

Tesis de Licenciatura

La proteína de choque térmico de Leishmania infantum LiHsp83 estimula una potente respuesta inmune humoral y celular contra un antígeno reportero en ausencia de adjuvante

Echeverría, Pablo Christian

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Echeverría, Pablo Christian. (). La proteína de choque térmico de Leishmania infantum LiHsp83 estimula una potente respuesta inmune humoral y celular contra un antígeno reportero en ausencia de adjuvante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000689_Echeverria

Cita tipo Chicago:

Echeverría, Pablo Christian. "La proteína de choque térmico de Leishmania infantum LiHsp83 estimula una potente respuesta inmune humoral y celular contra un antígeno reportero en ausencia de adjuvante". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000689_Echeverria

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas



Tesis de Licenciatura

La proteína de choque térmico de *Leishmania infantum* LiHsp83 estimula una potente respuesta inmune humoral y celular contra un antígeno reportero en ausencia de adjuvante.

Pablo Christian Echeverria

PABLO C. ECHEVERRIA

Director: Dr Sergio Oscar Angel

Sergio
Dr. SERGIO

Laboratorio de toxoplasmosis
Instituto Nacional de Parasitología
“Dr Mario Fatala Chaben”
A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”

Nº 06897

Marzo de 1999

*A mis viejos, Alma y Honorio quienes con su apoyo y comprensión hicieron
posible la realización de mi carrera .*

Agradecimientos

A mi director y amigo, el Dr. Sergio O. Angel por ser el principal responsable de que nuestro laboratorio no sólo sea un lugar dónde recibir una formación de excelencia, si no también un lugar donde pasar buenos momentos.

A toda la gente del Departamento de Parasitología del A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", especialmente a la Dra. Viviana Pszenny, la Dra. Mariana Matraj (ahora en USA), Graciela Pereda (por su ayuda y consejos), Suky (ahora muy lejos pero bien recordada), Valentina (mi querida compañerita de labo) Mónica, Cecilia y Paola (todas por su gran ayuda), Ariana, Laurita y Mara.

Al instituto, a los Drs. Eduardo Guarnera y Andrés Ruiz por permitir y apoyar la realización de éste trabajo.

A las Dras. Graciela Dran y Edith Kordon de la Academia Nacional de Medicina, por su ayuda técnica y consejos.

A LOS CONSTIPADOS e hinchada (con esto quiero significar a todo el entorno constipado, y no solo a Luciana) en quienes se resume gran parte de lo muy bueno que tuve en la facultad.

A Nara mi amiga del alma y/o hermanita, por su inigualable compañía dentro y fuera de la facu.

A Malena, Argos y Ana (todos Chorroarin) tres seres impresionantemente queribles.

A Guillermo y Walter por bancarme en el uso de la compu, en tiempo y lugar no permitidos.

A Brownie, quien me acompañó con su presencia incondicional y consejos sabios durante las "largas" horas de estudio de éstos últimos años.

Y cómo olvidarme de quien me otorga inmensa alegría y felicidad mientras culmino este trabajo, Tamara, gracias por hoy y por ayer.

Gracias, a Guille Zaccardi (compañero de divagues), a Mariela, Marina y Martín, a Paula, Amaicha, Mariano, Florencia, H.P.L.C. (grupo clandestino aún activo?) Juanes, Sebastián y toda la gente buena que conocí en la carrera.

Quae medicamenta non sanat, ferrum sanat. Quae ferrum non sanat, ignis sanat. Quae vero ignis non sanat, insanabilia reportari oportet.

(Lo que los medicamentos fallan en curar, el *escalpelo* puede curarlo. Lo que el *escalpelo* falla en sanar, el calor lo puede sanar. Si el calor no lo puede curar, debe ser clasificado como incurable.)

-Hipócrates.

ACF	- adjuvante completo de Freund
APCs	- células presentadoras de antígenos
Cpm	- cuentas por minuto
CTLs	- células T citotóxicas
DCL	- leishmaniasis difusa cutánea
ELISA	- "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
H ₂ O ₂	- agua oxigenada
HSP	- "Heat Shock Protein"
IgG	- Inmunoglobulina G
IgG1	- Inmunoglobulina G 1
IgG2a	- Inmunoglobulina G 2a
IL	- Interleukina
kDa	- kilodaltons
LiB1	- fragmento B1 de la proteína Hsp83 recombinante de Leishmaniasis infantum
LbHsp70	- proteína HSP70 recombinante de <i>Leishmania braziliensis</i> .
LbHsp83	- proteína HSP83 recombinante de <i>Leishmania braziliensis</i> .
LC	- Leishmaniasis cutánea
LiC1	- fragmento C1 de la proteína Hsp83 recombinante de Leishmaniasis infantum
LiD1	- fragmento D1 de la proteína Hsp83 recombinante de Leishmaniasis infantum
LM	- Leishmaniasis mucocutanea
LiHsp70	- proteína HSP70 recombinante de <i>Leishmania infantum</i>
LiHsp83	- proteína HSP83 recombinante de <i>Leishmania infantum</i>
MBP	- "Maltose Binding Protein" (Proteína de Pegado a Maltosa)

MBP-LiA1	- fragmento A1 de la proteína Hsp83 recombinante de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i> fusionado a MBP
MBP-LiHsp83	- proteína recombinante de fusión de <i>Leishmania</i> <i>infantum</i>
MHC	- complejo mayor de histocompatibilidad
mg	- miligramo
ml	- mililitro
Ni	- níquel
NTA	- ácido nitroacético
OPD	- orto fenilendiamina
PBMC	- células periféricas mononucleares
PBS	- solución salina de buffer fosfato
PM	- peso molecular
Th1	- células T helper 1
Th2	- células T helper 2
μg	- microgramo
μl	- microlitro

INDICE

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
Hsps como antígenos.....	17
Hsps como "carriers" de péptidos y polipeptidos.....	19
Hsps y Leishmania.....	22
Leishmania Hsp83 y respuesta inmune.....	23
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Plásmidos y proteínas recombinantes.....	28
Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	30
Inmunizaciones.....	34
Determinación de títulos de IgG e isotipos.....	35
Análisis por electroforesis en gel y Western blotting (Immunoblot).....	37
Análisis de la linfoproliferación dependiente de MBP de células de bazo.....	38
Extracción de proteínas de tumor de mamas de ratón.....	39
RESULTADOS.....	41
Calidad de las proteínas recombinantes usadas en los ensayos de inmunización.....	42
Análisis de la respuesta humoral contra MBP.....	43
Curso temporal de la respuesta contra MBP.....	46
Análisis de la respuesta humoral contra LiHsp83.....	47
Análisis isotípico de los anticuerpos anti-MBP de los ratones inmunizados.....	50
Análisis isotípico de los anticuerpos anti-LiHsp83 de los ratones inmunizados.....	52
Análisis de linfoproliferación dependiente de MBP.....	53
DISCUSIÓN.....	56

BIBLIOGRAFÍA.....	65
-------------------	----

RESUMEN

Las proteínas de choque térmico de patógenos bacterianos y parásitarios son potentes inmunógenos. Entre éstos, la Hsp70 de Leishmania y micobacterias demostraron estimular una respuesta inmune humoral y celular en contra de antígenos reporteros o informadores. En el presente trabajo, se analizaron en un modelo experimental de ratón las propiedades inmunoestimuladoras de la proteína de Leishmania infantum de la familia Hsp83 (LiHsp83) para conferir una respuesta inmune contra el antígeno reportero Proteína de Pegado a Maltosa (MBP). Ratones pertenecientes a la cepa CF1 fueron inmunizados con diferentes proteínas recombinantes: MBP, LiHsp83 y MBP fusionada a la LiHsp83 (MBP-LiHsp83). Los resultados obtenidos demostraron que cuando MBP está fusionada a LiHsp83 genera una potente respuesta inmune humoral y celular contra MBP, la cual es mucho más alta que la obtenida en ratones inmunizados con MBP o MBP mezclada con LiHsp83. La respuesta humoral obtenida en contra de MBP o LiHsp83 en ratones inmunizados con un sistema basado en la proteína de choque térmico, fue caracterizada por una secreción dominante del isotipo IgG2a, que resultaría de la presencia de citoquinas características de una respuesta inmune celular del tipo Th1. También se observó leve secreción de IgG1 (asociada a citoquinas del perfil Th2). Los ratones inmunizados con MBP o MBP mezclada con LiHsp83 mostraron una reactividad anti-MBP de isotipo IgG2a muy débil. Asimismo, los ensayos de estimulación de linfocitos con MBP demostraron un incremento en los niveles de proliferación en los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 respecto de aquellos inmunizados solo con MBP. Por lo tanto, todos estos resultados infieren que LiHsp83 es un prometedor candidato para ser usado como “carrier” de antígenos fusionados para vacunaciones libres de adyuvante.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de choque térmico (Hsps) son una familia de proteínas las cuales son expresadas constitutivamente en altas cantidades hecho que se ve incrementado cuando una célula está sujeta a condiciones de estrés (16) del tipo físicas (calor) o químicas (anoxia, pH ácido). En estas condiciones la expresión de algunos genes se apaga, mientras que la de unos pocos se estimula. Estos últimos justamente son los que codifican para las HSPs. Las HSPs están altamente conservadas desde bacterias hasta mamíferos y están involucradas en algunas funciones celulares esenciales producto de su accionar como chaperoninas moleculares: traslocación, plegamiento de proteínas, y ensamble de péptidos. Además juegan un papel central en tejidos dañados por estresores que afectan a las proteínas celulares. Todas estas características y su conservación evolucionaria dentro de los tres dominios filogenéticos (Bacteria, Archea y Eucarya) sugieren un rol vital de las HSPs y otras chaperonas moleculares. Las chaperonas evolucionaron sobre la necesidad de dar asistencia y protección externa a las proteínas convirtiéndose en instrumentos de la célula para la construcción de sus componentes proteicos en su específica y funcional conformación. Así también esta característica es de importancia cuando las proteínas pierden su correcta conformación ante situaciones de estrés (14,62 y 39). Debido a todas su funciones, se espera que las chaperonas tengan la capacidad de interactuar intimamente con sus proteínas "target" y reconocer

aquellas proteínas con necesidad de ayuda. Por lo tanto, deben poder reconocer sitios de una proteína que no se encuentran expuestos en estados nativos y si lo están en estados no nativos. Las proteínas de choque térmico son clasificadas en familias como HSP (en inglés: Heat Shock Proteins) seguidas de un número que indica su peso molecular aparente en kilodaltons (kDa) determinados por SDS-PAGE. A continuación se detallan algunas características de las HSPs.

- Familia de la Hsp100: la Hsp104 perteneciente a levaduras es la homóloga a la Hsp110 de mamíferos (40). Son esenciales para la supervivencia celular bajo condiciones extremas y en la adquisición de termotolerancia (62 y 40). Esta última característica la otorga promoviendo la desagregación de las proteínas ante el calor.
- Familia de la hsp70: miembros importantes de esta familia son las Hsp72 y 73 de mamíferos (62 y 57). Ambas parecen estar involucradas en la traslocación de proteínas desde el citosol hasta el retículo endoplásmico o la mitocondria, y en el plegamiento durante y después de la síntesis de la proteína en el ribosoma. La Hsp70 además cumple funciones en el desensamblado de complejos multiproteicos o polímeros proteicos. La contraparte procariota es la DnaK (13, 14 y 32) que con sus cohortes DnaJ, y GrpE. DnaK y DnaJ, son chaperoninas moleculares que interactúan entre sí, y con GrpE en una variedad de situaciones en las cuales el ensamblado, la desagregación y la oligomerización tienen lugar (13, 14 y 15).

- Familia de la Hsp60: Las proteínas de esta familia son denominadas chaperoninas(13 y 63). Son proteínas del citosol eucariótico en forma de anillo y compuestas por varias diferentes subunidades codificadas por genes separados pero relacionados entre sí. También las hay en Archea donde se estudio su accionar en la inducción de termotolerancia. La Hsp60 bacterial es GroEL, la cual también es citoplasmática (13 y 14). El principal rol de las chaperonas pertenecientes a las familias de la Hsp70 y Hsp60 es entonces prevenir la agregación de los péptidos recientemente sintetizados y por tanto mediar su plegamiento hasta que estos alcancen su estado nativo. Estudios funcionales de estas proteínas revelaron que el plegamiento proteico en las células es un proceso espontaneo(19).

