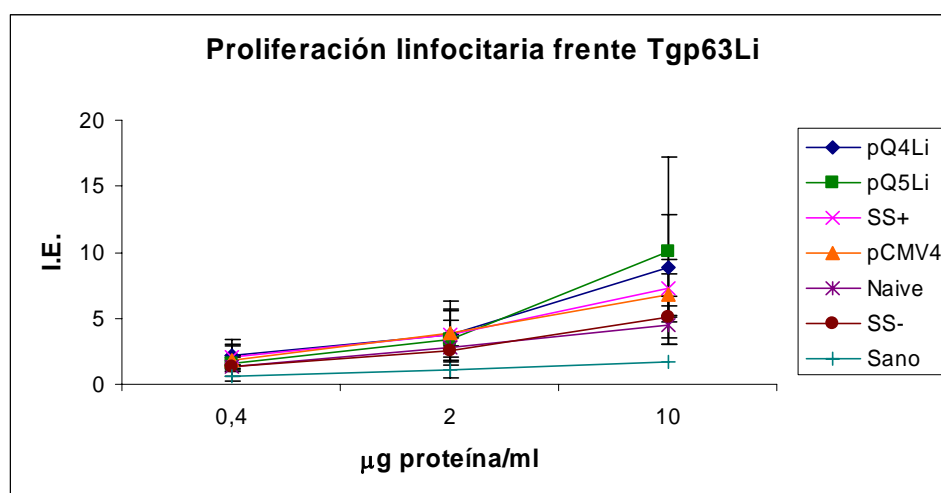


Figura 72. Proliferación celular de esplenocitos de ratones inoculados con células de los diferentes grupos a ensayo e infectados con *L. major*, tras estimular con la proteína Tgp63Li. Estimulación a distintas concentraciones de proteína: 0,4; 2 y 10µg/ml.

Al estimular con la proteína PSA-COOLi, los índices de estimulación obtenidos son claramente inferiores a los anteriormente mencionados para la proteína Tgp63Li, observando que únicamente las células procedentes de los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li, muestran un significativo índice de proliferación próximo a 2,5 y algo superior al estimular con 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína (Fig 73). Los ratones pertenecientes al resto de los grupos a estudio muestran índices de estimulación basales no significativos.

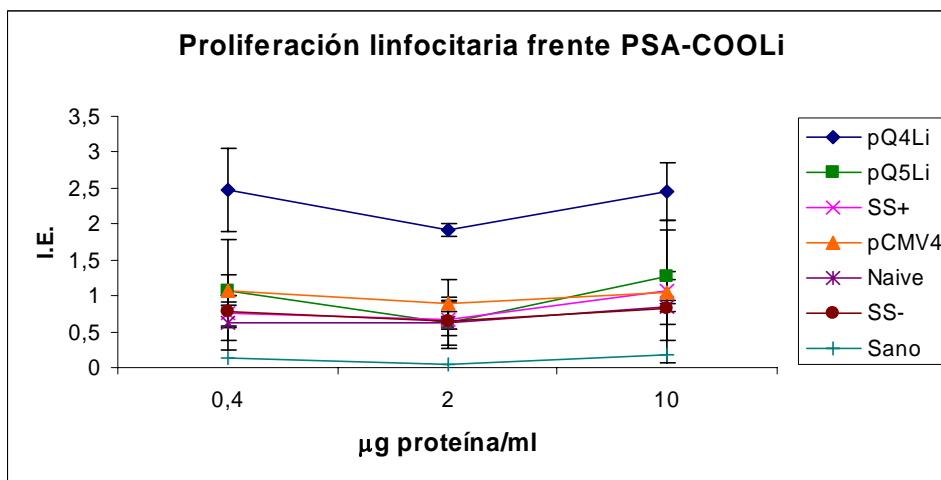


Figura 73. Proliferación celular de esplenocitos de ratones inoculados con células de los diferentes grupos a ensayo e infectados con *L. major*, tras estimular con la proteína PSA-COOLi. Estimulación a distintas concentraciones de proteína: 0,4; 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Resultados similares son obtenidos tras estimular con la proteína recombinante KMP11Li. Así, observamos un valor de índice de proliferación celular de aproximadamente 2,5 en los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li, al estimular con 0,4 μg de proteína/ml. En el resto de grupos de ratones no se observan índices de proliferación significativa.

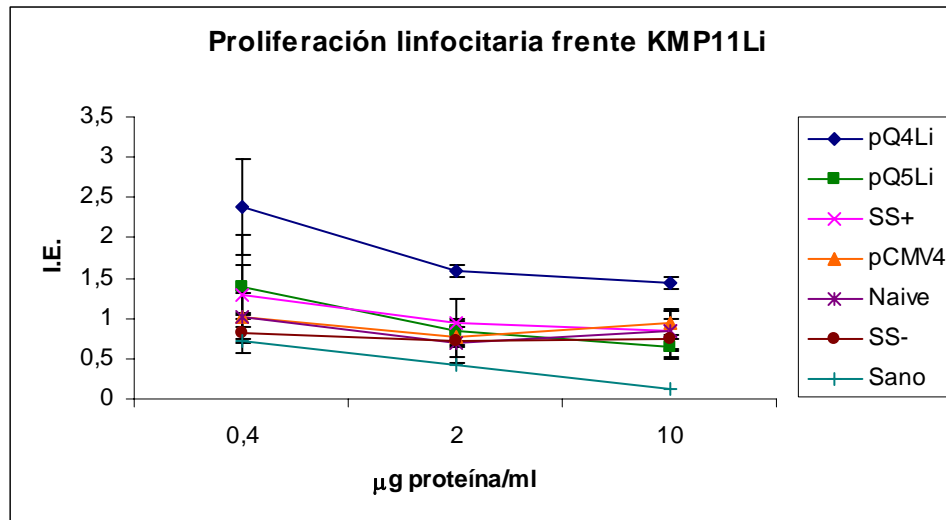


Figura 74. Proliferación celular de esplenocitos de ratones inoculados con células de los diferentes grupos a ensayo e infectados con *L. major*, tras estimular con la proteína KMP11Li. Estimulación a distintas concentraciones de proteína: 0,4; 2 y 10µg/ml.

4.5.3. Determinación de las lesiones subdérmicas ocasionadas por la infección con *Leishmania major* en los distintos grupos de ratones usados en el ensayo de transfección pasiva celular

A partir de 8 semanas tras la infección, llevamos a cabo medidas semanales de las lesiones originadas en las orejas, con el objetivo de observar la posible presencia de los mismos y su evolución. Los resultados obtenidos evidencian la existencia de un significativo mayor grado de lesión en todos los ratones de los grupos control salinos e inoculados con células procedentes de ratones *naive* (Fig 75). El grupo de ratones inoculado con células procedentes de ratones inmunizados con pQ4Li e infectados, presenta el menor grado de lesión de los distintos grupos a estudio, siendo incluso menor en aquellos inmunizados con la proteína Q4Li 1 semana tras la inoculación de las células (Fig 75). Los ratones inoculados con células procedentes de ratones inmunizados con pQ5Li, muestran inicialmente, muy baja lesión, similar a aquellas observadas en el grupo de ratones pQ4Li anteriormente mencionado, sin embargo, a partir de la 10^a semana las lesiones se incrementan de forma dramática. En este punto, estos ratones presentan una severa pérdida de peso y un 25% de los mismos no sobrevive a las 12 semanas. Los ratones que pertenecen a los grupos a los que se les introducen células procedentes de los ratones inoculados con pCMV4 o solución salina e infectados, muestran una

reducción de lesión relativa a la observada en los ratones control inoculados con células de ratones *naive* o solo con solución salina (Fig 75).

