

ARTICULO

Evaluación de un método para el aislamiento de péptidos naturales de “*Leishmania spp*”.Maria Gabriela Liscano¹, Zahira Longa², Mariangela Infante¹, Senobia Telles¹

¹Laboratorio de Parasitología Molecular,
Instituto de Biomedicina MPPS –
U.C.V. San José, Caracas – Venezuela.

²Hospital Universitario de la Universidad
de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Correspondencia: Senobia Télles

E-mail: stellesq@gmail.com

Recibido: Febrero 2010 **Aceptado:** Diciembre 2010

RESUMEN

Se cree que la habilidad de los macrófagos para procesar y presentar antígenos de *Leishmania* es necesaria para su eficiente interacción con células T efectoras y con citocinas secretadas localmente, lo cual induce actividad leishmanicida. Receptores de células T (RCT) reconocen péptidos antigénicos asociados a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y esta interacción trimolecular inicia las vías de señalización específicas de antígeno en las células T estimuladas. En el desarrollo de vacunas contra enfermedades producidas por parásitos intracelulares, se recomienda el esclarecimiento de los mecanismos moleculares asociados, particularmente la identificación de péptidos (epítopes de células T) que puedan estimular un RCT dado, es primordial. En este sentido, en nuestro laboratorio consideramos la posibilidad de identificar péptidos naturales de *Leishmania spp.* capaces de estimular subpoblaciones de células T productoras de citocinas asociadas con protección de la enfermedad. Como primer paso, utilizamos un método descrito por Malik y Strominger (2000.), con algunas modificaciones para aislar complejos CMH/II-péptidos. Para este propósito, se infectó una línea celular de monocitos humanos con promastigotes de *Leishmania brasiliensis* y los complejos expresados se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad y se fraccionaron por RT-HPLC. Las fracciones de péptidos obtenidas se analizaron para determinar su capacidad de estimular una respuesta proliferativa de células T y secreción de citocinas. Los resultados obtenidos con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes infectados con *Leishmania*, mostraron reactividad importante con dos de las fracciones de péptidos ensayadas, mientras el resto de las fracciones fueron incapaces de inducir estimulación celular con la estrategia utilizada.

Palabras clave: Leishmaniosis, péptidos, CMH

ABSTRACT

Evaluation of a Method for the *Leishmania spp* Natural Peptide Isolation

The ability of macrophages to process and present *Leishmania* antigens is thought to be needed for their efficient interaction with effector T cells and locally-delivered cytokines which induce a leishmanicidal activity. T cell receptors (TCR) recognize antigenic peptides associated with the major histocompatibility complex (MHC) molecules, and this trimolecular interaction initiates antigen-specific signaling pathways in the responding T cells. In the development of vaccines for intracellular parasitic diseases, it is of pivotal importance the elucidation of the immunological mechanisms associated with them, particularly, the identification of peptides (T cell epitopes) that can stimulate a given TCR. Thus, we considered the possibility of identifying natural *Leishmania spp* peptides able to stimulate T cell subpopulations that produce a pattern of cytokines associated with disease protection. As a first step in the study, we used a method described by Malik and Strominger (2000), with significant modifications to isolate CMH/II-peptide complexes. For this purpose, a cell line of human monocytes were infected with promastigotes *Leishmanibraziliensis*, and the expressed complexes were purified by immunoaffinity chromatography, and fractionated by RT-HPLC. The HPLC fractions obtained were tested for their capacity to stimulate a T cell proliferative response and cytokine secretion. Results obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from *Leishmania*-infected patients showed an important reactivity with two of the fractions tested, while the rest of the fractions were unable to induce cell stimulation with the strategy used.

Keywords: Leishmaniasis, peptides, MHC.

INTRODUCCIÓN

Debido a que los macrófagos son la célula hospedadora de *Leishmania spp.* y el principal sitio para la proliferación y supervivencia del parásito durante la infección, ellos juegan un papel central en la enfermedad al destruir los parásitos cuando son activados correctamente. Esta activación de macrófagos infectados resulta en la presentación de antígenos del parásito por las células infectadas, especialmente linfocitos Th1CD4+, importantes mediadores de la inmunidad protectora. Los péptidos generados por el procesamiento de proteínas antigénicas enlazan a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y posteriormente son presentadas sobre la superficie de la célula para el reconocimiento por el RCT (1-2).