- Familia de la Hsp40: Su rol más importante se centra en la inducción de termotolerancia, biogénesis de proteínas, y replicación del ADN(13, 14 y 15).

- Familia de la hsp90: esta proteína se encuentra en el citosol de las células eucariotas y es muy abundante aún en ausencia de estrés celular(62 y 57). Sin embargo, su expresión se incrementa bajo condiciones de estrés. Es una de las proteínas más abundantes en las células de mamíferos e interacciona con innumerables moléculas, por ejemplo receptores de hormonas, estabilizando sus formas inactivas (62

y 41), y además evitan el agregado de proteínas desnaturalizadas. La Hsp83 de levaduras y parásitos pertenece a esta familia.

Algo importante de indicar es el hecho de que las Hsps gp96, hsp90, y hsp70 se asocian con péptidos antigenicos derivados de proteínas celulares. Todo esto llevo a la elaboración de la siguiente hipótesis: Las Hsps son liberadas de células infectadas con virus o de células tumorales o durante la lisis celular en el curso de una infección o por acción de anticuerpos o efectores no específicos. Así las Hsps ahora acomplejadas con péptidos antigenicos son tomadas por macrófagos u otras células presentadoras especializadas, posiblemente por un mecanismo dependiente de receptor. A continuación éste complejo es encaminado dentro de la ruta endógena de presentación de péptidos de la célula presentadora hasta llegar al contexto del MHC I, siendo finalmente este antígeno reconocido por células T citotóxicas CTLs (56).

Hsps como antígenos

Existe suficiente evidencia que las Hsps de patógenos bacterianos y parasitarios son fuertemente inmunogénicas (16, 65, 11, 33 y 23). Por un lado se sabe que las Hsps son, dentro de los patógenos, proteínas de elevado nivel de expresión cuando éstos son atacados por el hospedador, siendo de esta manera antígenos disponibles en altas cantidades para el procesamiento y presentación en los complejos mayores de histocompatibilidad MHC I y II (37). Así los mamíferos son capaces de reconocer varios epítopes T y B en una

molécula simple de Hsp de los patógenos (26, 49, 1, 52, 44 y 45). Por otro lado, se considera que la naturaleza conservativa de las Hsps podría ser utilizado convenientemente por el sistema inmune para producir una respuesta temprana como primera línea de defensa(64). Otra particularidad de esta situación es que sumada a la presencia de anticuerpos contra las Hsps del patógeno existe una sobreexpresión de las HSPs del huésped (debido al estrés producido por la propia invasión, por la fiebre y las toxinas). Este fenómeno puede derivar en una reactividad cruzada entre las Hsps extrañas y las del huésped.

Se reportó la presencia de anticuerpos contra miembros de la familia de la Hsp83 en el transcurso de enfermedades infecciosas humanas producidas por patógenos tales como *Candida albicans*(34), *Schistosoma mansoni*(22), *Plasmodium falciparum*(8), *Leishmania donovani*(10), *L. braziliensis*(49),y *Trypanosoma cruzi*(12). En el trabajo de Skeiky et al (49) se observó que en pacientes con leishmaniasis cutánea (LC) y mucocutánea (LM), pero no en individuos con una leishmaniasis resuelta, había altos títulos de IgG contra las Hsp83 y 70 recombinantes de *L. braziliensis*. A pesar del alto nivel de conservación existente no se observó anticuerpos contra la proteína de choque térmico Hsp70 de origen humano mostrando en este caso la ausencia de fenómenos autoinmunes. Otra forma clínica de la enfermedad es la leishmaniasis cutánea difusa (DCL), la cual es una forma muy rara y causada predominantemente por *L. amazonensis*. En este caso se identificó a la Hsp83

de *Leishmania* como un antígeno inmunodominante, predominando la respuesta de la subclase IgG4 en el suero de estos pacientes, hecho que no ocurría en el caso de LC autocurativa. Por lo tanto la producción de IgG4 en DCL podría estar involucrada en consecuencias patológicas asociadas a un perfil de respuesta Th2(48).

La alta frecuencia con la cual se han encontrado linfocitos T CD4⁺ de humanos dirigidos en contra de la Hsp70 y 60 de *Mycobacterium* sugieren que estas HSPs son el objetivo más jerárquico de la respuesta celular en humanos(24). La poderosa naturaleza antagónica de las HSPs se ve enfatizada por el hecho de que, que como ya se comentó, los mamíferos son capaces de reconocer múltiples epitopes T y B en estas proteínas. De esta manera se evidenció que las HSPs de *Mycobacterium* pueden ser presentadas en el contexto de múltiples haplotipos de MHC, y los epitopes T se pueden encontrar a lo largo de esas HSPs(38).

Hsps como carriers de peptidos y polipeptidos

Las proteínas de choque térmico aisladas de células cancerosas o de células infectadas con virus pueden conferir una inmunidad protectiva mediante la estimulación de los linfocitos T citotóxicos (59). Por el contrario HSPs provenientes de tejidos normales no producen tal tipo de respuesta(59). No serían las HSPs per se las inmunogénicas sino que esta característica recaería sobre los complejos chaperona-antígenos tumorales o

virales generados durante el procesamiento antigenico(55). La inmunogenicidad de las preparaciones de HSP es fuertemente dependiente de la presencia de células fagocíticas en el huésped. La depleción de este tipo celular hace incapaz al huésped de ser inmunizado por dichas preparaciones(55). Se sugirió entonces que las HSPs son tomadas por los macrófagos y re-presentadas en el contexto del MHC-I de estas mismas células a los clones T específicos(60). En esta línea se demostró, que antígenos exógenos chaperoneados por una HSP pueden ser conducidos dentro del procesamiento endógeno, presentándose así en moléculas de MHC-I, y reconocidos por linfocitos T CD8⁺(56). Las HSPs son uno de los constituyentes más abundantes entre las bacterias, aun cuando no estén sujetas a estrés(9). Debido a que las HSPs son fuertes inmunógenos y además las chaperoninas están involucradas en el transporte y ensamblado de péptidos procesados con el MHC, fueron conjugados a la Hsp60 y a la Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* péptidos sintéticos de malaria para inmunizar ratones (2 y 31). Estos complejos produjeron una respuesta humoral de larga duración contra éstos antígenos en animales inmunizados. Las ya mencionadas propiedades inmunogénicas de las HSPs han sido demostradas en particular en la Hsp70 de *M.tuberculosis* la cual se usó en forma exitosa como un "carrier" molecular de proteínas en una inmunización libre de adjuvante(2), y además se desarrolló también un sistema libre de adjuvante con la misma molécula usándola como proteína de fusión con la

proteína HIV-p24 (antígeno reportero) para inmunizar ratones, obteniéndose un estímulo incrementado de la respuesta inmune humoral y celular contra la p24(58). En la misma línea se estudio si la Hsp70 de *L.infantum* fusionada a una proteína reportera, se comportaba de la misma manera, observándose que cuando inmunizaban ratones con la proteína recombinante Hsp70 fusionada con la proteína bacterial de pegado a maltosa (MBP) se producía una respuesta inmune humoral y celular contra la MBP un orden mas alto de magnitud que cuando lo hacían con la MBP sola o acompañada por la Hsp70(46). En esta caso la inmunización con HSP70-MBP indujo preferencialmente una respuesta inmune celular del tipo Th1 en vista del patrón de citoquinas e IgG observadas.

A pesar de que las proteínas de choque térmico gp96, Hsp70 y Hsp90 asociadas con péptidos antigenicos producen una respuesta inmune contra los complejos de péptidos chaperoneados (19 y 66), no existe evidencia en la familia de las Hsp83-90 de inmunizaciones en ausencia de adjuvante para su uso como "carrier" de antígenos fusionados.

Hsps y Leishmania

Los parásitos, como *Leishmania* en los cuales su ciclo de vida transcurre entre hospedadores vertebrados e invertebrados, se ven afectados por bruscos cambios de temperatura, esto sugiere que las proteínas de choque térmico juegan un rol importante en la supervivencia y diferenciación del parásito. En el caso de *Leishmania*, cuando los promastigotes pasan desde el insecto vector hacia el hospedador mamífero experimentan un rápido ascenso de la temperatura desde 22 a 28°C en el jején, hasta temperaturas tan altas como 31-35°C en las lesiones dérmicas, y arriba de 37°C en los órganos del huésped. Estos sensibles cambios de temperatura podrían dañar proteínas y membranas de las células, llevando a la muerte del parásito. Así para sobrevivir dentro del hospedador definitivo, *Leishmania* spp ha adquirido termotolerancia (66). La exposición de promastigotes de *L. amazonensis* a temperaturas como las que hallaría en mamíferos detiene la síntesis de muchas proteínas y produce un inmediato incremento en la traducción de Hsps(20, 28 y 47). Se demostró también que promastigotes y amastigotes contienen transcriptos específicos para las HSPs 70 y 83 (53). Otros estudios mostraron un incremento en la virulencia después de exponer a promastigotes a un choque térmico(50). No se conoce si las Hsps están involucradas en este fenómeno, pero es claro que existe una correlación.

Leishmania Hsp83 y respuesta inmune.

Se observó que la proteína Hsp83 es un antígeno inmunodominante durante la forma visceral de la leishmaniasis en perros(1). La Hsp83 clonada de *L. braziliensis* (rLbHsp83) contiene un potente epitope de células T el cual estimula la proliferación y la producción de IL-2, INF-γ, y TNF-α por parte de células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMC) en individuos infectados con *L. braziliensis*(49). En este mismo estudio se comprobó que la Hsp83 completa usada para producir dicha acción sobre las PBMC estimula la expresión del mRNA de IL-10 pero no el de IL-4, todo lo contrario ocurre con una porción C-terminal de 43 kD de la proteína usada para el mismo propósito. Así el perfil de citoquinas en pacientes con LC autocurativa estimulando en PBMC una respuesta a rLbHsp83 principalmente del tipo Th1, tal como se deduce de los niveles significativamente mas altos de IL-2 e INF-γ comparados con los de IL-4 e IL-10 pertenecientes al perfil Th2, sugiriéndose así que la Hsp83 en este grupo de pacientes estaría asociada con la inmunidad protectiva(49). En el mismo estudio se analizó una forma recombinante de *L. braziliensis* Hsp70 encontrándose que sus propiedades inmunogénicas eran inferiores a LbHsp83.

La Hsp83 de *Leishmania* parece ser un óptimo candidato para su estudio como “carrier” inmunomgénico, afirmación basada en las poderosas características inmunogénicas de la Hsp83 de *L.infantum*(1, 49, y 48) y en lo

descripto anteriormente para las HSPs. Nuestra pregunta gira entonces en torno acerca de las propiedades que tendría la Hsp83 de *L.infantum* cuando esté fusionada a una proteína reportera o informadora para generar una respuesta humoral y celular contra esa proteína.

OBJETIVOS

-
- El presente trabajo se realizó con el objetivo de conocer si la proteína recombinante LiHsp83 es capaz de incrementar la respuesta inmune contra un antígeno reportero fusionado, en un sistema de inmunización libre de adjuvantes, y caracterizar dicha respuesta. El análisis de la capacidad inmunoestimuladora de LiHsp83 aportaría información tanto sobre el valor inmunogénico de esta familia de proteínas como su potencial uso en vacunas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos y proteínas recombinantes

Todas las proteínas recombinantes utilizadas están descriptas por Angel et al (1) y esquematizadas en la figura 1

Brevemente:

La proteína recombinante LiHsp83 fue obtenida a partir del plásmido pQELiHsp83, el cuál es el resultado del clonado del fragmento de ADN LiHsp83 dentro del vector pQE31(Qiagen) como ya fue descripto(1). El plásmido pQE31 adiciona 6 histidinas al extremo amino-terminal de la proteína expresada para facilitar su purificación.