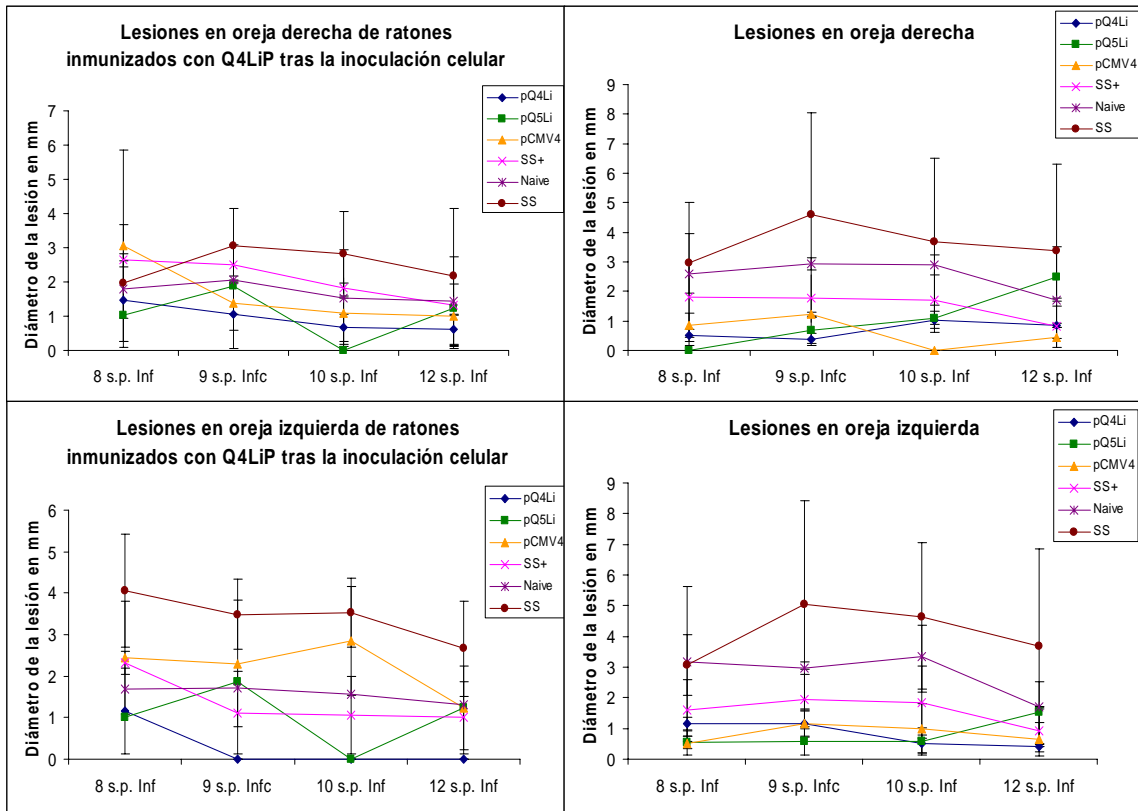


Figura 75. Lesiones originadas en las orejas de los ratones a estudio en el ensayo de transferencia pasiva de células, medida a distintos tiempos post-infección con *L. major*. Se representa el valor del diámetro de la lesión expresado en mm. SS+ son los ratones inoculados con células procedentes de ratones salinos infectados y SS- son ratones que no han sido inoculados con células. Las 2 gráficas de la izquierda corresponden a los ratones que fueron inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP tras la inoculación celular y los gráficos de la derecha corresponden a los ratones que no fueron inmunizados con dicha proteína.

4.5.4. Determinación de la carga parasitaria en orejas de ratones inoculados por transferencia pasiva con las distintas células a ensayo e infectados con *L. major*

12 semanas post-infección, determinamos la carga parasitaria en las orejas de 3 ratones procedentes de cada uno de los grupos a ensayo, procediendo según el método previamente descrito en la sección de material y métodos.

Los resultados obtenidos muestran (Fig 76) la existencia de una diferencia destacada de carga parasitaria entre los ratones control salino o

inoculados con células procedentes de ratones *naïve* y el resto de los ratones inoculados con células procedentes de ratones previamente infectados. Así, los ratones salinos y los inoculados con células de ratones *naïve*, muestran altos valores de carga parasitaria (\log_{10} de 7 y 10 respectivamente) Los ratones inoculados con células procedentes de ratones infectados con *L. major* y previamente inmunizados con pQ4Li, pQ5Li, o inoculados con pCMV4 o solución salina, presentan valores similares de carga parasitaria, oscilando estos entre 2 y 6. Interesantemente, los grupos pQ4Li y pQ5Li inmunizados con la proteína quimérica Q4LiP tras la transfección pasiva de células, muestran una reducción en la carga parasitaria relativa a la observada en aquellos únicamente inoculados con las células (Fig 76).

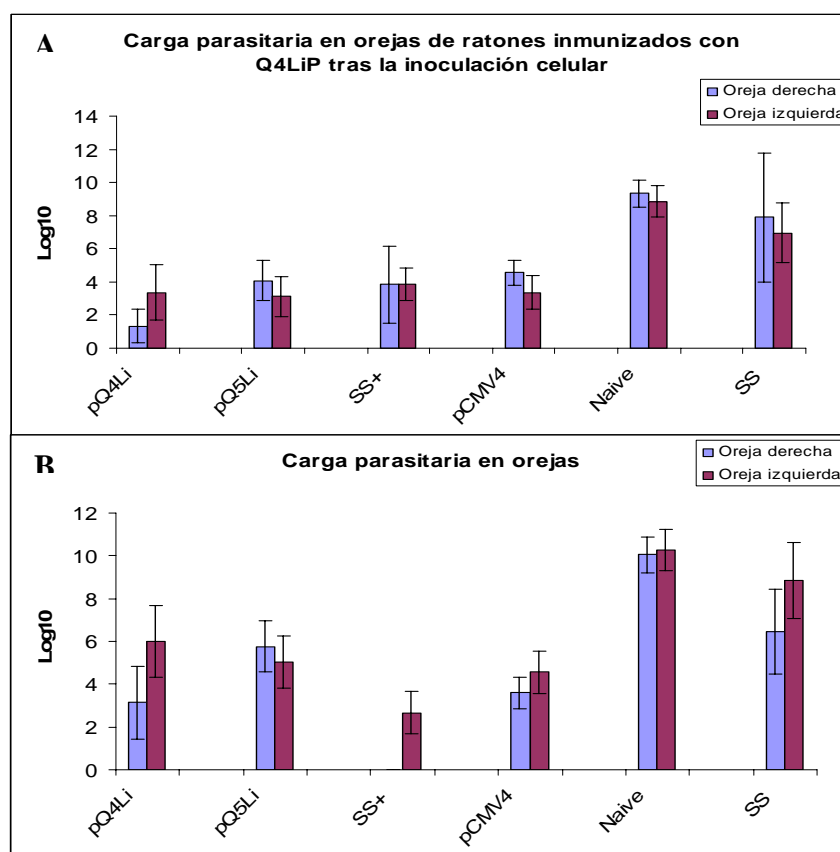


Figura 76. Carga parasitaria, 12 semanas tras la infección con *L. major*, en orejas de ratones inoculados con las distintas células a ensayo. Los resultados expresados en la gráfica A representan la media de parásitos de ratones inmunizados con Q4LiP tras la inoculación celular y los resultados de la gráfica B representan la media de los valores de ratones inoculados con las células de los distintos ratones pero no inmunizados con Q4LiP.

5. DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la capacidad adyuvante de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi*

Ensayos previos del laboratorio mostraron que las proteínas HSP70 de *T. cruzi* y humana inducen *in vitro* la activación de la proliferación de células de bazo y ganglio de ratones *naive* (Marañón y col. 2000). Así, la adición de la proteína recombinante HSP70 de *T. cruzi* a las mencionadas células da lugar a una rápida e intensa estimulación de células T detectable a las 24 horas, seguida de un proceso de internalización de los receptores CD3+ y TCR $\alpha\beta$ y un proceso de apoptosis no dependiente de Fas/L (Marañón y col. 2001). Asimismo, se ha descrito que la inmunización de ratones de distinto haplotipo con un vector de ADN que porta el gen KMP11 de *T. cruzi* fusionado al codificante de la mencionada proteína HSP70 de *T. cruzi*, induce una producción de anticuerpos IgG de isotipo IgG2a frente a KMP11, así como la activación de CTLs específicos del antígeno KMP11 (Planelles y col. 2001). Sobre esta base, en la presente tesis, nos planteamos como objetivo el estudio del efecto activador y modulador de la respuesta inmune de la proteína HSP70 y especialmente de un fragmento de ésta de 29 kDa, analizando tanto la respuesta de anticuerpos como la de células T citotóxicas específicas del antígeno al que se asocie. Este fragmento de 29 kDa de la proteína HSP70 muestra tener capacidad de inducir la maduración de células dendríticas murinas (Planelles y col. 2002).

Para llevar a cabo estos estudios, inicialmente realizamos la construcción de diferentes vectores recombinantes conteniendo la mencionada proteína y fragmentos de la misma fusionados a la proteína KMP11 de *T. cruzi*. La proteína KMP11 de *T. cruzi* es un antígeno específico de kinetoplastidos ampliamente distribuido entre las especies de la familia *Trypanosomatidae* (Tolson y col. 1994; Stebeck y col. 1995; Jardim y col. 1995; Berderich y col. 1997; Thomas y col. 2000). Este antígeno, tanto el procedente de *Leishmania* como de *T. cruzi*, es reconocido por sueros de paciente con infecciones naturales por dichos parásitos (Thomas y col. 2001; Carvalho y col. 2008) y es fuertemente inductor de una respuesta celular (Tolson y col. 1994; Marañón y col. 2001). Sin embargo, estudios preliminares del laboratorio mostraron que la proteína recombinante KMP11 de *T. cruzi*, no tenía capacidad de inducir

anticuerpos detectables frente a ella, al ser usada como inmunógeno aislado en sistemas de experimentación murina.