En los últimos años, varios grupos han aislado péptidos procesados naturalmente, enlazados a moléculas clase I y clase II, caracterizando los mismos mediante secuenciamiento directo o por analogía a péptidos sintéticos (3-6). Los resultados de estos estudios han proporcionado información precisa sobre los epítopes seleccionados por la célula hospedadora (longitud, secuencia, residuos críticos); sin embargo, la mayoría de los péptidos se han aislado a partir de células B no infectadas experimentalmente, procesados a partir de proteínas propias o del medio de cultivo celular. En el caso de *Leishmania spp.*, se han reportado algunos estudios que demuestran tanto el procesamiento como la expresión del complejo péptido-CMH. Sin embargo,

sólo un estudio ha reportado el aislamiento de péptidos a partir de células presentadoras de antígeno infectadas con *Leishmania spp.* (7). En nuestro laboratorio, en los últimos años se ha desarrollado una línea de investigación que persigue la determinación de epítopes naturales de células T.

Un primer paso de esta investigación fue la obtención de fracciones de péptidos a partir de complejos MHC-péptidos expresados en la superficie de una línea de macrófagos humanos infectados experimentalmente con *Leishmania brasiliensis*. En este estudio se aprovechó el conocimiento de que los parásitos del género *Leishmania* residen y se replican exclusivamente dentro de macrófagos infectados, específicamente en el compartimiento fagolisosómico, donde también ocurre la asociación entre péptidos procesados del parásito y moléculas clase II del CMH, por lo que el sistema constituye un modelo ideal para el estudio e identificación de epítopes de células T.

MATERIALES Y METODOS

Células y cultivos celulares. Para los ensayos de infección y como fuente de moléculas MHC-II (HLA/DR), se usó la línea celular de monocitos humanos THP-1 (ATTC, Roxville, MD) donada por el Dr. Ferdinando Liprandi (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Venezuela). Esta fue cultivada en medio RPMI 1640 (Gibco BRL), con 2 mmol/L, L-glutamina (Sigma), 100 µg/mL penicilina-streptomina (Sigma) y 10% suero fetal bovino (Gibco BRL), en frascos de poliestireno (Corning).

Población de estudio. En este estudio piloto se utilizó una muestra de 10 pacientes provenientes de áreas endémicas para Leishmaniasis, con historia clínica y evidencias físicas de lesiones compatibles con la enfermedad y con una prueba de Montenegro positiva. Los individuos que decidieron voluntariamente ingresar al estudio firmaron previamente el consentimiento informado de acuerdo con los parámetros de la declaración de Helsinki, 1981.

Parásitos. Como fuente de antígenos se utilizó la cepa de *Leishmania brasiliensis* MHOM/BR/84/LTB300, mantenida en su forma virulenta por pases sucesivos en ratones BALB/c. Los cultivos de parásitos fueron preparados en medio SDM-79 (JRH Biosciences) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino, 50 U/mL penicilina (Gibco BRL), se colectaron promastigotes en su estadio infectivo (metacíclicos) de cultivos de 5 días de crecimiento.

Anticuerpos monoclonales. Para la inmunotinción de complejos HLA/DR-péptidos de *Leishmania* se utilizó un anticuerpo anti-humano HLA/DR (AHU0182, Biosource) y el anticuerpo monoclonal LB3.1 (anti-HLA/DR) secretado por el hibridoma LB3.1, donado por el Dr. J.L. Strominger, Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, USA). La purificación del anticuerpo monoclonal LB3.1 se realizó cultivando las células del hibridoma LB3.1 en medio D-MEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 2 mM glutamina (Gibco BRL), 50 U/mL penicilina (Gibco BRL) y

50 µg/mL streptomycin (Gibco BRL) y usando el kit de purificación T-Gel (Pierce), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Ensayo de infección de macrófagos. Para activar las células THP-1, (previamente tratadas con 0.1 µg/mL Phorbol 12-Myristate 13-Acetate –PMA-), se cultivaron con 50 U/mL de IFN-γ por 48 h a 37°C, 5% CO₂ en frascos de cultivo de 75 cm² (Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) en medio libre de antibiótico. Una vez establecida la monocapa de macrófagos se infectó a una relación de 5 parásitos de *Leishmania brasiliensis* metacíclicos por macrófago (5:1) y se incubó por un período inicial de 6 h a 26°C y luego por 48 horas a 37°C, 5% CO₂ en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, 2mM L-glutamina, 1 mmol/L piruvato de sodio (Gibco-BRL) y 100 µg/mL penicilina-streptomycin (Gibco-BRL). La monocapa celular se recogió y se lavó con PBS; posteriormente las células macrofágicas se sometieron a inmunotinción para detectar la expresión de moléculas HLA/DR y/o colectadas para el aislamiento de los complejos HLA/DR-péptidos de *Leishmania*.