El producto de fusión MBP(proteína de pegado a maltosa) ligada a LiHsp83 fue obtenido a partir del plásmido pMAL-LiHsp83 previamente creado. El fragmento de ADN LiHsp83 proveniente del plásmido pQELiHsp83 fue subclonado en marco al extremo carboxi-terminal de la MBP codificada en el pMAL-cRI. Éste producto de expresión es fácilmente purificable debido a que la MBP se une a la amilosa presente en columnas con resina de amilosa. La proteína MBP fue expresada de pMAL-cRI*, un vector derivado del pMAL-cRI (New England Biolabs) como fue descripto (46). Brevemente pMAL-cRI* se creó por digestión del vector con EcoRI, rellenado con la enzima ADN polimerasa, (fragmento klenow), y religado con T4 DNA ligasa. Así este vector incluye tres codones "stop" en marco río abajo del sitio de restricción EcoRI creando un sitio de terminación. Este vector expresa la proteína MBP sola y

no MBP-LacZa, como se expresa en el pMAL-cRI original (46). De la misma manera que MBP-LiHsp83 se obtuvo la proteína recombinante MBP-LiA1, que se compone de la proteína MBP fusionada a un subfragmento amino terminal de la LiHsp83 denominado A1 (1). LiB1, LiC1, y LiD1 son proteínas recombinantes que representan distintas regiones de LiHsp83, y provienen de los plásmidos pQELiB1, pQELiC1 y pQELiD1.

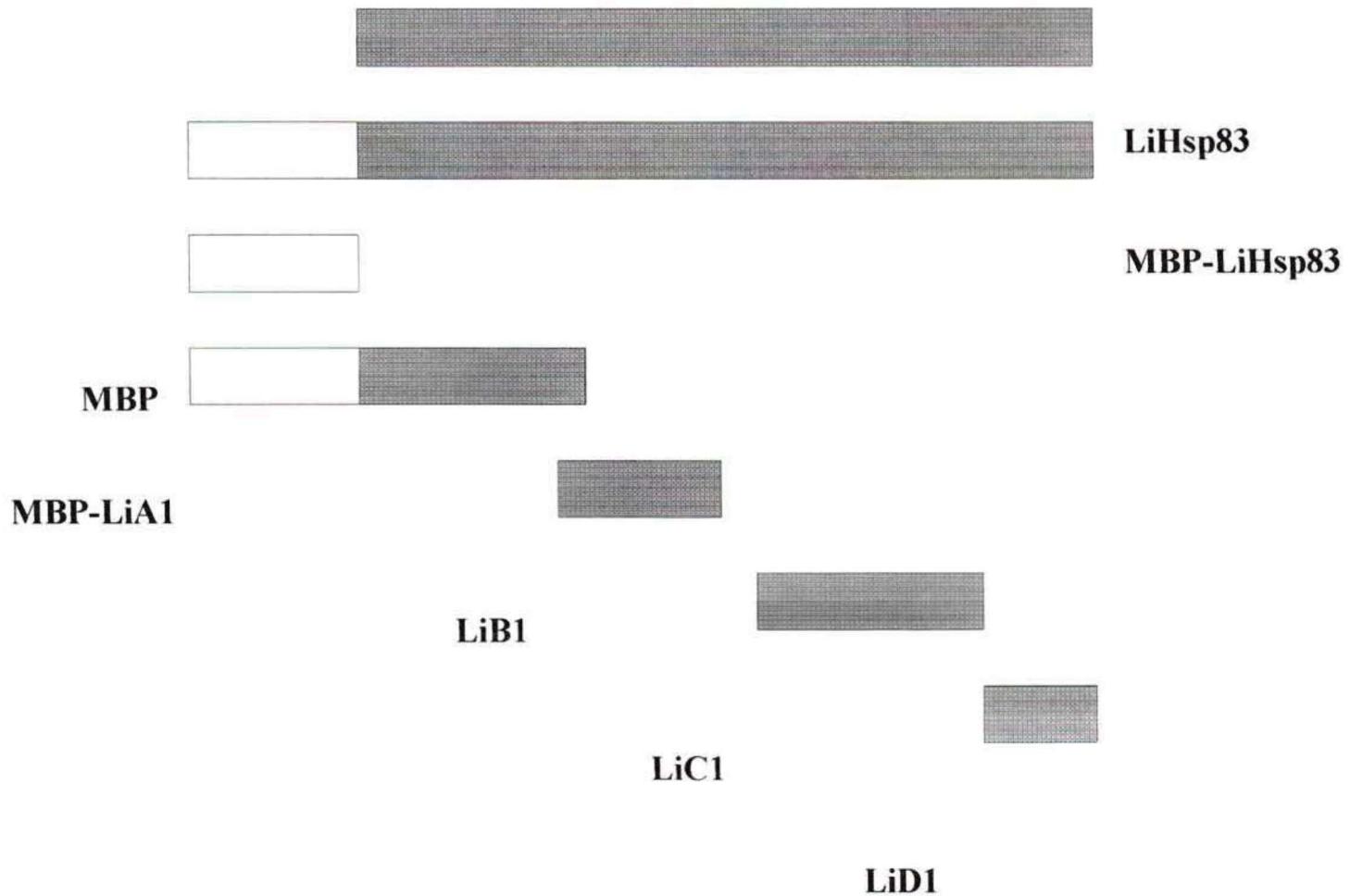


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas recombinantes utilizadas en el presente trabajo. La proteína LiHsp83 proviene del plásmido pQELiHsp83, MBP-LiHsp83 de pMAL-LiHsp83, MBP de pMAL-RI*, MBP-LiA1 proviene de pMAL-LiA1, y LiB1, LiC1 y LiD1 provienen de pQELiB1, pQELiC1, pQELiD1 respectivamente.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

Bacterias de *Escherichia coli* de la cepa M15 (Qiagen) fueron transformadas con las construcciones plasmídicas las cuales fueron utilizadas para obtener la expresión de las siguientes proteínas:

- LiHsp83
- MBP-LiHsp83
- MBP
- MBP-LiA1
- LiB1
- LiC1
- LiD1

Ésta cepa utilizada presenta una reducida actividad proteolítica y viene transformada con un episoma que contiene el gen de resistencia a kanamicina y el gen que codifica para el represor Lac. De esta manera se puede elegir el momento de expresión del producto recombinante por inducción con IPTG.

Inducción y expresión de proteínas recombinantes. Las bacterias M15 conteniendo plásmidos recombinantes, fueron crecidas "overnight" en medio Luria broth (Bacto-triptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Agua destilada) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (10 µg/ml) a

37°C con agitación. A continuación se hizo una dilución 1:40 en el mismo medio de cultivo y se incubó durante 3 horas a 37°C. La expresión de las proteínas fue inducida por el agregado de IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranósido) a una concentración final de 2mM durante 2 horas a 37°C.

Extracción de las proteínas recombinantes. Las bacterias provenientes de un cultivo inducido de 100ml fueron cosechadas por centrifugación a 4°C durante 5 minutos. Con el objeto de purificar las proteínas de fusión provenientes del sistema pQE (Qiagen) se resuspendió el pellet en 1 ml de solución de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8; NaCl 300 mM, imidazol 10 mM) por cada 50 ml de cultivo y se sonicó a alta frecuencia tres veces durante un minuto cada vez en hielo. El lisado resultante se centrifugó a 12000 rpm en microcentrífuga durante 5 min a 4°C, El sobrenadante contenido la proteína de fusión, fue guardado -20°C hasta su purificación.

Purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad de metal quelado. Por este sistema se obtuvieron las proteinas LiHsp83, LiB1, LiC1, LiD1. Se cargo una columna con 1 cm³ de resina Ni^{2+} -NTA (Qiagen). Esta resina contiene un ligando NTA (ácido nitriloacético) con iones de Ni unidos fuertemente, los cuales unen firmemente proteínas suplementadas con más de dos histidinas vecinas. Se cargaron 2 ml de sobrenadante contenido la

proteína recombinante; se lavó con 2 ml de solución de lisis y luego se aplicaron 10 volúmenes de solución de lavado (solución de lisis suplementada con imidazol 20mM) con el objeto de eluir de la columna las proteínas bacterianas. La proteína de fusión MBP-LiHsp83 fue eluida de la columna con la solución de purificación (solución de lisis suplementada con imidazol 200 mM). Las muestras de proteína purificada fueron dializadas contra una solución salina de buffer fosfato 0,1 x (PBS) y luego fueron lyophilizadas. Ver figura 2.

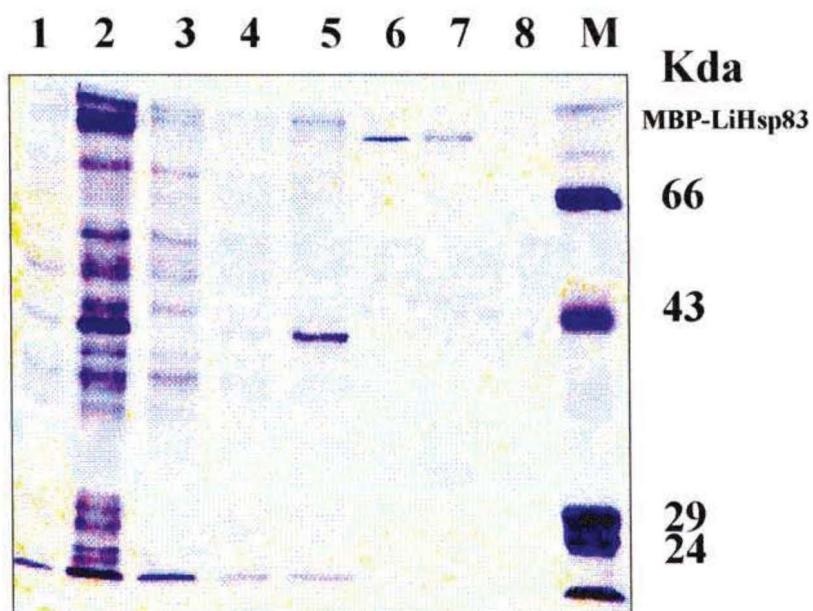


Figura 2. Purificación de la proteína recombinante LiHsp83. Calle 1, homogenato total de bacterias transformadas con el plásmido recombinante, calle 2 mismas bacterias inducidas con IPTG. Este homogenato fue pasado por una columna con níquel, observándose el eluido en calle 3, se lavó el material retenido con solución de lisis (calle 4), y con solución de lisis (calle 5), eluyéndose la proteína recombinante con solución de lisis pH 4 (calles 6, 7 y 8). El producto de elución fue dializado contra PBS 0.1 X. Todas las fracciones fueron sometidas a Electroforesis en SDS-PAGE 10% tiñéndose el gel con Coomasie blue. **M**, marcadores de peso molecular. A la izquierda se indican los pesos moleculares en Kda.

Purificación de las proteínas de fusión del sistema pMAL-cRI. En el sistema pMAL-cRI (New England Biolabs) se obtuvieron las proteínas recombinantes MBP, MBP-LiHsp83, MBP-LiA1. Brevemente el sistema de vectores MBP permite la expresión de genes de interés clonados 3' al gen malE que codifica para MBP.

Las proteínas provenientes del sistema pMAL-cRI (New England Biolabs) fueron purificadas de la siguiente manera, los pellets fueron resuspendidos en solución de lisis (Tris-HCl 20mM, pH 7,4; NaCl 200mM; EDTA 1mM). Las bacterias fueron sonicadas y centrifugadas como ya se mencionó en el ítem anterior. Las proteínas de fusión fueron pasadas por una resina de amilosa (New England Biolabs), y las proteínas bacterianas fueron eluidas con la solución de lavado (solución de lisis). Las proteínas de fusión de interés fueron eluidas de la columna con la solución de purificación (solución de lisis suplementada con Sacarosa 100mM). Las muestras de proteínas purificadas fueron dializadas contra una solución salina de buffer fosfato (PBS) 0,1x (NaCl 8gr, KCl 0.2gr, PO₄HNa 2H₂O 0.92 gr, PO₄H₂K 0.2gr, d H₂O 1 litro) y a continuación lyophilizadas. Ver figura 3.

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (4) utilizando sero-albúmina bovina como standard.