El análisis de los resultados presentados en esta tesis, ponen en evidencia que la inmunización de ratones BALB/c y C57BL/6, de 7 y 11 semanas de edad, con las proteínas recombinantes KMP11, KMP11-HSP70 y KMP11-h70T genera una respuesta de anticuerpos frente KMP11 únicamente en los ratones inmunizados con las proteína de fusión. Así, en los ratones inmunizados con la proteína de fusión KMP11-HSP70, los anticuerpos anti-KMP11 son detectables desde la primera inmunización, respondiendo entre el 50 al 85% de los ratones inmunizados, dependiendo del haplotipo y edad de ratón. La respuesta de IgG inducida es mayoritariamente de subtipo IgG1. Tras la segunda inmunización el nivel de anticuerpos generado frente a KMP11 se incrementa significativamente, observando una respuesta mixta IgG1 e IgG2a, salvo en los ratones C57BL/6 de 11 semanas, en los cuales, la respuesta es preferentemente de subtipo IgG2a, ya desde la primera inmunización. En los ratones inmunizados con la proteína KMP11 aislada, no se detectan anticuerpos frente a ella. Estos resultados confirman que el antígeno KMP11 de *T. cruzi* no tiene capacidad inmunogénica (respuesta humoral) al ser usada como proteína recombinante aislada y requiere su fusión a la proteína HSP70 para inducir la producción de anticuerpos antígeno-específicos. Estos resultados, están en concordancia con aquellos obtenidos en previos estudios del laboratorio que mostraban que la inmunización de ratones con un vector de ADN que porta el gen KMP11 de *T. cruzi* de forma aislada no inducían anticuerpos anti-KMP11 (Planelles y col. 2001). Sin embargo, si se observaba la inducción de anticuerpos anti-KMP11 al inmunizar con un vector de ADN que contenía el mencionado gen, fusionado al codificante para la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Planelles y col. 2001). Diversos estudios han descrito la capacidad de numerosas proteínas HSP70, especialmente aquellas procedentes de microorganismos, de activar la inmunogenicidad de antígenos asociados, induciendo células B antígeno específicas y células T respondedoras, sin necesidad de requerir otros adyuvantes (Perraut y col. 1993; DelGiudice, 1994; Rico y col. 1999). Asimismo, diversos trabajos han puesto de manifiesto la importancia que para la actividad *carrier* de la proteína HSP70 tiene el hecho de que esté unida covalentemente al antígeno. Así, Suzue y Young (1996) mostraron que solo aquellos ratones inmunizados con la proteína HSP70 de

Mycobacterium fusionada a la proteína p24 del virus del VIH-1, respondían con la producción de anticuerpos anti-p24, siendo éstos de larga duración y de isotipo IgG1, y no aquellos inmunizados con la mezcla de ambas proteínas aisladas.

Los ratones inmunizados con la proteína de fusión KMP11-h70T presentan igualmente anticuerpos anti-KMP11 tras una sola inmunización, respondiendo entre un 30 al 50% de los ratones inmunizados. Tras la segunda inmunización la respuesta de anticuerpos frente a la proteína KMP11 se da en todos los ratones inmunizados y el nivel de estos se incrementa considerablemente. La respuesta de IgG inducida es diferente dependiendo del haplotipo de ratón. En los ratones BALB/c los anticuerpos son claramente de subtipo IgG1 tras la primera inmunización y mixta IgG1 e IgG2a tras la segunda, tal como sucede cuando la proteína KMP11 está asociada a la proteína HSP70 completa. Sin embargo, en los ratones C57BL/6 inmunizados con la mencionada molécula de fusión KMP11-h70T la respuesta de anticuerpos IgG anti-KMP11 es de subtipo IgG2a especialmente en aquellos de 11 semanas, donde este desequilibrio hacia el subtipo IgG2a es observado desde dos semanas y media tras la primera inmunización.

En resumen, el análisis de los resultados obtenidos indican que tras una única inmunización responde un mayor número de ratones del grupo inmunizado con KMP11-HSP70 que de aquellos inmunizados con la molécula KMP11-h70T. Tras la segunda inmunización el número de ratones respondedores es en ambos casos del 100% y el nivel de anticuerpos generado es similar. Una excepción a ello serían los ratones C57BL/6 de 11 semanas, donde se observa una relativa mayor respuesta en los ratones inmunizados con la proteína de fusión conteniendo la proteína HSP70, que en aquellos portando el fragmento de la misma h70T.

En este punto de la tesis, nos planteamos si la respuesta de anticuerpos anti-KMP11 inducidos por la proteína de fusión KMP11-h70T estaba motivada por una actividad *carrier* de la molécula h70T o era únicamente causada por el aumento en el tamaño del antígeno KMP11 al fusionarse al fragmento h70T. Para responder a ello, decidimos estudiar la capacidad inmunogénica de la proteína de fusión C-LYT-KMP11 que porta la molécula C-LYT (Sanz y col. 1988; Fernández-Tornero y col. 2002) de aproximadamente 24 kDa fusionada

al antígeno KMP11 y da lugar a una proteína de fusión de similar tamaño a la proteína KMP11-h70T. Así, usando como control la molécula KMP11-h70T determinamos la capacidad relativa de ambas proteínas de fusión de inducir anticuerpos específicos frente al antígeno KMP11 al ser inoculadas en ratones C57BL/6 por vía subcutánea. Como era de esperar, los resultados obtenidos muestran que los ratones inmunizados con la proteína recombinante KMP11-h70T presenta anticuerpos anti-KMP11 tras una única inmunización, respondiendo el 37% de los ratones inmunizados. Tras una segunda inmunización responde el 100% de los ratones inmunizados. Interesantemente, la inmunización con la proteína de fusión C-LYT-KMP11 no induce un nivel detectable de anticuerpos anti-KMP11, tras la primera o segunda inmunización, en ningún ratón inmunizado. Sin embargo, en un 50% de estos ratones inmunizados con la proteína C-LYT-KMP11 muestran la presencia de anticuerpos dirigidos frente a la molécula C-LYT, indicando que el proceso de inmunización con la proteína C-LYT-KMP11 fue correcto y que ello no era el motivo de la ausencia de anticuerpos frente a KMP11 en estos ratones. Por otra parte, los anticuerpos generados frente a C-LYT son de corta duración, detectándose un significativo descenso del nivel de éstos a las 4 semanas post-inmunización. A diferencia de lo observado para los anticuerpos generados frente a C-LYT, el nivel de anticuerpos anti-KMP11 presente, 10 días post-segunda inmunización, en el suero de los ratones inmunizados con la molécula de fusión KMP11-h70T se ve incrementado a la 4 semanas tras la segunda inmunización. En resumen, estos resultados soportan la actividad *carrier*, como activadora de una respuesta humoral antígeno específica, asociada a la molécula h70T.

5.2. Capacidad inmunológica y de inducir protección frente a la infección por *Leishmania infantum* de proteínas recombinantes quiméricas portando los antígenos KMP11, fragmentos amino y carboxilo de PSA-2 y Tgp63 de *Leishmania*.

Las vacunas parecen ser la principal vía de control de la Leishmaniosis (Handman, 2001). Existen numerosos precedentes que indican la posibilidad de emplear como vacunas antígenos definidos del parásito en forma de proteínas recombinantes (Requena y col., 2004). En este trabajo llevamos a

cabo la inmunización de ratones tanto BALB/c como C57BL/6 con las proteínas quiméricas Q4LiP y Q5LiP. Llevamos a cabo dos inmunizaciones por ratón. El análisis de respuesta humoral en estos ratones inmunizados con dichas proteínas por vía subcutánea nos permite ver la variabilidad de respuesta dependiendo de la proteína con la que inmunizamos, ya que la respuesta de los dos grupos de ratones es diferente. El haplotipo del ratón no resulta diferencial en cuanto al tipo de respuesta y es muy similar en ambas vías de inoculación. Los datos nos permiten concluir que la inmunización con Q4LiP genera una respuesta de IgG algo más elevada que la inmunización con Q5LiP. En la inmunización con Q4LiP la respuesta es mayor frente a las proteínas KMP11Li y PSA-COOLi y muy escasa frente PSA-NH₂Li. Esta respuesta es de ambos subtipos de IgG, tanto IgG1 como IgG2a. Sin embargo, al inmunizar con Q5LiP, la respuesta generada está especialmente dirigida frente PSA-NH₂Li y Tgp63Li y frente KMP11Li no hay respuesta. La respuesta generada es exclusivamente de subtipo IgG2a. La respuesta generada en estos dos casos es totalmente diferente. Esta respuesta humoral se mantiene a largo plazo. Estos resultados dejan patente la influencia del fragmento h70T de la proteína HSP70, ya que su presencia hace que la respuesta se dirija hacia proteínas diferentes que a las que se dirige sin h70T y dicha respuesta es de subtipo IgG2a, siendo mixta (IgG1 e IgG2a) en el caso de inmunización en ausencia de h70T, Q4LiP.

Estos datos de activación de respuesta humoral concuerdan con la descripción de los antígenos de *Leishmania* como activadores policlonales de células B (Cordeiro-Da-Silva y col., 2001; Rico y col., 2002). También concuerdan con la descripción de Salvador Iborra, la cual afirma que antígenos de *Leishmania*, como las histonas H2A y H3, son capaces de activar células B y generar respuesta humoral en ratones, en ausencia de adyuvante.

En ratones BALB/c inmunizados con Q4LiP o Q5LiP, tanto por vía intraperitoneal como subcutánea, llevamos a cabo un estudio de respuesta celular, analizando la proliferación celular generada frente a las distintas proteínas componentes de Q4LiP y frente a la proteína recombinante Q4LiP completa. Este ensayo nos permite ver como la mayor proliferación celular se produce frente a la proteína recombinante Q4LiP completa. Frente al resto de proteínas la respuesta es algo menor. La proliferación es mayor en el caso de inmunización por vía subcutánea que por vía intraperitoneal, sobre todo en el

grupo inmunizado con Q5LiP, el cual inmunizado por vía intraperitoneal solo prolifera frente PSA-COOLi. El grupo de ratones inmunizados con Q5LiP presentan mayor índice de proliferación que los inmunizados con Q4LiP, por tanto, h70T juega un papel determinante en la respuesta celular generada.