Inmunotinción de Complejos HLA-DR/péptidos de *Leishmania*. Para determinar si macrófagos infectados con *L. brasiliensis* expresaban HLA-DR/antígenos del parásito, se desarrolló un marcaje sencillo de inmunotinción de macrófagos sobre láminas portaobjeto. Se partió de cultivos de la línea celular THP-1, tratada con 100 ng/mL PMA, 50 U/mL IFN-γ recombinante humano e infectada con *Leishmania brasiliensis* por 48 h a 37°C, 5% CO₂ y no tratada con IFN-γ. Ambos ensayos fueron detectados usando el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR (Biosource) por el sistema Avidina/Biotina, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Purificación de complejos HLA/DR-péptidos y obtención de Moléculas HLA/DR y fracciones de péptidos de *Leishmania*. Los complejos HLA/DR-péptidos de *Leishmania* fueron purificados por cromatografía de afinidad de acuerdo al método descrito por Malik y Strominger (8) con algunas modificaciones. Se colectaron las células THP-1 infectadas con *Leishmania brasiliensis* y se resuspendieron en 8 volúmenes de peso seco de solución de lisis (1% Nonidet P-40, 150 nmol/L NaCl, y 20 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 1 nmol/L PMSF). El lisado fue clarificado por centrifugaciones sucesivas a 15000 g por 30 min y luego a 150,000g por 90 min. Aproximadamente 10mg/mL del anticuerpo monoclonal LB3.1 en PBS se acopló a la resina POROS 20 AL (Perseptive Biosystems). El lisado que contenía los complejos se sometió a filtración utilizando filtros de 0,45 y 0.22 µm (Millipore) y fueron corridos a través de columnas con POROS 20 AL-NMS y anticuerpos acoplados a la resina (POROS 20 AL-LB3.1) a una velocidad de flujo de 3 mL/min en un Sistema FPLC (Pharmacia). Finalmente, las fracciones de péptidos de mayor Absorbancia se reunieron y se redujo el volumen en un sistema de concentración Millipore (47 MM, 84 PSI máx); se aislaron de los complejos mediante su elución con 10% ácido acético, usando columnas P-2 (Bio-Rad). Posteriormente, las moléculas HLA-DR unidas a la resina se recuperaron mediante elución con una solución de ácido acético al 10%. Las fracciones que

contenían los péptidos fueron reunidas y concentradas por evaporación en un equipo Speed-Vac, antes de su fraccionamiento por RT-HPLC.

Fraccionamiento por HPLC en Fase Reversa (RP-HPLC). Las fracciones de péptidos preparada como se describió previamente, fueron analizadas por HPLC en fase reversa. El fraccionamiento se desarrolló aplicando un gradiente lineal (0 a 60%) de una solución de acetonitrilo: agua: TFA (60:40:0 1% respectivamente), y circulación a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La absorbancia fue monitoreada a 280 nm. Se colectaron los principales picos peptídicos, y luego fueron secados en un concentrador Speed-Vac. Para ello, los péptidos procesados naturalmente (1.100 µg) se resuspendieron en 200 µL de 0,1% TFA/10% ACN en H₂O bidestilada (ddH₂O), y se fraccionaron usando 0,12% TFA/99.88% ddH₂O (buffer A) y 99.9% ACN/0, 1% TFA (buffer B) en un sistema HPLC Waters equipado con una columna Vydac C₁₈ (300A, 5 µm, 4,6 x 250 mm) (Waters, Milford, MA).