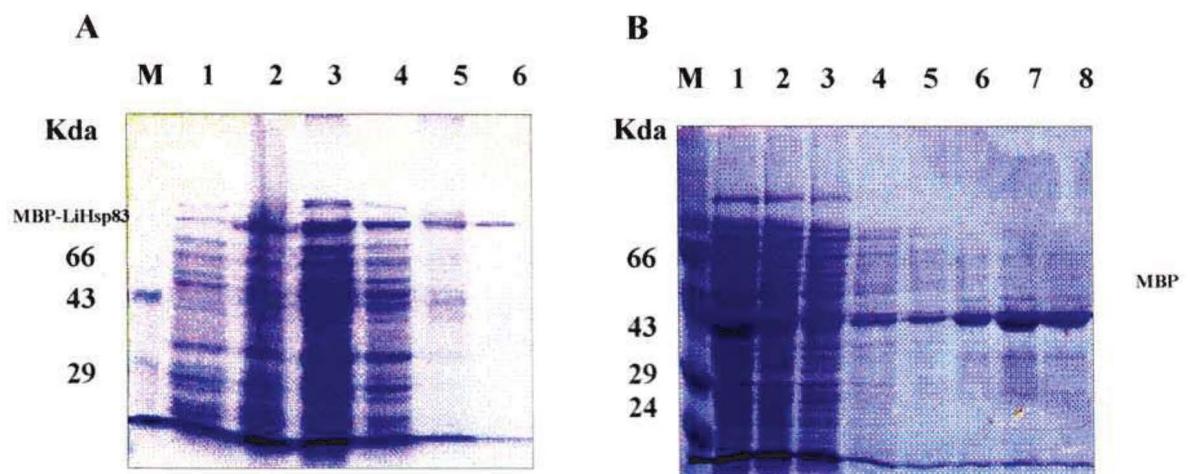


Figura 3. Purificación de la proteínas recombinantes MBP-LiHsp83 (A) y MBP (B). (A)Calle 1, homogenato total de bacterias transformadas con el plásmido recombinante, calle 2 mismas bacterias inducidas con IPTG. Este homogenato disuelto en solución de lisis fue pasado por una columna de amilosa, observándose el eluido en calle 3, se lavó el material retenido (proteínas bacterianas) con solución de lavado (calle 4), eluyéndose la proteína recombinante con solución de lisis con maltosa (calles 5 y 6). (B) en la calle 1 puede observarse el eluido del homogenato. La calles 2 a 4 corresponden a los lavados(usándose las mismas soluciones que en el caso anterior), y las calles 5 a 8 a la elución de la proteína con maltosa. El producto de elución fue dializado contra PBS 0.1 X. Todas las fracciones fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE 10% tiñéndose el gel con Coomassie blue. M, marcadores de peso molecular. A la izquierda se indican los pesos moleculares en Kda.

Inmunizaciones.

Se inmunizaron intraperitonealmente (ip) ratones hembras de la cepa CF1 con cada antígeno a los días 0 y 21. Las dosis de inmunización y del refuerzo de cada antígeno y combinaciones con relación a su peso molecular fueron las siguientes: MBP (2,5 µg), LiHsp83 (5 µg), y MBP-LiHsp83 (7,5 µg). Como control adicional se inmunizó con el antígeno MBP emulsificado en adjuvante completo de Freund (ACF) dilución 1:1. Los días 0(suero preinmune),

21, 28, 40, 60, 90 y 120 se colectaron muestras de sangre sangrando a los ratones por sus colas.

Determinación de títulos de IgG e isotipos.

La concentración óptima de proteína recombinante a usar en los ensayos de ELISA fue determinada de la siguiente manera: cantidades crecientes de proteína recombinante fueron usadas para sensibilizar la placa de ELISA (Immuno Plate MaxisorpTM; Nunc). Se incubó "overnight" a 4°C y luego de tres lavados con PBS 1x, se colocaron 50 µl en cada pocillo de enzima peroxidasa de radicheta tipo VI (SIGMA) (100 µg/ml) en PBS 1X y se dejó tres horas. Posteriormente se lavo dos veces en solución de lavado (PBS 1x, Tween-20 0,25%) y una vez con PBS1x. La reacción colorimétrica se realizó con OPD (ortofenil diamina: OPD 1mg/ml de citrato de sodio 0,1 M pH5; H₂O₂ 1 µl/ml) y se midió absorbancia a 450 nm a los 5 minutos en un lector de ELISA automático (Dynatech MR4000). Se tomó como concentración óptima aquella con la cual se obtiene el valor mas bajo de absorbancia por primera vez, cuando estas alcanzan valores bajos en forma constante. Se infiere de esta manera que el pocillo alcanza su grado óptimo de sensibilización sin exceso de proteína. Cada pocillo de la placa de ELISA (Immuno Plate MaxisorpTM; Nunc) fue sensibilizado "overnight" a 4°C con 100 µl de la proteína recombinante MBP o LiHsp83 diluidas en buffer carbonato 0,05 M (pH9,6). MBP fue usado en su óptima concentración de 5 µg/ml y LiHsp83 a 3,5 µg/ml. Después de

haber sensibilizado la placa, los pocillos fueron bloqueados con 200 μ l de solución de bloqueo (leche descremada en PBS 1x Tween-20 0,25%) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavados una vez con solución de lavado (PBS 1x, Tween-20 0,25%), y se sembró 100 μ l de suero a testear o control (suero preinmune) en una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se lavaron tres veces con solución de lavado. Como segundo anticuerpo, se usó anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugados con peroxidasa de radicheta (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), diluidos 1:2000 en solución de bloqueo. Se incubó una hora a temperatura ambiente y luego se hicieron lavados de igual manera a como se mencionó en el paso anterior. Los complejos inmunes fueron revelados con OPD como sustrato cromogénico. Se midió la absorbancia a 450 (A_{450}). Los resultados del ELISA fueron determinados para cada suero por duplicado. Al menos dos ELISAs independientes fueron realizados para cada suero. El punto de corte se estableció como el valor medio de la reactividad del grupo control (suero preinmune) mas tres desviaciones standard.

El análisis específico de isotipos fue realizado por ELISA usando los siguientes anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa de radicheta: anti-IgG1 y anti-IgG2a(ICN Biomedicals, Inc.). Los datos fueron graficados como la absorbancia relativa, es decir, el valor medio de la absorbancia de

cada suero a testear dividido el valor de absorbancia medio del suero preinmune.

Análisis por electroforesis en gel y Western blotting (Immunoblot).

Los extractos proteicos fueron resueltos por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) en el sistema Mini-Protean (Bio-Rad). Las muestras fueron incubadas con un volumen de buffer de siembra (β -mercaptoetanol 6%, Tris-HCl 6%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,6%), hervidas durante 10 minutos y enfriadas en hielo 5 minutos antes de ser sembradas en el gel. Para el análisis en immunoblot, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (BRL) por inmunoelectrotransferencia (0.8 mA/cm^2) luego de la electroforesis. Las membranas se incubaron "overnight" a 4°C con solución de bloqueo (leche descremada en PBS 1x Tween-20 0,25%). Los filtros fueron enfrentados, una hora con agitación, con los sueros de ratones inmunizados con las diferentes proteínas recombinantes. Se usó un anticuerpo conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) como segundo anticuerpo, y la unión específica se reveló con diaminobenzidina 1 mg/1,5 ml como sustrato cromogénico y 1 $\mu\text{l/ml}$ de H_2O_2 . Los lavados entre cada incubación de anticuerpos se realizaron de similar modo al descripto para el ensayo de ELISA.

Análisis de la proliferación dependiente de MBP de células de bazo.

Los ensayos de proliferación in vitro fueron realizados con medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, β -mercaptoetanol en concentración final de 5×10^{-5} M, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 μ g/ml). En el día 120 luego de la primer inmunización, se extrajeron bazos de cuatro ratones por grupo (MBP, MBP-LiHsp83 y LiHsp83). Como control se extrajeron bazos de 4 ratones CF1 sin inmunizar. Las células viables de bazo fueron sembradas por triplicado en 200 μ l de medio de manera que quedaran 3×10^5 células por pocillo. El recuento de células de bazo se realizó en cámara de Neubauer, procediendo de la siguiente manera: se diluyó el preparado de esplenocitos 1:20 con solución salina con azul de metíleno para analizar la viabilidad (las células muertas se tiñen de azul). Se procedió a cargar la cámara con la dilución de 1:20 y se contaron los leucocitos contenidos en los 4 retículos angulares de la cámara. Se realizó el siguiente cálculo

$$N \times 20 \times 10 = N \times 50$$

4

N= cantidad de leucocitos en los 4 cuadrados

20= título de dilución

10= corrección de profundidad de la cámara para llevar a 1 mm^3

4= número de cuadrados.

Y con esto se obtuvo el número de células por ml.

Para los ensayos de proliferación se utilizaron placas de microcultivo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Cambridge, Mass.). La estimulación de las células se realizó con 10 µg/ml de MBP. Como control negativo para cada grupo se utilizaron pocillos en los cuales sólo había medio de cultivo. A las 24 y 48 horas se agregó 1µCi/pocillo de ³H-timidina (5Ci/mmol, Amersham Corp.). La incorporación de ³H-timidina fue medida a las 48 y 72 horas en un contador de centelleo. Los resultados fueron expresados mediante el índice de estimulación (SI): la media de las cuentas por minuto (cpm) del cultivo estimulado con MBP dividido la media de cpm del cultivo no estimulado. El nivel de cpm del grupo control y de las células no estimuladas se extiende desde 870 cpm hasta 8430 cpm.

Se consiguió la mayor estimulación en todos los casos a las 72 horas.

Análisis estadístico.

En el experimento de linfoproliferación el nivel de significancia de las diferencias entre grupos inmunizados con MBP-LiHsp83 y MBP, se determinó por el test "t" de Student.

Extracción de proteínas de tumor de mamas de ratón.

El tumor de mamas fue gentilmente cedido por la Dra. Edith Kordon (Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina). Las proteínas

fueron extractadas por trituración del tejido en mortero con disolución en PBS 1X. Esta mezcla fue diluida en buffer de siembra (β -mercaptoetanol 6%, Tris-HCl 6%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0.6%) para su posterior resolución por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%.

RESULTADOS

Calidad de las proteínas recombinantes usadas en los ensayos de inmunización.

Las proteínas recombinantes eluidas de las respectivas columnas cromatográficas, no contenían material contaminante alguno detectable por tinción con Coomasie Blue del gel de poliacrilamida (Ver figura 4). Por lo tanto este material se consideró apto para los estudios de inmunización que se describen a continuación.

Se inmunizaron intraperitonealmente 4 grupos de 8 ratones cada uno con las dosis y denominación que se detallan a continuación:

- Grupo MBP, 2,5 μ g de MBP.
- Grupo LiHsp83, 5 μ g de LiHsp83.
- Grupo MBP-LiHsp83, 7,5 μ g de MBP-LiHsp83.
- Grupo MBP-ACF, 2,5 μ g de MBP emulsificada con adjuvante completo de Freund (1:1) (control de antígeno reportero mas adjuvante convencional).
- Grupo MBP+Hsp83, 2,5 μ g de MBP mezcladas con 5 μ g de LiHsp83.

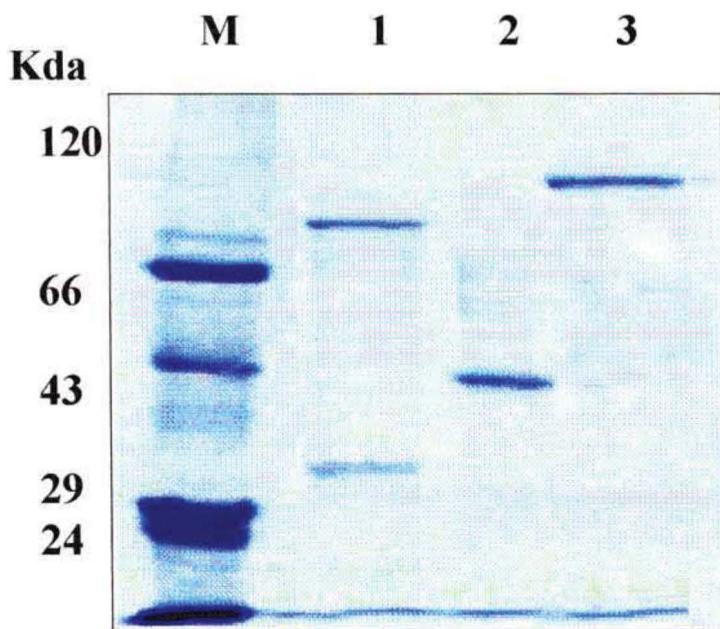


Figura 4. Proteínas de fusión resueltas por gel de acrilamida SDS-PAGE 10% y teñido con Coomasie Blue. Calles: **M**, marcador de peso molecular; **1**, LiHsp83; **2**,MBP; **3**,MBP-LiHsp83. Los pesos moleculares son indicados a las izquierdas.