Las proteínas recombinantes Q4LiP y Q5LiP inducen una respuesta citotóxica frente a la proteína Q4LiP. En ratones C57BL/6 llevamos a cabo un ensayo de citotoxicidad empleando células transfectadas con el vector pCMV4 conteniendo el gen codificante de la proteína recombinante Q4LiP. Las células de los ratones inmunizados con Q4LiP y Q5LiP, lisan las células presentadoras de la proteína Q4LiP, lo que significa que la inmunización a generado la activación de respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+. Los ratones inmunizados por vía intraperitoneal con Q4LiP y Q5LiP presentan un nivel de respuesta citotóxica muy similar entre ellos. Al inmunizar por vía subcutánea, los ratones inmunizados con Q5LiP presentan niveles de respuesta dobles a los de los ratones inmunizados con Q4LiP. Los resultados nos permiten concluir que la inmunización con las proteínas recombinantes Q4LiP y Q5LiP provoca respuesta citotóxica frente Q4LiP y que esta respuesta es mayor al ser inmunizados por vía intraperitoneal.

La capacidad de controlar la Leishmaniosis está determinada por una respuesta inmunológica específica tipo Th1 (David Sacks y col., 2004) mientras que la respuesta Th2 está implicada en la supresión de respuesta de células T (Palatnik-de-Sousa, 2008). Estudios han puesto de manifiesto el papel estimulador de las secuencias CpG, activando actividad lítica de células NK (Zuhair K. Ballas y col., 2001) y siendo capaces de generar respuesta Th1 necesaria para la superación de la infección. Se ha descrito que su uso junto SLA o antígenos recombinantes es capaz de inducir protección frente Lishmaniosis cutánea (Rhee y col., 2002) Por este motivo probamos la inmunización de ratones BALB/c con la proteína quimérica Q5LiP acompañada de distintas secuencias CpG, con el objetivo de ver si se producía una mayor y eficaz estimulación de respuesta humoral y celular frente a la proteína quimérica Q4LiP y una mayor protección frente a una infección por *Leishmania*.

Los resultados de la presente tesis muestran que la adición de oligonucleótidos conteniendo secuencias CpG modifica la respuesta humoral

inducida por la proteína quimérica Q5LiP, observándose una dependencia del oligonucleótido usado así como de la vía de inoculación.

La respuesta humoral analizada, tras dos inmunizaciones, frente a las cuatro proteínas componentes de la proteína quimérica Q4LiP, deja patente una alta respuesta de anticuerpos IgG frente KMP11Li y PSA-COOLi, siendo algo menor frente Tgp63Li. Esta respuesta es diferente frente a cada proteína en cuanto al balance del subtipo de IgG generado, así, frente a Tgp63Li es mixta, y frente a KMP11Li y PSA-COOLi, es predominantemente de subtipo IgG2a. Frente a PSA-NH₂Li no se produce prácticamente respuesta y en caso de producirse, es exclusivamente de subtipo IgG2a. Estos datos dejan patente una respuesta mayoritariamente de subtipo IgG2a, que es un tipo de respuesta humoral, derivada de una respuesta tipo Th1, que favorece la superación de la infección (David Sacks y col., 2004) La respuesta IgG_a está asociada a protección inhibiendo en un 80% los promastigotes de distintas cepas de *Leishmania* y en un 79,3% la infección *in vivo* por parte del mosquito (C.B. Palatnik-de-Sousa, 2008) La inoculación por vía intraperitoneal genera mayor respuesta que la inoculación por vía subcutánea. La proliferación celular es muy similar entre los ratones inmunizados únicamente con Q5LiP y los ratones inmunizados con Q5LiP acompañada de los distintos oligos a ensayo, al inmunizar por vía intraperitoneal, lo que parece indicar que estos oligonucleótidos no generan una mayor proliferación celular frente a los cuatro componentes de la proteína quimérica Q4LiP al ser inoculados por esta vía. Al inmunizar por vía subcutánea, la respuesta de proliferación es menor pero si hay diferencias entre aquellos inmunizados con los oligonucleótidos y los que solo han sido inmunizados con Q5LiP, al ser estimulados con las proteínas KMP11Li y PSA-COOLi.

Al estimular con las cuatro proteínas de *L.infantum* componentes de Q5LiP los esplenocitos de ratones inmunizados, se produce una discreta estimulación de marcador celular CD19⁺ respecto a las células sin estimular, salvo al realizar dicha estimulación con PSA-NH₂Li, donde se produce una supresión de la expresión de CD19⁺ respecto a las células sin estimular. Respecto a CD3⁺/CD4⁺, no se produce aumento de la expresión de estos marcadores celulares al estimular con las cuatro proteínas, mantienen el nivel que habían adquirido con la inmunización. Estas células CD4⁺ son

fundamentales para superar la infección ya que controlan el crecimiento de parásitos en hígado en la infección primaria (Amanda C Stanley y col., 2006)

Respecto a las citocinas producidas, medimos la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-10 y observamos que se produce IFN- γ en todos los grupos de ratones inmunizados, siendo mayor en aquellos inmunizados con los oligonucleótidos modificados junto con la proteína quimérica Q5LiP. La respuesta IL-4 es baja y la respuesta IL-10 es prácticamente inexistente, lo que deja patente un tipo de respuesta Th1, que ha sido descrita como la respuesta más beneficiosa a la hora de vencer la infección (David Sacks y col., 2004, Amanda C Stanley y col., 2006) Ha sido descrito que IL-10 suprime la respuesta proinflamatoria al inhibir la producción de IL-12 e IFN- γ en el caso de infección por *L. donovani*. En humanos se han observado altos niveles de IL-10, siendo responsable en el caso de *L. visceralis*, de suprimir la activación de macrófagos, la migración de células dendríticas y la respuesta protectora tipo Th1. Se ha demostrado que ratones deficientes en la producción de IL-10 y ratones con el receptor IL-10 bloqueado, consiguen resolver la infección parasitaria en bazo e hígado (David Sacks y col., 2004, Amanda C Stanley y col., 2006) Además, la citocina IFN- γ es fundamental para la activación de macrófagos y eliminación de parásitos. Todos estos datos nos llevan a pensar que la respuesta obtenida con nuestra inmunización es un tipo de respuesta adecuada para la infección por *Leishmania*. Por otro lado, se ha descrito que IL-4 favorece la formación de granulomas hepáticos con actividad *Leishmanicida* y que son esenciales para el desarrollo de una efectiva respuesta de células T induciendo resistencia mediante células T CD8⁺ (B.Ferrua y col., 2006), por lo que podría ser positivo que fuese algo mayor.

Seleccionamos los ratones inmunizados con la proteína quimérica Q5LiP sola y los inmunizados con Q5LiP junto con el oligonucleótido IPB mod, ambos por vía intraperitoneal, para infectar con *L. infantum* y así poder comprobar si estas inmunizaciones generan protección frente a dicha infección. También infectamos ratones inoculados con el oligonucleótido aislado y ratones salinos. Medimos la carga parasitaria en distintos órganos y observamos que en los ratones inoculados con IPB mod aislado y solución salina, hay parásitos en médula ósea y en hígado a las 3 semanas de la infección y luego desaparece, mientras que en los inmunizados con la proteína quimérica Q5LiP y esta misma junto con IPB mod, no hay parásitos en estos órganos en ningún

momento medido tras la infección. En el bazo encontramos parásitos en todos los tiempos medidos tras la infección en los ratones inoculados con IPB mod aislado y solución salina. En los ratones inmunizados con Q5LiP, hay parásitos únicamente a las 6 semanas de la infección y en los inmunizados con Q5LiP junto con IPB mod, hay carga parasitaria a las 3 semanas de la infección pero después desaparece. Estos datos dejan clara la protección generada por la inmunización con la proteína quimérica Q5LiP y esta misma junto el oligonucleótido IPB mod, ya que los ratones inmunizados con ambas eliminan la presencia de parásitos de modo rápido, mientras que los ratones no inmunizados con estas, a las 25 semanas de la infección siguen manteniendo niveles elevados de parásitos en el bazo. La infección con *L.infantum* se caracteriza por la persistencia de parásitos en bazo y en médula ósea, llegando a producir inflamación y pérdida de la estructura del tejido esplénico (B.Ferrua y col., 2006) Resulta fundamental la protección del bazo para considerar eficaz una vacuna, pero muchas de las vacunas ensayadas no consiguen esta protección tan necesaria. Sin embargo, en nuestro caso, si se consigue que el bazo y la médula ósea superen y eliminen la presencia de parásitos, denotando la capacidad protectora de las vacunas ensayadas.

5.3 Capacidad inmunogénica y de inducir protección frente a la infección por *Leishmania major* de los mencionados antígenos de *Leishmania* asociados o no a la h70T y usados como moléculas quiméricas de ADN.

Llevamos a cabo la inmunización de ratones C57BL/6 con el vector pCMV4, en unos ratones conteniendo la secuencia codificante de la proteína Q4Li, en otros ratones conteniendo la secuencia codificante de la proteína Q5Li y otros con el vector vacío. El objetivo era ver la respuesta y protección obtenidas al inmunizar con el ADN que codifica las proteínas anteriormente ensayadas.