Preparación y detección de complejos HLA/DR-péptido. Para detectar los complejos, se desarrolló una serie de construcciones *in vitro* compuestas por 8 de las fracciones de péptidos obtenidas por HPLC de la siguiente manera: se incubó por 48 horas a 37°C un exceso molar de aproximadamente 5 veces las fracciones de péptidos colectadas (frapep) con 1 – 5 µmol/L de las moléculas HLA/DR purificadas por inmunoafinidad. Los complejos resultantes (HLA/DR-péptido) se purificaron por filtración en gel para eliminar los agregados y péptidos no enlazados. Para determinar el enlazamiento relativo entre los anticuerpos presentes en el suero de pacientes y los complejos construidos (HLA/DR-FRAPEP) se desarrolló un ensayo de ELISA. Para ello, se incubó por 16 h a 4°C un anticuerpo anti-humano IgG en placas de 96 pozos (NUNC TM Brand Products), siguiendo con el bloqueo por incubación por 2 h a temperatura ambiente con BSA al 3% en PBS. Las placas se lavaron 3x con TBS-T20 (25 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2). Se incubaron varias diluciones en PBS + 0.1% Tween20, 0.3% BSA de los complejos formados en las placas preparadas previamente con anticuerpo anti-humano IgG por 2 h a 25°C. Posteriormente, las placas se lavaron 3x y se incubaron en las mismas condiciones con un anticuerpo anti-HLA/DR humano (Biosource), siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de 3 lavados las placas se incubaron con Anti-IgG humano (PIERCE), diluido 1/3.000, siguiendo con lavados y revelado utilizando o-diaminobenzidine (Sigma). Finalmente, se midió la Absorbancia en un lector de placas de microtitulación (BT 2000 Microkinetics Reader, Fisher Biotech) a 405 nm.

Ensayos *in vitro* de proliferación de células T y determinación de citocinas. Se colectaron muestras de sangre de pacientes con leishmaniosis cutánea en el Instituto de Biomedicina, y de personas sanas con una edad promedio de 43 años como controles. Las células de sangre periférica (CMSP) fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad usando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Para los ensayos de proliferación de CMSP, 2x10⁵ células/pozo fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (GIBCO aisley, United Kingdom) suplementado con penicilina/estreptomina, L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (GIBCO., más 1% de medio mínimo esencial (GIBCO),

siguiendo con su incubación a 37°C en un ambiente de 95% aire y 5% de CO₂ por triplicado en placas fondo plano con complejos HLA/DR-Frapep y/o una solución de Frapep (0.5 µg/pozo o 5 µg/pozo, respectivamente) por 5 días. Como control positivo se utilizó PHA (5 µg/pozo). Las células se pulsaron con 0,5 µCi/pozo de (3H)-thymidine (Amersham, United Kingdom) por 18 h de cultivo y la incorporación del marcaje se evaluó mediante un contador de centelleo líquido (LKB Wallac). Los datos se representan como la media de índices de estimulación calculados por división de las medias de CPM de los cultivos estimulados y no estimulados. Las citocinas se midieron en los sobrenadantes de CMSP cultivadas en las mismas condiciones estimuladoras usadas en los ensayos de linfoproliferación previamente descritas. Los sobrenadantes se colectaron luego de 18, 24 and 72 h de incubación, se centrifugaron y almacenaron a -70°C. La producción de citocinas IL-4, IL-10, IL-12 y el INF-γ se determinó mediante ELISA usando el inmunoensayo humano Quantikine (R&D Systems), y siguiendo las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS

Infección de macrófagos Se infectó la línea celular de monocitos humanos THP-1 con parásitos de *Leishmania brasiliensis* en su forma metacíclica en varias proporciones (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40) y el porcentaje de macrófagos expresando antígenos unidos a moléculas HLA/DR se detectó mediante inmunocitoquímica. Para estos experimentos se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos a la molécula HLA/DR. La mejor respuesta de expresión en relación a la proporción de infección fue de 5 parásitos por célula (5:1).

Expresión de moléculas HLA/DR. La expresión de moléculas CMH clase II en la superficie de macrófagos (monocitos humanos THP-1) activados por IFN-γ se analizó mediante inmunohistoquímica. Los resultados mostraron, en tres experimentos independientes, altos niveles de estas moléculas en la superficie de este tipo celular, inducidos luego de 24 horas del tratamiento con IFN-γ recombinante, comparado con células control no tratadas. Fig. 1