Análisis de la respuesta humoral contra MBP.

Para determinar el valor de LiHsp83 como carrier molecular para la producción de una potente respuesta inmune humoral en contra de MBP se determinaron los títulos de IgG en muestras de sueros de los distintos grupos de ratones al día 28 (siete días después de la segunda inmunización

refuerzo). Se determinó el título como la mayor absorbancia del suero a analizar que estaba por debajo del cut-off del suero preinmune a esa dilución. Como se observa en la figura 5A, en los ratones inmunizados con el sistema de fusión MBP-LiHsp83 se obtiene el título de anticuerpos anti-MBP más alto 9×10^3 . La proteína recombinante MBP mezclada con LiHsp83 usadas para inmunizar al grupo de ratones respectivo produjo un título muy similar al que se obtuvo en las muestras de suero de ratones inmunizados solo con MBP, 0.8×10^3 y 1.2×10^3 respectivamente. Por lo tanto se observa que los ratones inmunizados con el sistema de fusión libre de adjuvante MBP fusionada a LiHsp83 obtuvieron una respuesta humoral de 7,5 a 11 veces mas alta que la observada en los ratones inmunizados con MBP sola o sin fusionarla a LiHsp83. El grupo de ratones inmunizados con MBP emulsificada con ACF dió un título de valor intermedio (título: 6×10^3).

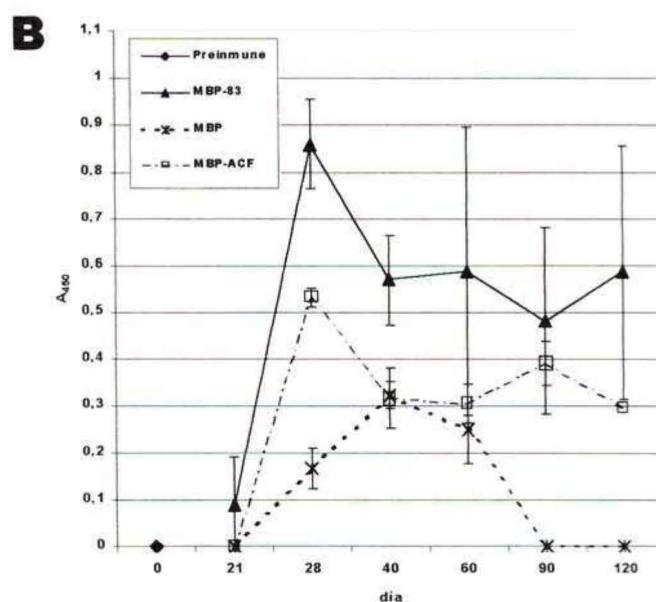
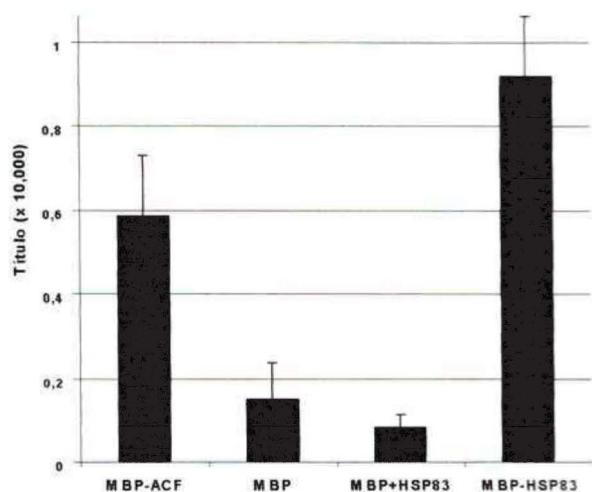


Figura 5 Respuesta humoral de los ratones CF1 inmunizados con las distintas proteínas de fusión: MBP, MBP-LiHsp83, MBP mezclada con LiHsp83 y MBP emulsificada con adjuvante completo de Freund (ACF). Las proteinas usadas en la inmunización fueron: 2.5 μ g (MBP), 5 μ g (LiHsp83) y 7.5 μ g (MBP-LiHsp83). Se aplicó un refuerzo a los 21 días post-inmunización. **A** Las muestras de suero testeadas en el dia 28 post-inmunización se analizaron por ELISA con MBP como antígeno. Los títulos de IgG se determinaron como la máxima dilución de suero que en la cual se obtenía una absorbancia cuatro veces más grande al valor obtenido para el suero preinmune. El valor de título medio para acada grupo se calculó. **B** Se muestra el curso temporal del nivel de anticuerpos anti-MBP. Las muestras de suero de los ratones inmunizados se tomaron periódicamente a lo largo del experimento.

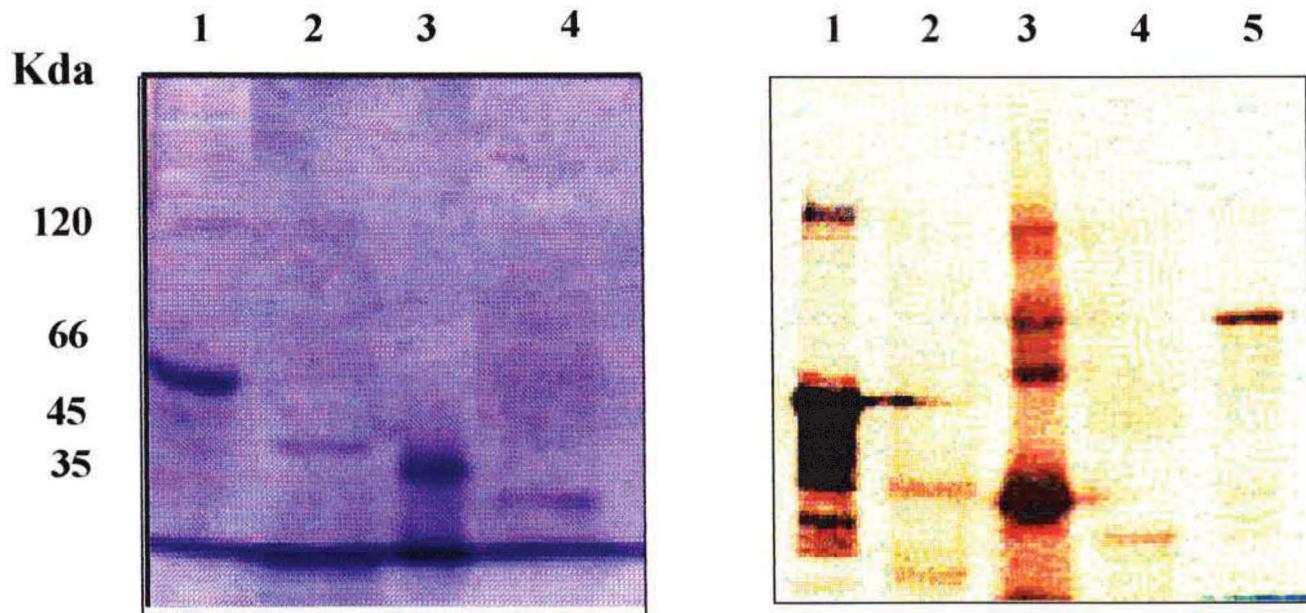
Curso temporal de la respuesta contra MBP.

Con el fin de determinar el curso temporal de la respuesta humoral anti-MBP, los ratones pertenecientes a los distintos grupos bajo estudio fueron sangrados periodicamente hasta llegar a los 120 días posteriores a la primer inmunización. En la figura 5A se puede observar el perfil de seroconversión de los ratones inmunizados con MBP-LiHsp83, MBP+LiHsp83, MBP, o MBP emulsificada con ACF. A lo largo del período que se tuvo en cuenta para el análisis cada grupo mostró un ascenso rápido y agudo de los niveles de anticuerpos IgG anti-MBP en los días posteriores al refuerzo de inmunización "booster" (día 28). Justamente en este día se observó el nivel más alto. En concordancia a lo observado en el análisis de títulos, el mayor valor de absorbancia se obtuvo en el grupo de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83. Esto se suma al hecho de solamente las inmunizaciones donde MBP está fusionado recombinantemente a LiHsp83, así como también el grupo control MBP-ACF, mostraron una presencia perdurable hasta 4 meses de anticuerpos IgG anti-MBP. Muy por el contrario, cuando las inmunizaciones fueron con MBP por sí sola o mezclada con LiHsp83 no mostraron un nivel de anticuerpos detectables por encima del día 90, ni en ningún momento alcanzaron los valores obtenidos con la proteína de fusión.

Análisis de la respuesta humoral contra LiHsp83.

También se procedió al análisis de la reactividad anti-LiHsp83 en los grupos de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes LiHsp83, MBP-LiHsp83 y MBP+LiHsp83, determinándose el título de anticuerpos IgG al día 28. En todos los casos los títulos obtenidos en las muestras ensayadas por IgG-ELISA fueron mayores de 10^5 (datos no mostrados).

Con el objeto de comprobar que la reacción inmune contra la proteína recombinante LiHsp83 reconoce múltiples epítopes de la proteína, se procedió a un análisis por immunoblot de 4 regiones diferentes de la LiHsp83 (1) (ver figura 6 A). Los sueros de los grupos inmunizados con las proteínas recombinantes MBP-LiHsp83 y LiHsp83 mostraron tener reactividad contra las 4 regiones ensayadas demostrando así estimular en ratones múltiples epítopes de células B en contra de LiHsp83, (Ver figura 6 B).



6. A , proteínas recombinantes resueltas en gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE y teñidas con Coomasie 1, MBP-LiA1; 2, LiB1; 3, LiC1; 4, LiD1; 5, LiHsp83. B, Análisis por Western blot de la reactividad de sueros de inmunizados con MBP-LiHsp83 al día 28 post-inmunización.

Por otro lado, surgió la siguiente pregunta: ¿la respuesta inmune contra LiHsp83 incluye anticuerpos de reacción cruzada con proteínas del huésped?

Como se comentó en la introducción existe la posibilidad que las HSPs del patógeno al estimular una reacción inmune contra ellas puedan inducir una reactividad cruzada contra las HSPs del huésped en este caso el ratón, debido al alto grado de conservación existente entre la LiHsp83 y la Hsp90

de mamíferos (1). Con la intención de analizar esta posibilidad en los ensayos en que la LiHsp83 fue utilizada para inmunizar ratones, se extrajeron proteínas de tumor de mamas de ratones, los preparados proteicos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron por Immunoblot.