La respuesta humoral analizada frente a los 4 antígenos componentes de la proteína quimérica Q4LiP nos permite ver como se produce una respuesta mayoritaria de subtipo IgG2a y escasa respuesta IgG1 (solo en los ratones inmunizados con pQ5Li) Esta respuesta se produce frente Tgp63Li y PSA-NH₂Li, con escasa respuesta IgG2a frente PSA-COOLi en los ratones inmunizados con pQ4Li. Los ratones inmunizados con pQ5Li tienen un

porcentaje de respuesta mucho más elevado que los inmunizados con pQ4Li. Nos permite concluir que la presencia de h70T en el vector también modula la respuesta humoral generada. Esta respuesta humoral es moderada, lo que presenta una ventaja, ya que se ha descrito que la respuesta humoral elevada puede no resultar protectora y favorecer la infección con *L. major* al unirse la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas con su receptor en el macrófago, induciendo la síntesis de IL-10, que como ya se ha descrito anteriormente, no permite la eliminación del parásito y está implicada en procesos de inmunosupresión (Miles y col., 2004; Buxbaum y Scott., 2004) Por este motivo, esta respuesta moderada obtenida en nuestro ensayo, es la adecuada en caso de infección. Estos datos son similares a los descritos anteriormente en ratones inmunizados con pcDNA3-LiP0, los cuales desarrollan respuesta humoral específica tipo Th1 con producción mixta de anticuerpos, predominando IgG2a al inocularles la proteína rLiP0 (Iborra y col., 2005)

La respuesta celular la analizamos mediante proliferación celular frente a los cuatro antígenos componentes de Q4LiP y frente a la proteína quimérica Q4LiP completa. El mayor índice de proliferación se produce frente a la proteína PSA-NH₂Li, siendo muy similar entre los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li. Frente a la proteína quimérica Q4LiP el índice de proliferación es algo menor, pero también muy similar entre ambos grupos. Frente a las proteínas PSA-COOLi y KMP11Li, no se produce proliferación celular. Vemos que no hay diferencia entre la inmunización que contiene h70T y la que no contiene el gen codificante de dicha proteína. Se ha descrito que la inmunización con otras construcciones como pcDNA3-LiP0, está relacionada con la capacidad de aumentar la proliferación celular frente a dicho antígeno (Salvador Iborra y col., 2005)

La inmunización con pQ4Li y pQ5Li activa mayoritariamente la producción de TNF- α , principalmente frente a las proteínas PSA-NH₂Li y Tgp63Li. La producción de IFN- γ es menor a la anteriormente mencionada pero sigue un patrón similar de respuesta. IFN- γ activa la capacidad parasiticida de los macrófagos mediante la síntesis de Óxido nítrico sintasa (C. B. Palatnik-de-Sousa, 2008) Las citocinas IL-4, IL-5 e IL-2 no tienen producción significativa. Estos datos reflejan la activación de respuesta celular tipo Th1, respuesta que favorece la defensa frente a la infección por *Leishmania sp.* (Sacks y col., 2004;

Patricia A Darrah y col., 2007) Es favorable que la producción de IL-4 sea escasa ya que esta citocina, al igual que IL-10, inhibe la producción de IFN- γ , suprimiendo la respuesta protectora (Sacks y col., 2004) Estos datos concuerdan con la afirmación de que la inmunización con pcDNA3-rLiPO, genera una mayor producción de IFN- γ en bazo y ganglios linfáticos, implicando respuesta Th1, la cual favorece la protección frente a la infección (Salvador Iborra y col., 2005), mientras que la respuesta Th2 está asociada a la progresión de lesiones y enfermedad sistémica (C. B. Palatnik-de-Sousa, 2008)

Empleamos ratones C57BL/6-A2K^b para determinar si se produce activación de respuesta citotóxica (CD8⁺) Los ratones inmunizados con pQ5Li y pQ4Li presentan índices de lisis celular elevados, siendo mayor este en los inmunizados con pQ5Li. Este resultado nos permite concluir que la inmunización con estas construcciones activa la respuesta celular en caso de enfrentarse a la proteína recombinante a estudio y que la presencia de h70T favorece aún más esta respuesta citotóxica. Este es un hecho positivo ya que la activación de células CD8⁺ favorece la protección frente a la infección por *L. major* (Diane McMahon-Pratt y James Alexander, 2004)

Tras analizar la respuesta inmunológica generada tras la inmunización llevamos a cabo la infección con *L. major* en las orejas de los ratones para estudiar si la respuesta inmunológica generada permite superar la infección. La infección consiste en la inoculación de 500 parásitos por oreja (Belkaid y col., 1998; Iborra y col., 2005). Las lesiones en las orejas las medimos semanalmente comprobando que los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li presentan pequeña inflamación que desde 6 semanas tras la infección empieza a disminuir, sin embargo, los ratones inoculados con pCMV4 y solución salina presentan lesiones que van aumentando con el tiempo. Por lo tanto, la inmunización con estas construcciones protege frente a esta infección a nivel de lesiones cutáneas, ya que consigue reducirlas o incluso superarlas. Ensayos en los que se ha infectado ratones inmunizados con el antígeno LiPO en forma de vacuna de ADN, se ha visto reducción del tamaño de las lesiones en las orejas de estos ratones inmunizados respecto a los ratones no inmunizados (Salvador Iborra y col., 2005) concordando con nuestros datos.

Referente a la carga parasitaria presente en las orejas, los ratones inmunizados presentan menores niveles de carga que los ratones control, siendo este otro punto a favor de la protección generada. Este dato coincide

con lo descrito por Salvador Iborra en ratones inmunizados con LiP0 en forma de ADN. Se ha descrito que ratones C57BL/6 que pierden completamente la presencia de parásitos, pierden la capacidad de generar memoria y la resistencia se ve disminuida (B.Ferrua y col., 2006) Los ratones empleados aquí e inmunizados previa infección presentan niveles bajos de carga parasitaria, por lo que existe la posibilidad de que tengan capacidad de generar memoria.

La respuesta humoral generada es exclusivamente de subtipo IgG2a frente a las proteínas analizadas, siendo más elevada frente PSA-NH₂Li. La respuesta varía según la inmunización, ya que los ratones inmunizados con pQ5Li presentan un valor menor de respuesta que los inmunizados con pQ4Li, pero el porcentaje de ratones que responden es mucho más elevado, únicamente presentando respuesta frente a PSA-NH₂Li. Los ratones inmunizados con pQ4Li presentan respuesta frente a esta y frente a PSA-COOLi y Tgp63Li, pero en porcentajes de respuesta reducidos. Frente KMP11Li no hay respuesta en ningún caso, coincidiendo con datos que afirman que frente a la proteína KMP11 de *L.infantum* los ratones C57BL/6 infectados con *L.major* no desarrollan respuesta significativa IgG1 ni IgG2a (Iniesta y col., 2008) Los ratones inoculados con pCMV4 presentan pequeña respuesta frente PSA-NH₂Li y PSA-COO tras la infección y pensamos que puede ser debido a que la presencia de secuencias CpG en el vector hace que la respuesta frente a la infección se vea favorecida. Volvemos a encontrar respuesta humoral moderada, que ya hemos descrito como factor positivo para la protección y superación de la infección. En la bibliografía se ha descrito que los ratones C57BL/6 desarrollan respuesta IgG2a frente a antígenos totales de *L.major* tras la infección con dicho parásito, presentándose respuesta IgG1 muy escasa y presente solamente entre los días 28 y 42 tras la infección (Iniesta y col., 2008)

La producción de citocinas es mayor frente a las proteínas PSA-NH₂Li y Tgp63Li, presentando mayores niveles de producción de TNF- α e IFN- γ . La producción de IL-2, IL-4 e IL-5 es pequeña, siendo mayor en los ratones inoculados con pCMV4 y solución salina. Los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li presentan niveles de producción muy similares en todos los casos. A las 16 semanas de la infección la producción de citocinas la medimos frente la proteína quimérica completa Q4Li. La producción más elevada es de las

citocinas TNF- α e IFN- γ . Esta producción es mayor en los ratones inmunizados con pQ4Li y pQ5Li y los inoculados con pCMV4, sin embargo los salinos presentan una producción mucho menor de IFN- γ . Respecto a IL-2, IL-4 e IL-5, los niveles son muy bajos, menores a 10 pg/ml en todos los casos. Estos datos de la producción de citoquinas muestran una respuesta tipo Th1 que es la respuesta descrita como favorable para superar las lesiones causadas por la infección (Sacks y col., 2004; Patricia A Darrah y col., 2007) El tipo de citocinas producidas está implicado en la capacidad de generar células efectoras y células memoria (Patricia A Darrah y col., 2007) IL-2 e IFN- γ son las citocinas que aumentan la capacidad de generar células memoria. TNF- α está implicada en el control de la infección extracelular. La combinación de TNF- α e IFN- γ es fundamental para superar la infección. Estas dos citocinas junto con IL-2 son muy importantes en la función efectora y protectora (Patricia A Darrah y col., 2007) El laboratorio de Patricia A Darrah ha descrito como ratones C57BL/6 infectados con *L.major*, resuelven las lesiones cutáneas al presentar respuesta celular tipo Th1 con alta producción de IFN- γ y TNF.

6. CONCLUSIONES

6.1. La proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi*, así como el fragmento (h70T) de 29kDa de ésta, presentan capacidad adyuvante activando la producción de anticuerpos específicos frente a moléculas asociadas a ellas como proteína de fusión. La actividad adyuvante se ve modificada en función de la edad y haplotipo de ratón, vía de inoculación y naturaleza del antígeno fusionado.

6.2. Se identifica a un fragmento de 12 kDa (h70TC) situado en la mitad amino de la proteína HSP70 de *T. cruzi*, como responsable, en gran medida, de la capacidad de la mencionada proteína HSP70 de generar linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno al que se fusiona.