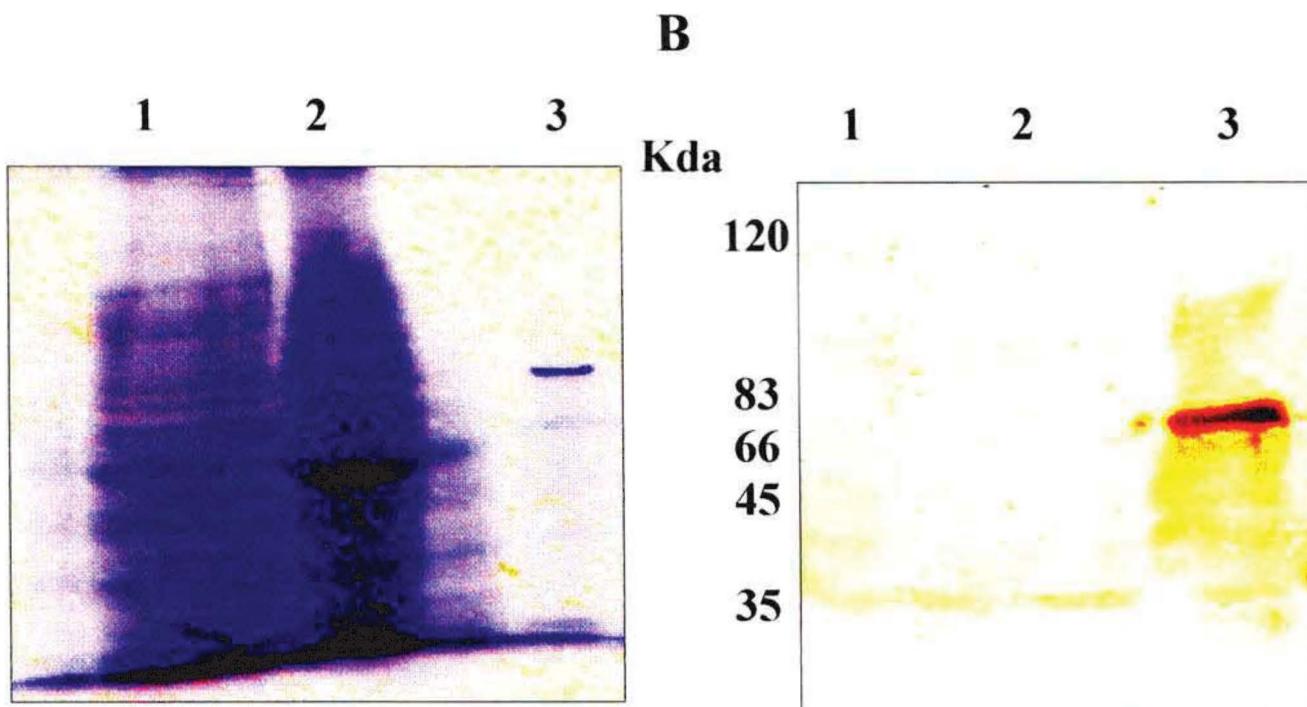


Figura 7. Análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-LiHsp83. **A**, el homogenato total de células de tumor de mamas de ratón fue disuelto en PBS 1X, de esto se obtuvo dos fracciones: pellet (calle 1) y sobrenadante (calle 2). En la calle 3 se sembró la proteína recombinante LiHsp83. Todas las fracciones fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE 10% y el gel fue entonces teñido con Coomasie blue. **B** las proteínas observadas en el gel (A) se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron por Western blot con suero de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83. A la izquierda de cada figura se indican los pesos moleculares en Kda.

En la figura 7 se puede observar que ningún antígeno de ratón fue reconocido por las muestras de suero de ratones inmunizados con la proteína

recombinante MBP-LiHsp83, descartando así la posibilidad de fenómenos de reactividad cruzada.

Análisis isotípico de los anticuerpos anti-MBP de los ratones inmunizados.

Partiendo de la base que la regulación in vivo de los isotipos de anticuerpos IgG presentes está regulada por citoquinas (54 y 51), se procedió al análisis por medio del test de ELISA con el objeto de detectar isotipos IgG1 y IgG2a producidos en contra de MBP (figura 8). Los valores en estos gráficos son expresados como la absorbancia media de cada suero test dividido la absorbancia media del suero preinmune. En el caso de los ratones inmunizados con la proteína recombinante de fusión MBP-LiHsp83 se obtuvo una potente respuesta del isotipo IgG2a anti-MBP, mientras que la presencia del isotipo IgG1 anti-MBP fue más baja (figura 8A). De hecho en el curso temporal del estudio se puede observar que la relación de reactividad IgG2a/IgG1, se extiende desde 4.0 hasta 8.6. El pico de reactividad se obtuvo en el día 28 post-inmunización, y los niveles de IgG2a y IgG1 se mantuvieron a lo largo del experimento. Este patrón de isotipos obtenidos sugiere que existe en este sistema una estimulación de células del subset Th1 acompañada de una estimulación de células Th2 más leve (los isotipos observados son resultado de las citoquinas secretadas por cada subset de células T). El grupo de ratones inmunizados solamente con MBP mostró un perfil isotípico asociado a

citoquinas Th1, debido al hecho de que sólo se detectaron anticuerpos anti-MBP del isotipo IgG2a a lo largo del experimento (fig 8B). El nivel de anticuerpos anti-MBP IgG1 no sobrepasó el punto de corte (“cut off”).

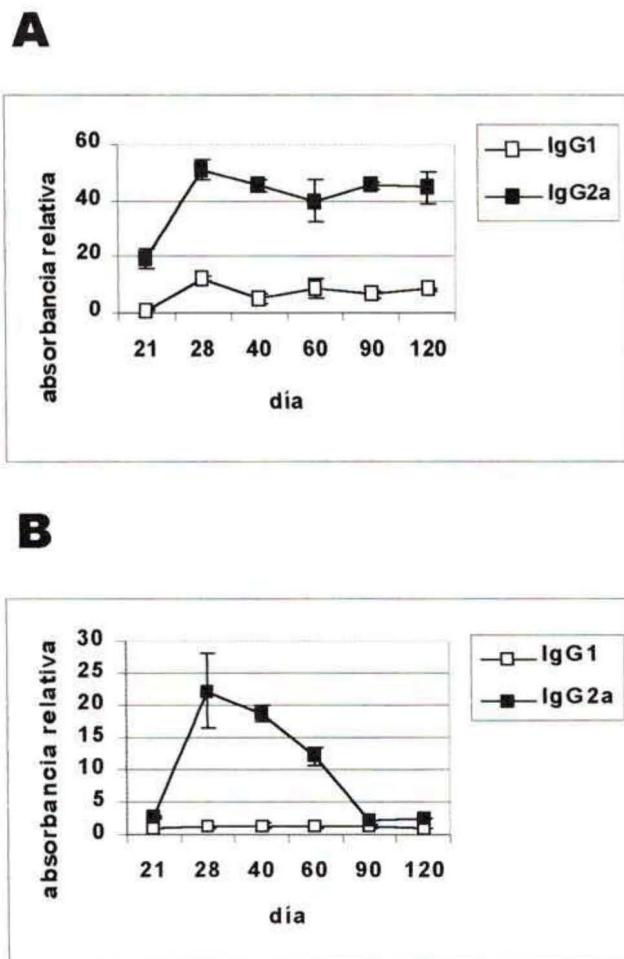


Figura 8. Análisis isotípico de los anticuerpos anti-MBP de los ratones inmunizados. Las muestras de suero se tomaron a diferentes días luego de la primera inmunización. La absorbancia relativa es expresada como la división entre el valor medio de absorbancia del suero test y el valor medio de absorbancia del suero control (preinmune) **A**, curso temporal de los isótipos IgG anti-MBP en ratones inmunizados con MBP-LiHsp83, y **B** con MBP sola.

En los ratones inmunizados con MBP mezclada con LiHsp83 los resultados obtenidos fueron los mismos que para el anterior grupo (dato no mostrado).

Análisis isotípico de los anticuerpos anti-LiHsp83 de los ratones inmunizados.

Cuando se analizó el perfil de isotipos anti-Lihsp83 con las muestras de sueros de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 se obtuvieron resultados similares a lo observado para MBP (figura9A), es decir hay una respuesta predominantemente de isotipo IgG2a anti-LiHsp83 asociada al subset de células Th1, acompañada de una leve respuesta IgG1. La relación de reactividad oscila en 3.1 llegando el día 28 a 10. En los casos de ratones inmunizados con LiHsp83 se observa un pico de reactividad a los 28 días post-inmunización (al igual que en el caso anterior) de IgG2a seguida por una caída hasta un nivel que se mantuvo a lo largo del experimento, con niveles de IgG1 indetectables (figura9B).

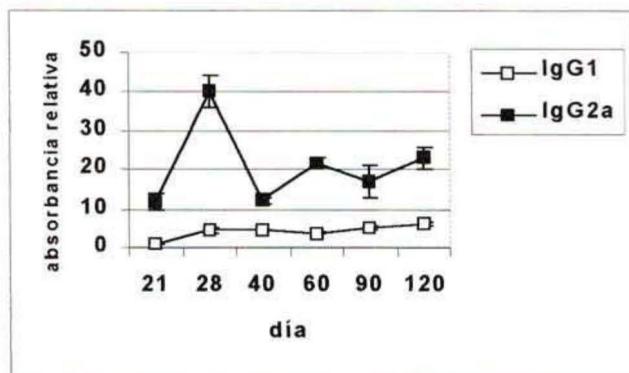
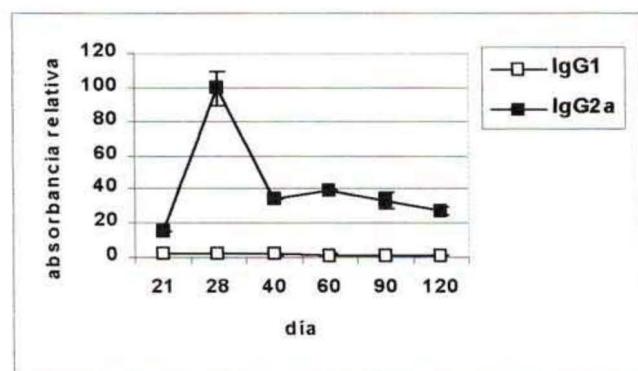
A**B**

Figura 9. Análisis isotípico de los anticuerpos anti-LiHsp83 de los ratones inmunizados. Las muestras de suero se tomaron a diferentes días luego de la primer inmunización. La absorvancia relativa es expresada como la división entre el valor medio de absorvancia del suero test y el valor medio de absorvancia del suero control (preinmune) A, curso temporal de los isotipos IgG anti-LiHsp83 en ratones inmunizados con MBP-LiHsp83, y B con LiHsp83.

Análisis de linfoproliferación dependiente de MBP.

Se procedió al estudio de la estimulación de células T en forma específica con MBP a partir de células provenientes de bazo obtenidos de los ratones inmunizados. Se utilizaron 4 ratones de cada grupo: MBP, MBP-LiHsp83, y

grupo control (sin inmunizar). La linfoproliferación generada se analizó a las 72 horas después del agregado de 10 μ g/ml de MBP. La medición de la respuesta celular proliferativa se midió mediante el agregado de 3 H-timidina 16 horas previas a los ensayos de cuantificación. La incorporación de la timidina a las cadenas nacientes de ADN se correlaciona directamente con la división celular, es decir a la proliferación de los linfocitos T (que se tienen en cultivo). Además como la timidina se encuentra tritiada dicha incorporación se puede medir, en cuanto a sus niveles, mediante un contador de centelleo, de manera que a mayor incorporación mayor cpm. medidas, y por lo tanto mayor nivel de proliferación. Los resultados obtenidos revelaron que los esplenocitos provenientes del grupo de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 proliferaron fuertemente en respuesta a MBP (Figura 10). En el caso de los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con MBP el nivel de proliferación fue también alto pero significativamente mas bajo ($p<0,05$) que el obtenido con los esplenocitos del grupo MBP-LiHsp83. El grupo control para este experimento (sin inmunizar), y el inmunizado con LiHsp83($n=2$ dato no mostrado), ambos no mostraron un nivel apreciable de proliferación.

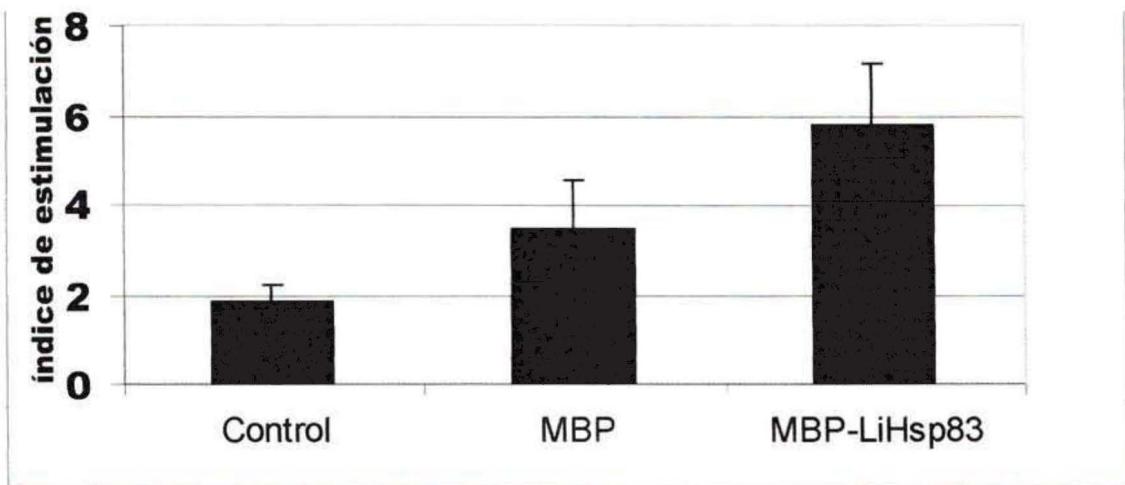


Figura 10. Ensayo de proliferación in vitro de esplenocitos de ratones inmunizados con MBP, MBP-LiHsp83, y PBS como control. Se analizaron cuatro ratones por grupo. El índice de estimulación representa el cociente entre el nivel medio de cpm del cultivo estimulado con MBP y el nivel medio de cpm de los cultivos no estimulados. Los valores correspondientes al grupo MBP-LiHsp83 son significativamente diferentes ($p<0,05$) con respecto a los obtenidos para el grupo MBP.

DISCUSIÓN

El haber fusionado MBP a LiHsp83 permitió obtener una fuerte respuesta inmune contra MBP en ratones inmunizados con esta proteína de fusión. La proteína LiHsp83 se empleó en este caso como un "adjuvante", razón por la cuál con este sistema no se requiere el uso de adjuvante convencional alguno. Este sistema, antígeno reportero(MBP)-LiHsp83 estimuló en los ratones inmunizados mayores y mas perdurables niveles de anticuerpos anti-antígeno reportero, así como también un mayor estímulo específico de células T, que la inmunización con el antígeno reportero solo. Para que haya éste tipo de respuesta contra MBP en ausencia de adjuvante fue necesario que exista un vínculo físico entre LiHsp83 y MBP, ya que la mezcla de ambas proteínas generó una respuesta inmune humoral y celular similar a la observada para MBP sola.

Una ventaja del tipo de sistema de fusión utilizado es que se obtiene un número y posición de epítopes potenciales idénticos para cada molécula administrada de MBP-LiHsp83. Ésta situación es imposible en el caso de formación de conjugados con la HSP (31, 2 y 41) o cuando se trabaja con complejos chaperona-antígeno conformados (17) donde ambas situaciones plantean trabajar con "pools" de moléculas no idénticas y con densidad variable de epítopes. De hecho, en éstos últimos casos se puede introducir variabilidad en las respuesta inmune contra los antígenos sea variando la tasa molar de antígeno y "carrier", o en el modo de fusión del hapteno al

"carrier", factores que inciden en la posición distintiva de epítopes B y T (18, 30). Así con el sistema de fusión antígeno-LiHsp83, se reducen considerablemente las variables asociadas al estudio de las proteínas de choque térmico como "carriers" moleculares e inmunogénicos de antígenos reporteros.

Una de las características principales de la respuesta humoral contra MBP dada por el sistema de fusión MBP-LiHsp83 es que la misma fue de altos niveles y de larga duración, exhibiendo una rápida y potente respuesta una semana después del refuerzo (día 21). La respuesta inmune humoral en este grupo se redujo un 30% el día 40, respecto al día 28, manteniéndose constante hasta el día 120, es decir, a lo largo del resto del experimento. Este resultado sugiere que la respuesta humoral se extendería por un tiempo sustancialmente más largo que los 120 días. Las capacidades inmunogénicas de LiHsp83 eran esperadas en parte debido a lo que se conocía para otras HSPs (49 y 48) y en parte al análisis de datos previos, tales como los que mostraban que muestras de suero de perros con leishmaniasis visceral (LV) tenían una reactividad de anticuerpos contra cuatro diferentes regiones de LiHsp83 que partían desde 35.7% hasta llegar a 88% (1), también en sueros de pacientes con LV se obtuvo una reactividad contra múltiples epítopes de células B dentro de la proteína (Angel SO, datos sin publicar).

La inmunización con MBP-LiHsp83 estimula fuertemente la respuesta celular, observándose claramente que las respuestas proliferativas de los

esplenocitos de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83, fueron mucho más alta que la obtenida en las mismas células de ratones inmunizados solamente con MBP. In vivo los isotipos de anticuerpos secretados están regulados por citoquinas, observándose que aquellas pertenecientes al perfil de respuesta inmune Th1 están asociadas a la presencia de anticuerpos del tipo IgG2a; y mientras que las citoquinas relacionadas al perfil Th2 están asociadas a la secreción de anticuerpos del tipo IgG1 (36 y 61). Nuestros resultados mostraron, que a pesar de poder observarse en ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 una respuesta anti-MBP del tipo IgG1/IgG2a, el isotipo dominante en esta respuesta fue IgG2a. De estos resultados se puede inferir, que por un lado se estimuló una potente respuesta inmune del tipo Th1, y que por otro se obtuvo también una respuesta del tipo Th2, pero más débil. Todos estos resultados han demostrado ser similares a los obtenidos en ratones inmunizados con MBP-LiHsp70 (46).

Algo curioso surge al analizar el perfil isotípico obtenido contra la proteína recombinante LiHsp83, mientras que por un lado en ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 se obtuvieron, al igual que contra MBP, ambos tipos de anticuerpos IgG1 e IgG2a, en ratones inmunizados con LiHsp83 sólo se obtuvo el isotipo IgG2a. Se da entonces el caso que la unión física MBP-LiHsp83 modifica el perfil de isotipos secretados observado en la inmunización con sus formas independientes LiHsp83 y MBP (IgG2a/IgG1 vs IgG2a). Estos resultados sugieren que la fusión confiere propiedades

inmunogénicas diferentes a la molécula respecto a sus partes por separado.

Es de destacar que la reactividad de los sueros del grupo de ratones inmunizados con MBP fue significativamente mas débil que la observada en sueros del grupo inmunizado con la fusión. Podría ser que la fusión con LiHsp83 no modifique el perfil de isotipos anti-MBP, y que lo que esté ocurriendo en verdad es que al aumentarse significativamente la respuesta contra MBP los anticuerpos de la clase IgG1 se hagan detectables. Es probable que el uso de otros antígenos reporteros, aporten datos útiles para confirmar el rol de LiHsp83 en su papel de dirigir y estimular una respuesta del tipo Th2/Th1 contra un antígeno reportero y su utilidad como vacuna.

Recientemente se ha demostrado que, péptidos provenientes del virus de la coriomeningitis linfocítica mezclados con la proteína recombinante de humanos Hsp70 estimulan una respuesta inmune protectora en los ratones inmunizados con estas preparaciones (7). Éste sistema de vacunación se basa en la evidencia previa de que la Hsp90, Hsp70 y la proteína de choque térmico gp96 pueden acomplejar péptidos y dirigirlos a la ruta de presentación en el contexto de las moléculas MHC I y II (10). En dicho modelo el uso de la Hsp70 humana como “carrier” para vacunas de aplicación en humanos evadiría el estímulo de la respuesta inmune contra la Hsp70 propia, debido a la autotolerancia. En nuestro caso, se observó una fuerte respuesta humoral contra distintas regiones de la proteína recombinante LiHsp83. Esto implica, la existencia de múltiples epítopes de células B. Debido a la

extremada conservación existente entre HSPs de patógenos y hospedadores, y al hecho recién enunciado se plantea la pregunta sobre si puede éste sistema de fusión estimular la producción de anticuerpos contra HSPs del huésped. Es evidente que un "carrier" molecular inmunoestimulador para uso en vacunas no debería producir una respuesta cruzada con proteínas del huésped. Al analizar la especificidad de la respuesta humoral contra LiHsp83 se observó que los sueros de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 o con LiHsp83 no reconocían ninguna proteína extraída de un tumor de mamas de ratón. Es de destacar que falta un control positivo (un suero o anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 de ratón) que confirme la Hsp del huésped. Sin embargo, es sabido que la proteína citoplasmática Hsp90 se expresa en altas cantidades aún en ausencia de estrés (53). Además también es sabido que las células tumorales producen altos niveles de expresión de HSPs (por ejemplo Hsp90, gp96, y Hsp70), de las cuales se extraen la Hsp90 acompañadas con péptidos para producir inmunidad protectiva (33 y 17). Que los anticuerpos anti-Hsp83 son dirigidos específicamente contra los epítopes de LiHsp83, inferirían que la respuesta humoral contra LiHsp83 está parcialmente restringida, tal vez por mecanismos que involucren la regulación de respuestas contra componentes propios (8). Resultados similares se obtuvieron para el modelo MBP-Hsp70(59).

Todos nuestros resultados avalan el valor de la LiHsp83 como candidato para su uso como "carrier" para estimular fuertemente la

respuesta inmune contra un antígeno fusionado. Mientras que en animales el uso de patógenos atenuados o proteínas purificadas en forma no muy exhaustiva está permitido para aplicar como vacunas, en humanos solo se permite el uso de péptidos o fracciones de antígenos de alta pureza (proteínas recombinantes). Frecuentemente ocurre que, tanto con péptidos como con antígenos purificados, no se obtiene una buena respuesta inmune, razón por la cual se requiere el uso de adjuvantes. La elección del adjuvante adecuado generalmente no es una tarea fácil. Para tomar sólo algunos ejemplos, en humanos el aluminio es un adjuvante de uso permitido, pero tiene la desventaja de polarizar la respuesta inmune hacia la secreción de citoquinas pertenecientes al patrón Th2 (29 y 6), con una estimulación de linfocitos T citotóxicos muy baja. Muy por el contrario, el adjuvante completo de Freund (ACF) estimula una respuesta inmune asociada a Th1 (29), pero este adjuvante no es aceptado para su uso en humanos. El sistema planteado en este trabajo mostró estimular una respuesta celular y humoral contra un antígeno reportero sin necesidad de adjuvante alguno.

¿Cómo es que la LiHsp83 ejerce su acción como “carrier” inmunogénico libre de adjuvante? En primer lugar, los patógenos expresan sus HSPs en niveles muy elevados como consecuencia del ambiente totalmente hostil al que se deben enfrentar al ser fagocitados por macrófagos(5). Durante éste proceso las HSPs han demostrado ser procesadas y presentadas al sistema

inmune. Una gran variedad de tipos de células T se han reportado poder reconocer determinantes de las HSPs (65), entre estas se encuentran, las células T "helper" (para la asistencia de células B en la producción de anticuerpos) y las células T citotóxicas (destructoras de células infectadas). Las células T γ/δ también se describieron como reconocedoras de determinantes de HSPs. En un trabajo reciente (3) se demostró que la Hsp70 de micobacterias estimula a proliferar *in vitro* células T γ/δ y α/β provenientes de ratones que no habían sido previamente expuestos a la proteína, aunque *in vivo* demostraron que la respuesta es esencialmente vía células T α/β . En segundo lugar, las HSPs están altamente conservadas entre los patógenos, por lo tanto esta situación puede ser conveniente como objetivo a focalizar por parte del sistema inmune. En tercer lugar tal como ya se mencionó, la Hsp90, Hsp70 y la proteína de choque térmico gp96 pueden acomplejar péptidos y dirigirlos a la ruta de presentación en el contexto de las moléculas MHC (10). Es sabido que las células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales poseen receptores para algunas HSPs que captarían éstos péptidos acomplejados con las HSPs en forma específica(56). Por lo tanto se sugiere que el sistema de fusión MBP-LiHsp83 puede ser captado por cualquier tipo de célula presentadora de antígeno (célula B mediante anticuerpo, o APC clásica), luego presentar peptidos derivados del sistema de fusión en el contexto del MHC, y esto es reconocido por células T reactivas

a estos sistemas, con la consiguiente estimulación de la inmunidad humoral y celular observada en nuestro sistema.