6.3. Las moléculas quiméricas Q4Li (conteniendo los antígenos KMP11, PSA (fragmentos amino y carboxilo) y el fragmento central de la proteína gp63) y Q5Li (que incorpora el fragmento h70T con actividad adyuvante), empleadas en forma de proteína recombinante, generan una respuesta humoral y celular tipo Th1 frente a los antígenos componentes de las mismas en ratones BALB/c y C57BL/6. La inoculación de la molécula Q5Li junto con secuencias CpG aumenta el nivel de la respuesta Th1 generada e induce protección frente a la infección por *Leishmania infantum* en ratones BALB/c.

6.4. La inmunización con las mencionadas moléculas quiméricas, usadas como vectores de ADN (pQ4Li y pQ5Li) inducen una respuesta de anticuerpos de isotipo IgG2a dirigida preferentemente frente a la región amino del antígeno PSA y fragmento central de la proteína Tgp63. Los ratones inmunizados con éstas moléculas quiméricas muestran significativos índices de proliferación celular con un incremento en la secreción de las citocinas TNF- α e IFN- γ .

6.5. La inmunización de ratones inmunizados con la molécula quimérica pQ5Li induce linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de los antígenos de *Leishmania* que porta la quimera.

6.6. La inmunización con la molécula quimérica pQ4Li y, especialmente, con la molécula pQ5Li inducen protección frente a la infección experimental murina con *Leishmania major*, medida como reducción de la lesión en el tejido infectado y significativa reducción de la carga parasitaria en el mismo. Además estas moléculas inducen células memoria capaces de proteger parcialmente frente a la infección por *L. major*.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, J. and D. G. Russell (1992). "The interaction of Leishmania species with macrophages." Adv Parasitol **31**: 175-254.
- Anderson, K. M. and P. K. Srivastava (2000). "Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses." Immunol Lett **74**(1): 35-9.
- Asea, A., E. Kabingu, et al. (2000). "HSP70 peptidbearing and peptide-negative preparations act as chaperokines." Cell Stress Chaperones **5**(5): 425-31.
- Asea, A., M. Rehli, et al. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Biol Chem **277**(17): 15028-34.
- Badiee, A., M. R. Jaafari, et al. (2007). "Leishmania major: immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes." Exp Parasitol **115**(2): 127-34.
- Bahr, V., Y. D. Stierhof, et al. (1993). "Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of Leishmania mexicana." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 107-21.
- Baratta-Masini, A., A. Teixeira-Carvalho, et al. (2007). "Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance." Front Biosci **12**: 839-49.
- Bart, G., M. J. Frame, et al. (1997). "Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of Leishmania mexicana." Mol Biochem Parasitol **88**(1-2): 53-61.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2001). "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." Immunity **14**(3): 303-13.
- Basu, S., R. J. Binder, et al. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol **12**(11): 1539-46.
- Basu, S. and P. K. Srivastava (1999). "Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity." J Exp Med **189**(5): 797-802.
- Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, et al. (2001). "The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure." J Exp Med **194**(10): 1497-506.
- Beverley, S. M. and S. J. Turco (1998). "Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania." Trends Microbiol **6**(1): 35-40.
- Binder, R. J., D. K. Han, et al. (2000). "CD91: a receptor for heat shock protein gp96." Nat Immunol **1**(2): 151-5.
- Binder, R. J., M. L. Harris, et al. (2000). "Saturation, competition, and specificity in interaction of heat shock proteins (hsp) gp96, hsp90, and hsp70 with CD11b+ cells." J Immunol **165**(5): 2582-7.
- Binder, R. J., R. Vatner, et al. (2004). "The heat-shock protein receptors: some answers and more questions." Tissue Antigens **64**(4): 442-51.
- Blachere, N. E., Z. Li, et al. (1997). "Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity." J Exp Med **186**(8): 1315-22.

- Boceta, C., C. Alonso, et al. (2000). "Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis." Parasite Immunol **22**(2): 55-62.
- Brake, D. A. (2003). "Parasites and immune responses: memory illusion?" DNA Cell Biol **22**(6): 405-19.
- Cabrera, M., J. M. Blackwell, et al. (2000). "Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients." Parasite Immunol **22**(2): 73-9.
- Campbell, D. A., D. A. Thornton, et al. (1984). "Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen genes." Nature **311**(5984): 350-5.
- Carmelo, E., A. I. Zurita, et al. (2006). "The sera from individuals suffering from cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* present antibodies against parasitic conserved proteins, but not their human counterparts." Parasite **13**(3): 231-6.
- Carrion, J., C. Folgueira, et al. (2008). "Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania* major infection: the result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines." Vaccine **26**(9): 1155-65.
- Carter, K. C., F. L. Henriquez, et al. (2007). "DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against *Leishmania donovani* infection." Vaccine **25**(22): 4502-9.
- Castellino, F., P. E. Boucher, et al. (2000). "Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways." J Exp Med **191**(11): 1957-64.
- Coler, R. N. and S. G. Reed (2005). "Second-generation vaccines against leishmaniasis." Trends Parasitol **21**(5): 244-9.
- Condon, C., S. C. Watkins, et al. (1996). "DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1122-8.
- Connell, N. D., E. Medina-Acosta, et al. (1993). "Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11473-7.
- Convit, J., M. Ulrich, et al. (2004). "Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report." Mem Inst Oswaldo Cruz **99**(1): 57-62.
- Convit, J., M. Ulrich, et al. (2003). "Immunotherapy of american cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99." Trans R Soc Trop Med Hyg **97**(4): 469-72.
- Corr, M., D. J. Lee, et al. (1996). "Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming." J Exp Med **184**(4): 1555-60.
- Cote-Sierra, J., A. Bredan, et al. (2002). "Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against *Leishmania* major." Infect Immun **70**(1): 240-8.
- Cuellar, A., S. P. Santander, et al. (2008). "Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients vs healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70." Immunol Cell Biol **86**(3): 255-60.

- Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania." Exp Mol Pathol **72**(2): 132-41.
- Chappuis, F., S. Sundar, et al. (2007). "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat Rev Microbiol **5**(11): 873-82.
- Chenik, M., H. Louzir, et al. (2006). "Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of Leishmania protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with Leishmania major." Vaccine **24**(14): 2521-9.
- Chow, Y. H., B. L. Chiang, et al. (1998). "Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes." J Immunol **160**(3): 1320-9.
- Darrah, P. A., D. T. Patel, et al. (2007). "Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major." Nat Med **13**(7): 843-50.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-18.
- Diez, H., L. Sarmiento, et al. (2008). "Cellular location of KMP-11 protein in Trypanosoma rangeli." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(1): 93-6.
- Diez, H., M. C. Thomas, et al. (2005). "Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite Trypanosoma rangeli." Parasitology **130**(Pt 6): 643-51.
- Feltquate, D. M., S. Heaney, et al. (1997). "Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization." J Immunol **158**(5): 2278-84.
- Field, A. E., S. Wagage, et al. (2007). "Reduced pathology following infection with transgenic Leishmania major expressing murine CD40 ligand." Infect Immun **75**(6): 3140-9.
- Flo, J., S. Tisminetzky, et al. (2000). "Modulation of the immune response to DNA vaccine by co-delivery of costimulatory molecules." Immunology **100**(2): 259-67.
- Folgueira, C., L. Quijada, et al. (2005). "The translational efficiencies of the two Leishmania infantum HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms." J Biol Chem **280**(42): 35172-83.
- Folgueira, C. and J. M. Requena (2007). "Pitfalls of the CAT reporter gene for analyzing translational regulation in Leishmania." Parasitol Res **101**(5): 1449-52.
- Fuertes, M. A., C. Berberich, et al. (1999). "Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from Leishmania infantum." Eur J Biochem **260**(2): 559-67.
- Galvao, C. and J. A. Shayman (1990). "The phosphatidylinositol synthase of proximal tubule cells." Biochim Biophys Acta **1044**(1): 34-42.
- Garcia-Cordoba, F., F. J. Ortuno, et al. (2005). "Fatal visceral leishmaniasis, with massive bone-marrow infection, in an immunosuppressed but HIV-negative Spanish patient, after the initiation of treatment with meglumine antimoniate." Ann Trop Med Parasitol **99**(2): 125-30.
- Ge, F. F., Y. F. Qiu, et al. (2007). "An hsp70 fusion protein vaccine potentiates the immune response against Japanese encephalitis virus." Arch Viro **152**(1): 125-35.
- Ghosh, A., W. W. Zhang, et al. (2001). "Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against Leishmania donovani infections." Vaccine **20**(1-2): 59-66.

- Gicheru, M. M., J. O. Olobo, et al. (2001). "Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection." Infect Immun **69**(1): 245-51.
- Goel, A., H. Vohra, et al. (1999). "Strain-specific recognition of live *Leishmania donovani* promastigotes by homologous antiserum raised against a crude membrane fraction of infected macrophages." Parasitol Res **85**(1): 19-24.
- Gomes, D. C., E. F. Pinto, et al. (2007). "Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice." Vaccine **25**(12): 2168-72.
- Gonzalez, A. C., M. C. Thomas, et al. (2004). "Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*." Parasitology **128**(Pt 2): 139-47.
- Gonzalo, R. M., G. del Real, et al. (2002). "A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis." Vaccine **20**(7-8): 1226-31.
- Gonzalo, R. M., J. R. Rodriguez, et al. (2001). "Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36." Microbes Infect **3**(9): 701-11.
- Gullo, C. A. and G. Teoh (2004). "Heat shock proteins: to present or not, that is the question." Immunol Lett **94**(1-2): 1-10.
- Gurunathan, S., D. L. Sacks, et al. (1997). "Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*." J Exp Med **186**(7): 1137-47.
- Haker, H. (1999). "Ethics in human genetics." J Int Bioethique **10**(4): 35-44.
- Handman, E. (1999). "Cell biology of *Leishmania*." Adv Parasitol **44**: 1-39.
- Handman, E. (2001). "Leishmania virulence: it's a knock out!" Trends Parasitol **17**(2): 60.
- Handman, E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." Clin Microbiol Rev **14**(2): 229-43.
- Handman, E. and J. W. Goding (1985). "The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate." Embo J **4**(2): 329-36.
- Handman, E., F. M. Symons, et al. (1995). "Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response." Infect Immun **63**(11): 4261-7.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-8.
- Hartmann, G., G. J. Weiner, et al. (1999). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9305-10.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-9.
- Herwaldt, B. L. (1999). "Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis?" N Engl J Med **341**(24): 1840-2.

- Hightower, L. E. and P. T. Guidon, Jr. (1989). "Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins." *J Cell Physiol* **138**(2): 257-66.
- Iborra, S., M. Soto, et al. (2004). "Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis." *Vaccine* **22**(29-30): 3865-76.
- Ilg, T., Y. D. Stierhof, et al. (1996). "Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites." *J Biol Chem* **271**(35): 21583-96.
- Jakob, T., P. S. Walker, et al. (1998). "Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA." *J Immunol* **161**(6): 3042-9.
- Jimenez-Ruiz, A., C. Boceta, et al. (1998). "Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*." *Eur J Biochem* **251**(1-2): 389-97.
- Kane, M. M. and D. M. Mosser (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis." *J Immunol* **166**(2): 1141-7.
- Kaufmann, S. H. (1990). "Heat shock proteins and the immune response." *Immunol Today* **11**(4): 129-36.
- Kaye, P. M., M. Svensson, et al. (2004). "The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis." *Immunol Rev* **201**: 239-53.
- Kedzierski, L., J. Montgomery, et al. (2004). "A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3." *J Immunol* **172**(8): 4902-6.
- Kedzierski, L., Y. Zhu, et al. (2006). "*Leishmania* vaccines: progress and problems." *Parasitology* **133** Suppl: S87-S112.
- Kemp, M., E. Handman, et al. (1998). "The *Leishmania* promastigote surface antigen-2 (PSA-2) is specifically recognised by Th1 cells in humans with naturally acquired immunity to *L. major*." *FEMS Immunol Med Microbiol* **20**(3): 209-18.
- Kim, J. J., M. L. Bagarazzi, et al. (1997). "Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes." *Nat Biotechnol* **15**(7): 641-6.
- Klein, E., G. Klein, et al. (1960). "Further studies on isoantigenic variation in mouse carcinomas and sarcomas." *J Natl Cancer Inst* **25**: 271-94.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* **374**(6522): 546-9.
- Kulkarni, M. M., W. R. McMaster, et al. (2006). "The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing." *Mol Microbiol* **62**(5): 1484-97.
- Kuppner, M. C., R. Gastpar, et al. (2001). "The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors." *Eur J Immunol* **31**(5): 1602-9.
- Laemmli, U. K. (1975). "Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(11): 4288-92.
- Lainson, R., J. J. Shaw, et al. (1987). "Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**(4): 702-3.

- Lake, J. A., V. F. de la Cruz, et al. (1988). "Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4779-83.
- Lehner, T., Y. Wang, et al. (2004). "Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity." Biochem Soc Trans **32**(Pt 4): 629-32.
- Letvin, N. L., J. R. Mascola, et al. (2006). "Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys." Science **312**(5779): 1530-3.
- Lincoln, L. M., M. Ozaki, et al. (2004). "Genetic complementation of Leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement." Mol Biochem Parasitol **137**(1): 185-9.
- Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). "The heat-shock proteins." Annu Rev Genet **22**: 631-77.
- Lipoldova, M. and P. Demant (2006). "Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis." Nat Rev Genet **7**(4): 294-305.
- Maranon, C., L. Planelles, et al. (2000). "HSP70 from Trypanosoma cruzi is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis." Int Immunol **12**(12): 1685-93.
- Maranon, C., M. C. Thomas, et al. (2001). "The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the T. cruzi KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes." Mol Immunol **38**(4): 279-87.
- Maresca, B. and G. S. Kobayashi (1994). "Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen." Experientia **50**(11-12): 1067-74.
- McConville, M. J. and J. M. Blackwell (1991). "Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of Leishmania donovani. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids." J Biol Chem **266**(23): 15170-9.
- McConville, M. J. and M. A. Ferguson (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes." Biochem J **294** (Pt 2): 305-24.
- McConville, M. J., L. F. Schnur, et al. (1995). "Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species." Biochem J **310** (Pt 3): 807-18.
- McConville, M. J., J. E. Thomas-Oates, et al. (1990). "Structure of the lipophosphoglycan from Leishmania major." J Biol Chem **265**(32): 19611-23.
- Melby, P. C., G. B. Ogden, et al. (2000). "Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library." Infect Immun **68**(10): 5595-602.
- Melby, P. C., J. Yang, et al. (2001). "Leishmania donovani p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis." Infect Immun **69**(8): 4719-25.
- Mendez, S., Y. Belkaid, et al. (2002). "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis." Vaccine **20**(31-32): 3702-8.
- Mendez, S., S. Gurunathan, et al. (2001). "The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against Leishmania major evaluated using low-dose, intradermal challenge." J Immunol **166**(8): 5122-8.
- Mendez, S., K. Tabbara, et al. (2003). "Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live

- vaccine against cutaneous Leishmaniasis but maintains its potency and durability." Infect Immun **71**(9): 5121-9.
- Mendonca, S. C., D. G. Russell, et al. (1991). "Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of Leishmania: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63)." Clin Exp Immunol **83**(3): 472-8.
- Michels, P. A. and V. Hannaert (1994). "The evolution of kinetoplastid glycosomes." J Bioenerg Biomembr **26**(2): 213-9.
- Montgomery, J., T. Ilg, et al. (2000). "Identification and predicted structure of a leucine-rich repeat motif shared by Leishmania major proteophosphoglycan and Parasite Surface Antigen 2." Mol Biochem Parasitol **107**(2): 289-95.
- Moroi, Y., M. Mayhew, et al. (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): 3485-90.
- Moron, B., A. Cebolla, et al. (2008). "Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide." Am J Clin Nutr **87**(2): 405-14.
- Mottram, J. C., C. D. Robertson, et al. (1992). "A developmentally regulated cysteine proteinase gene of Leishmania mexicana." Mol Microbiol **6**(14): 1925-32.
- Mougneau, E., F. Altare, et al. (1995). "Expression cloning of a protective Leishmania antigen." Science **268**(5210): 563-6.
- Nakhaee, A., T. Taheri, et al. (2004). "Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of Leishmania infantum are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population." Vet Parasitol **119**(2-3): 107-23.
- Nascimento, E., W. Mayrink, et al. (1990). "Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses." Infect Immun **58**(7): 2198-203.
- Nichols, W. W., B. J. Ledwith, et al. (1995). "Potential DNA vaccine integration into host cell genome." Ann N Y Acad Sci **772**: 30-9.
- Noessner, E., R. Gastpar, et al. (2002). "Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells." J Immunol **169**(10): 5424-32.
- Noyes, H. A., M. L. Chance, et al. (1998). "Leishmania (sauroleishmania): a comment on classification." Parasitol Today **14**(4): 167.
- Olobo, J. O., C. O. Anjili, et al. (1995). "Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant Leishmania 'major surface glycoprotein' (gp63)." Vet Parasitol **60**(3-4): 199-212.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years." Vaccine **26**(14): 1709-24.
- Panjwani, N. N., L. Popova, et al. (2002). "Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs." J Immunol **168**(6): 2997-3003.
- Pascual, I., S. Monasterio, et al. (2007). "[Acute abdominal pain due to visceral Leishmaniasis in an AIDS patient]." Rev Esp Enferm Dig **99**(1): 51-2.
- Pasion, S. G., G. W. Brown, et al. (1994). "Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle." J Cell Sci **107** (Pt 12): 3515-20.
- Passos, S., L. P. Carvalho, et al. (2005). "Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis." Clin Diagn Lab Immunol **12**(10): 1164-7.

- Pavlenko, M., A. K. Roos, et al. (2004). "Comparison of PSA-specific CD8+ CTL responses and antitumor immunity generated by plasmid DNA vaccines encoding PSA-HSP chimeric proteins." Cancer Immunol Immunother **53**(12): 1085-92.
- Pertmer, T. M., T. R. Roberts, et al. (1996). "Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery." J Virol **70**(9): 6119-25.
- Piani, A., T. Ilg, et al. (1999). "Leishmania major proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function." Microbes Infect **1**(8): 589-99.
- Pinto, E. F., R. O. Pinheiro, et al. (2004). "Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK." Infect Immun **72**(8): 4521-7.
- Planelles, L., M. Thomas, et al. (2002). "Trypanosoma cruzi heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells." Immunol Cell Biol **80**(3): 241-7.
- Planelles, L., M. C. Thomas, et al. (2001). "DNA immunization with Trypanosoma cruzi HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection." Infect Immun **69**(10): 6558-63.
- Puentes, F., F. Guzman, et al. (1999). "Leishmania: fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization." Exp Parasitol **93**(1): 7-22.
- Qazi, K. R., W. Oehlmann, et al. (2007). "Microbial heat shock protein 70 stimulatory properties have different TLR requirements." Vaccine **25**(6): 1096-103.
- Quijada, L., M. Soto, et al. (1997). "Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked Leishmania infantum hsp70 genes." J Biol Chem **272**(7): 4493-9.
- Quijada, L., M. Soto, et al. (2000). "Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in Leishmania infantum." Mol Biochem Parasitol **110**(1): 79-91.
- Rafati, S., E. Gholami, et al. (2007). "Leishmania major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients." Vaccine **25**(21): 4159-69.
- Rafati, S., A. H. Salmanian, et al. (2001). "A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of Leishmania major." Vaccine **19**(25-26): 3369-75.
- Ramirez, J. R., C. Berberich, et al. (1998). "Molecular and antigenic characterization of the Leishmania (Viannia) panamensis kinetoplastid membrane protein-11." Mem Inst Oswaldo Cruz **93**(2): 247-54.
- Ramirez, J. R., K. Gilchrist, et al. (2001). "Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice." Vaccine **20**(3-4): 455-61.
- Ramiro, M. J., J. J. Zarate, et al. (2003). "Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK." Vaccine **21**(19-20): 2474-84.