Suzue y Young (58) demostraron en 1996 por primera vez que la proteína Hsp70 de *M. tuberculosis* estimulaba una fuerte respuesta inmune humoral y celular contra un antígeno del virus HIV (p24) cuando ambas moléculas estaban ligadas físicamente. Mas tarde, Rico y col (46) observaron el mismo fenómeno utilizando como "carrier" la Hsp70 de *L. infantum* y como antígeno reportero la proteína MBP. En este trabajo se demuestra que una proteína de la familia de las Hsp90, la Hsp83 de *L. infantum*, también tiene propiedades inmunoestimuladoras cuando el antígeno de interés esta fusionado. Es de destacar que durante infecciones naturales por *Leishmania*, tanto en perros como en humanos, la proteína Hsp83 del parásito estimula una mayor respuesta humoral y celular que la proteína Hsp70 (48y 49, S.O. Angel, datos no publicados). Sin embargo, al analizar comparativamente los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Rico y col (46) se observa que ambas proteínas producen una respuesta similar contra MBP. En particular, pareciera que LiHsp83 estimula una mayor secreción de IgG1 específicas que LiHsp70, aunque en ambos casos el isotipo predominante fue IgG2a. Quizás un análisis de la producción de citoquinas específicas pueda arrojar otras diferencias.

Finalmente, se destaca que la fusión de un antígeno de interés a la proteína LiHsp83 es una buena alternativa frente a otros adjuvantes y Hsps para su aplicación como "carrier" de inmunización. Con el objetivo de analizar la utilidad de éste sistema como vacuna, así como también la confiabilidad de la respuesta celular T y B dirigida por la LiHsp83 como "carrier", otras

proteínas recombinantes como *Toxoplasma* rRop2(34) o rSAG1 (42) se fusionarán a esta HSP, en nuestro laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

-
-
- 1) Angel, S.O., Requena, J.M., Soto, M., Criado, D. and Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Tropica*. 1996; 62: 45-56.
 - 2) Barrios, C., Lussow, A.R., Van Embden, J.D.A., Van der Zee, R., Rappuoli, R., Constatino, P., Louis, J.A., Lambert, P.H. and Del Giudice, G. Mycobacterial heat-shock proteins as carriers molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and *Bacillus Calmette Guerin* priming. *European Journal of Immunology*. 1992; 22: 1365-1372.
 - 3) Bonorino C, Nardi NB, Zhang X, Wysocki LJ. Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement. 1998. *Journal of Immunology*; 161: 5210-5216.
 - 4) Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976 *Analytical Biochemistry*; 72: 248-254.
 - 5) Buchmeier NA and Heffron F. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages 1990. *Science*; 248:730-732.
 - 6) Burghaus, P.A., Wellde, B.T., Hall, T., Richards, R.L., Egan, A.F., Riley, E.M., Ballou, W.R., Holder, A.A. Immunization of *Aotus nancymai* with recombinant C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in liposomes and alum adjuvant does not induce protection against a challenge infection. 1996. *Infection and Immunity*; 64: 3614-3619.
 - 7) Ciupitu, A-M.T., Petersson, M., O'Donnell, C.L., Williams, K., Jindal, S., Kiessling, R. and Welsh, R.M. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. 1998. *Journal of Experimental Medicine*; 187: 685-691.
 - 8) Cohen IR, and Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus 1991. *Immunol Today* : 12:105-110.
 - 9) Craig EA.. The heat shock response. 1985. *CRC Crit Rev Biochem*; 18:239-280.
 - 10) de Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE, Otsu K.. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. 1992. *J Clin Microbiol*; 30:330-335.
-

-
- 11) De Nagel, D.C. and Pierce, S.K. Heat shock proteins in immune responses. 1993. *Critical Review in Immunology*; 13: 71-81.
- 12) Dragon EA, Sias SR, Kato EA, Gabe JD. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. 1987. *Mol Cell Biol*; 7:1271-1275.
- 13) Ellis J, Vies SM van der. Molecular chaperones. 1991. *Annu. Rev. Biochem.*; 60:321.
- 14) Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. 1993. *Annu. Rev. Cell. Biol.*; 9:601.
- 15) Georgopoulos C, Libereck K, Zylitz M, Ang D. Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autorregulation of the heat shock response. In: Morimoto TR, Tissierés A, Georgopoulos G, eds. *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. 1994. Planview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 209-249.
- 16) Gething MJ and Sambrook J. Protein folding in the cell. 1992. *Nature*; 355:33-45.
- 17) Grun, J.L. and Maurer, P.H. Different T helper subsets elicited in mice utilising two different adjuvant vehicles: the role of endogenous IL-1 in proliferative responses. 1989. *Cellular Immunology*; 121: 131-145.
- 18) Hanna N, Jarosch E, and Leskowitz. Altered immunogenicity produced by change in mode of linkage of hapten to carrier. 1972. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 140: 89.
- 19) Harlt FU, Hlodan R, and Langer T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. 1994. *Trends Biochem Sci.*; 19:20-25.
- 20) Hunter KW, Cook CL, Hayunga EG. 1984. Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 125: 755-760.
- 21) Jendoubi M, Bonnefoy S. Identification of a heat shock-like antigen in *P. falciparum*, related to the heat shock protein 90 family. 1988. *Nucleic Acid Res.*; 16: 10928.
- 22) Jindal, S. Heat shock proteins: applications in health and disease. *Trends in Biochemistry Technology*. 1996; 14: 17-20.
- 23) Johnson KS, Wells K, Bock JV, Nene V, Taylor DW, Cordingley JS. The 86-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* is a heat-shock protein homologous to yeast HSP-90. 1989. *Mol Biochem Parasitol*; 36: 19-28.
-

-
- 24) Kaufman SHE y Schoel., *The Biology of the Heat Shock Proteins and Molecular Chaperonas.* 1994. Cold Spring Harbor, NY.: p.495.
- 25) Kaufmann, S.H. Heat shock proteins and the immune response. 1990. *Immunology Today*: 11: 129-136.
- 26) Kaufmann, S.H.E., Vath, U., Thole, J.E.R., Van Embden, J.D.A. and Emmrich, F. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64 kilodalton protein. 1987. *European Journal of Immunology*: 17: 351-357.
- 27) Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
- 28) Lawrence F, Robert-Gero M. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 82:4414-4417.
- 29) Lindblad, E.B. Aluminium adjuvants. 1995. In: *Theory and practical application of adjuvants*. Steward-Tull FES (ed), Wily, Chichester.
- 30) Lowenadler B, and Lycke N. Fusion proteins with heterologous T helper epitopes: recombinant *E. Coli* heat-stable enterotoxin proteins. 1994. *Int. Rev. Immunol.*; 11:103.
- 31) Lussow, A.R., Barrios C, Van Embden J, Van der Zee R, Verdini AS, Pessi A, Louis JA, Lambert PH, Del Guidice G. Mycobacterial heat- shock proteins as carrier molecules. *European Journal of Immunology*. 1991; 10: 2297-2302.
- 32) Macario AJL, Dugan CB, Conway de Macario E. A dnaK homolg in the archaebacterium *Methanosarcina mazei* SG. 1991. *Gene*; 108:133.
- 33) Macario, A.J.L. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Clinical Laboratory Research*. 1995; 25: 59-70.
- 34) Martín, V., Arcavi, M., Amendoeira, M.R.R., de Souza Neves, E., Santillán, G., Guarnera, E., Garberi, J.C. and Angel, S.O. Detection of human anti-*Toxoplasma* specific immunoglobulins A, M and G by a recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 protein. 1998. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 5: 627-631.
- 35) Matthews R y Burnie J.. The role of hsp90 in fungal infection. 1992. *Inmunol Today*; 13:345-348.
- 36) Murray PJ, and Young RA. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. 1992. *J. Bacteriol*; 174:4193.
-

-
- 37) Newcomb, J.R. and Cresswell, P. Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated alphabeta dimers. 1993. *Journal of Immunology.*: 150: 499-507.
- 38) Oftung F, Geluk A, Lundin KE, Meloen RH, Thole JE, Mustafa AS, Ottenhoff THMapping of multiple HLA class II-restricted T-cell epitopes of the mycobacterial 70-kilodalton heat shock protein. 1994. *Infect Immun.*: 62: 5411-5418.
- 39) Parsell DA, Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. 1993. *Annu. Rev. Genet.*: 27:437.
- 40) Parsell DA, Sanchez Y, Stitzel JD, Lindquist S. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide binding sites. 1991. *Nature*: 353:270.
- 41) Perraut R, Lussow AR, Gavoille S, Garraud O, Matile H, Tougne C, Van Embden, Van der Zee, Lambert PH, Gysin J, and Del Giudice. Successful primate immunization with peptides conjugated protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants. 1993. *Clin. Exp. Immunol.*: 93: 82.
- 42) Petersen, E., Nielsen, H.V., Christiansen, L. and Spenter, J. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. 1998. *Vaccine* ; 16: 1283 – 1289.
- 43) Pratt WB, Welsh MJ. Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. 1994. *Semin. Cell. Biol.*: 5:83.
- 44) Requena, J.M., Soto, M., Guzman, F., Maekel, A., Noya, O. Patarroyo, M.E. and Alonso C. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp 70 in chagasic and healthy individuals. *Molecular Immunology*. 1993; 30: 1115-1121.
- 45) Richman, S.J., Vedick, T.S. and Reese, R.T. Peptide mapping of conformational epitopes in a human malarial parasite heat shock protein. *Journal of Immunology*. 1989; 143: 285-292.
- 46) Rico, A.I., del Real, G., Soto, M., Quijada, L., Martinzez-A, C., Alonso, C. and Requena, J.M. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu Balb/c mice. *Infection and Immunity*. 1998; 66: 347-352.
- 47) Shapira M, PedrazaG. Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis*. 1990. *Mol. Biochem Parasitol.*; 42:247-256.

-
- 48) Skeiki, YAW, Benson DR, Costa JLM, Badaro R and Reed GS. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. 1997. *Infect Inmun.*: 65:5368-5370.
- 49) Skeiky, Y.A.W., Benson DR, Guderian, J.A., Badaro, Whittle, J.A., Bacelar, O., Carvalho E.M. and Reed, S.G. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infection and Immunity*. 1995; 63: 4105-4114.
- 50) Smejkal RM, Wolf R, Olenick JG. *Leishmania braziliensis panamensis*: increased infectivity resulting from heat shock. 1988. *Exp Parasitol.*; 65: 1-9.
- 51) Snapper, C.M. and Paul, E.W. Interferon and B cell stimulatory factor -1 reciprocally regulate Ig isotype production. 1987. *Science*; 236: 944-947.
- 52) Soto M, Requena JM, Quijada L, Garcia M, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. 1995. *Immunol Lett*; 48: 209-14.
- 53) Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Angel, S.O., Gomez, F., Guzman, F., Patarroyo, M.E. and Alonso, C. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. 1995. *Clinical and Experimental Immunology*; 100: 246-252.
- 54) Srivastava, P.K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R.J. and McQuade, K.L. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptative world. 1998. *Immunity*; 8: 657-665.
- 55) Srivastava, P.K., Udon, H., Blachere, N.E. and Li, Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 1994, 39, 93-98.
- 56) Srivastava PK, Maki RG. Stress-induced proteins in immune response to cancer. 1991. *Curr Top Microbiol Immunol*; 167: 109-123.
- 57) Subjeck JR, Shyy T-T. Stress proteins systems of mammalian cells. 1986. *Am. J. Physiol*; 250:C1.
- 58) Suzue K y Young RA., Adjuvant-free hsp 70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. 1996. *Journal of Immunology*; 156:873-879.
- 59) Udon H, Levey DL, Srivastava PK .Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. 1994. *Proc Nat Acad Sci USA*; 91: 3077-3081.
-

-
- 60) Udon H, Srivastava PKJ. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. 1994. *Inmunol*; 152:5398.
- 61) Vanbuskirk A, Cump BL, Margoliash E, Pierce SK. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. 1989. *J Exp Med*; 170:1799.
- 62) Welch WJ. Mammalian stress response: cell phisiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. 1992. *Physiol. Rev.*; 72:1063.
- 63) Wililison KR, Kubota H. The structure, function, and genetics of the chaperonin containing TCP-1 (CCT) in eukariotic cytosol In: Morimoto TR, Tissierés A, Georgopoulos G, eds. *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. 1994. Planview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 299-312.
- 64) Young DB. Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. 1992. *Curr Opin Immunol*; 4:396-400.
- 65) Young, R.A. Stress proteins and immunology. *Annual Review in Immunolgy*. 1990; 8: 401-420.
- 66) Zilberstein D, and Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. 1994. *Annu. Rev. Microbiol.*; 48: 449-470.