- Ramos, I., A. Alonso, et al. (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response." *Vaccine* **26**(3): 333-44.
- Requena, J. M., S. Iborra, et al. (2004). "Recent advances in vaccines for leishmaniasis." *Expert Opin Biol Ther* **4**(9): 1505-17.
- Requena, J. M., M. C. Lopez, et al. (1988). "A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*." *Nucleic Acids Res* **16**(4): 1393-406.
- Requena, J. M., M. C. Lopez, et al. (1989). "Complete nucleotide sequence of the hsp70 gene of *T. cruzi*." *Nucleic Acids Res* **17**(2): 797.
- Rico, A. I., S. O. Angel, et al. (1999). "Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83." *Mol Immunol* **36**(17): 1131-9.
- Riera, C., R. Fisa, et al. (2005). "Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with leishmania and human immunodeficiency virus." *Am J Trop Med Hyg* **73**(6): 1012-5.
- Ritossa, P. (1962). "[Problems of prophylactic vaccinations of infants.]" *Riv Ist Sieroter Ital* **37**: 79-108.
- Robertson, J. S. (1994). "Safety considerations for nucleic acid vaccines." *Vaccine* **12**(16): 1526-8.
- Rodriguez-Cortes, A., A. Ojeda, et al. (2007). "Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge." *Vaccine* **25**(46): 7962-71.
- Russell, D. G. and J. Alexander (1988). "Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes." *J Immunol* **140**(4): 1274-9.
- Russo, D. M., J. M. Burns, Jr., et al. (1991). "Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*." *J Immunol* **147**(10): 3575-80.
- Sacks, D. and C. Anderson (2004). "Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice." *Immunol Rev* **201**: 225-38.
- Sacks, D. L. (1989). "Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes." *Exp Parasitol* **69**(1): 100-3.
- Sacks, D. L., E. M. Saraiva, et al. (1994). "The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence." *Parasitology* **108 Suppl**: S55-62.
- Schlein, Y. (1993). "*Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission." *Parasitol Today* **9**(7): 255-8.
- Sharples, C. E., M. A. Shaw, et al. (1994). "Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed leishmanial promastigotes: antibody responses to mycobacterial and leishmanial antigens." *Vaccine* **12**(15): 1402-12.
- Shaw, J. J. (1994). "Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **89**(3): 471-8.
- Simpson, L. (1987). "The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution." *Annu Rev Microbiol* **41**: 363-82.
- Sjolander, A., T. M. Baldwin, et al. (1998). "Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection." *Vaccine* **16**(20): 2077-84.
- Sogin, M. L., H. J. Elwood, et al. (1986). "Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(5): 1383-7.

- Souza, A. E., S. Waugh, et al. (1992). "Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*." FEBS Lett **311**(2): 124-7.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, et al. (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." Eur J Immunol **28**(6): 2045-54.
- Spath, G. F., L. F. Lye, et al. (2004). "Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies." Infect Immun **72**(6): 3622-7.
- Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 395-425.
- Srivastava, P. K. (2000). "Immunotherapy of human cancer: lessons from mice." Nat Immunol **1**(5): 363-6.
- Srivastava, P. K., A. Menoret, et al. (1998). "Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world." Immunity **8**(6): 657-65.
- Srivastava, P. K., H. Udono, et al. (1994). "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming." Immunogenetics **39**(2): 93-8.
- Srivastava, S. K. and D. A. Barnum (1982). "Lymphocyte stimulation response in horses against phytohaemagglutinin and M protein of *Streptococcus equi* using whole blood." Can J Comp Med **46**(1): 51-6.
- Stager, S., D. F. Smith, et al. (2000). "Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis." J Immunol **165**(12): 7064-71.
- Stierhof, Y. D., P. A. Bates, et al. (1999). "Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors." Eur J Cell Biol **78**(10): 675-89.
- Streit, J. A., T. J. Recker, et al. (2000). "BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice." Exp Parasitol **94**(1): 33-41.
- Suffia, I., B. Ferrua, et al. (2000). "A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis." Infect Immun **68**(2): 630-6.
- Suzue, K. and R. A. Young (1996). "Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24." J Immunol **156**(2): 873-9.
- Telford, S. R., Jr. (1979). "Evolutionary implications of *Leishmania* amastigotes in circulating blood cells of lizards." Parasitology **79**(3): 317-24.
- Tewary, P., B. Sukumaran, et al. (2004). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen." Vaccine **22**(23-24): 3053-60.
- Thomas, M. C., J. L. Garcia-Perez, et al. (2000). "Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level." DNA Cell Biol **19**(1): 47-57.
- Thomas, M. C., M. V. Longobardo, et al. (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**(3): 465-71.

- Tibayrenc, M., K. Neubauer, et al. (1993). "Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(4): 1335-9.
- Titus, R. G., F. J. Gueiros-Filho, et al. (1995). "Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10267-71.
- Tobian, A. A., D. H. Canaday, et al. (2004). "Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages." J Immunol **172**(9): 5277-86.
- Tonui, W. K. and R. G. Titus (2007). "Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. Braziliensis* caused by vaccination with *L. Major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice." Am J Trop Med Hyg **76**(3): 579-84.
- Torres, C. A., A. Iwasaki, et al. (1997). "Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations." J Immunol **158**(10): 4529-32.
- Tsang, C., S. Babiuk, et al. (2007). "A single DNA immunization in combination with electroporation prolongs the primary immune response and maintains immune memory for six months." Vaccine **25**(30): 5485-94.
- Turco, S. J. and A. Descoteaux (1992). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites." Annu Rev Microbiol **46**: 65-94.
- Turco, S. J., S. R. Hull, et al. (1987). "Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan." Biochemistry **26**(19): 6233-8.
- Udono, H. and P. K. Srivastava (1993). "Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity." J Exp Med **178**(4): 1391-6.
- Udono, H., T. Yamano, et al. (2001). "Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70." Int Immunol **13**(10): 1233-42.
- Ulmer, J. B. and G. R. Otten (2000). "Priming of CTL responses by DNA vaccines: direct transfection of antigen presenting cells versus cross-priming." Dev Biol (Basel) **104**: 9-14.
- Ullrich, S. J., E. A. Robinson, et al. (1986). "A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3121-5.
- Uzonna, J. E., G. F. Spath, et al. (2004). "Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response." J Immunol **172**(6): 3793-7.
- Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, et al. (2002). "HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway." J Biol Chem **277**(17): 15107-12.
- Van Eden, W., G. Wick, et al. (2007). "Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases." Ann N Y Acad Sci **1113**: 217-37.
- Vitiello, A., D. Marchesini, et al. (1991). "Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex." J Exp Med **173**(4): 1007-15.
- Wang, X. Y., X. Chen, et al. (2000). "Characterization of native interaction of hsp110 with hsp25 and hsc70." FEBS Lett **465**(2-3): 98-102.
- Wang, Y., C. G. Kelly, et al. (2002). "Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70." J Immunol **169**(5): 2422-9.

- Wolday, D., H. Akuffo, et al. (1999). "Role of Leishmania donovani and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication." Infect Immun **67**(10): 5258-64.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Wright, A. D., S. Li, et al. (1999). "Phylogenetic position of the kinetoplastids, Cryptobia bullocki, Cryptobia catostomi, and Cryptobia salmositica and monophyly of the genus Trypanosoma inferred from small subunit ribosomal RNA sequences." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 69-76.
- Wu, Y., T. Wan, et al. (2005). "Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8+ CTL response by dendritic cell vaccine." Cancer Res **65**(11): 4947-54.
- Xu, D. and F. Y. Liew (1994). "Genetic vaccination against leishmaniasis." Vaccine **12**(16): 1534-6.
- Xu, D., S. J. McSorley, et al. (1995). "Protection against Leishmania major infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated Salmonella typhimurium (AroA- AroD-)." Immunology **85**(1): 1-7.
- Yang, D. M., N. Fairweather, et al. (1990). "Oral Salmonella typhimurium (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis." J Immunol **145**(7): 2281-5.
- Zijlstra, E. E., A. M. el-Hassan, et al. (1994). "Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **51**(6): 826-36.
- Zugel, U. and S. H. Kaufmann (1999). "Immune response against heat shock proteins in infectious diseases." Immunobiology **201**(1): 22-35.
- Zurita, A. I., J. Rodriguez, et al. (2003). "Cloning and characterization of the Leishmania (Viannia) braziliensis Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663)." J Parasitol **89**(2): 372-8.