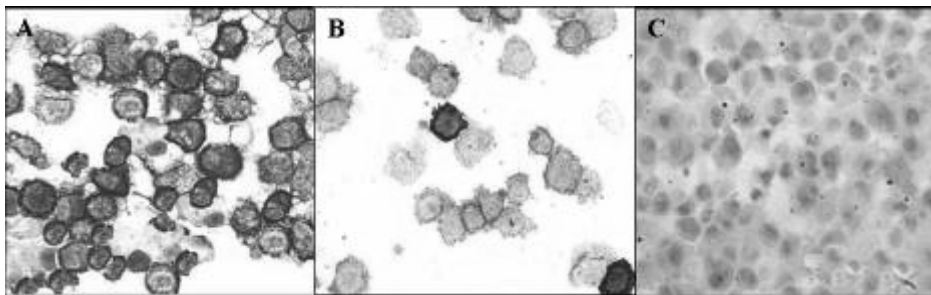


Fig. 1: Complejos HLA-DR-péptidos expresados en la línea celular de monocitos humanos (THP-1). Las células fueron tratadas con 100 ng/ml Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), 50 U/mL IFN-γ e infectadas con *Leishmania brasiliensis*. **A.** tratadas con 50 U/mL IFN-γ humano y **B.** no tratadas con IFN-γ. Ambos ensayos fueron revelados usando el anticuerpo monoclonal anti-HLADR (AHUO182, Biosource). **C.** Ensayo tratado con IFN-γ y revelado con un anticuerpo no relacionado.

Obtención de complejos CMH-péptidos de *Leishmania* y aislamiento de moléculas HLA/DR. El sistema de cromatografía de afinidad utilizado mostró ser de alta eficiencia, logrando obtener en la experimentación una suspensión de complejos HLA/DR-péptidos de *Leishmania*, de la cual, mediante separación acida, se obtuvo una fracción de péptidos y una suspensión importante de moléculas HLA/DR pura. Fig. 2.

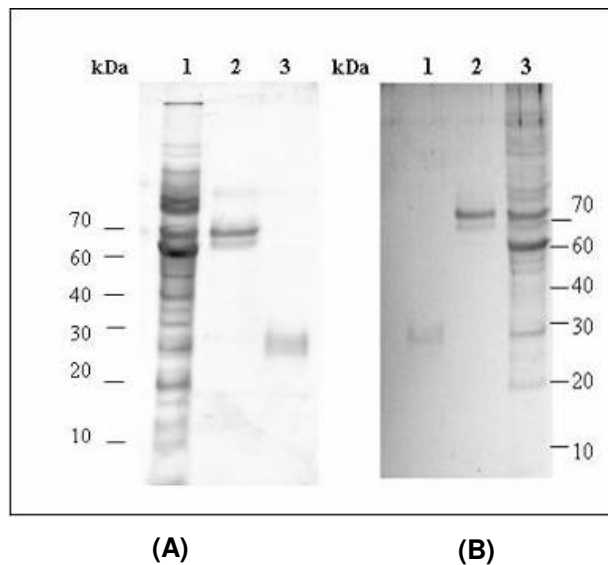


Fig. 2. **A.** Determinación de la Pureza de las Moléculas HLA-DR mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE), revelada con tinción de plata. 1. Marcadores de Peso Molecular; 2. Molécula HLA-DR. 3. Subunidades HLA-DR (29 y 34 kDa). **B.** *Western blot* mostrando la detección de la Molécula HLA/DR. En la reacción se utilizó un extracto soluble de monocitos humanos (THP1) tratados con Phorbol 12-Myristate 13-Acetate y Gamma Interferón Humano recombinante (r- γ -INF) y el Ac Monoclonal anti-HLA/DR (AHU0182). 1. Subunidades HLA/DR (29 y 34 kDa), 2. Molécula HLA/DR y 3. Marcadores de Peso Molecular.

Perfiles Cromatográficos. Los resultados mostraron que la separación por HPLC define claramente las fracciones de péptidos aisladas a partir de macrófagos infectados con *Leishmania brasiliensis*, en comparación con células no infectadas, como se observa en los perfiles cromatográficos mostrados en la Fig. 3. Los picos correspondientes a péptidos que sólo aparecen en la preparación de macrófagos infectados se muestran enumerados (Fig. 3). De estos picos, las ocho principales fracciones: F4, F5, F8, F14, F15, F19, F21, y F28 (identificados con flechas), se sometieron a un segundo fraccionamiento para comprobar la individualidad y homogeneidad de los péptidos presentes en las fracciones iniciales, y finalmente se seleccionaron dos de estas fracciones para desarrollar un ensayo piloto de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) proveniente de pacientes infectados con *Leishmania*.

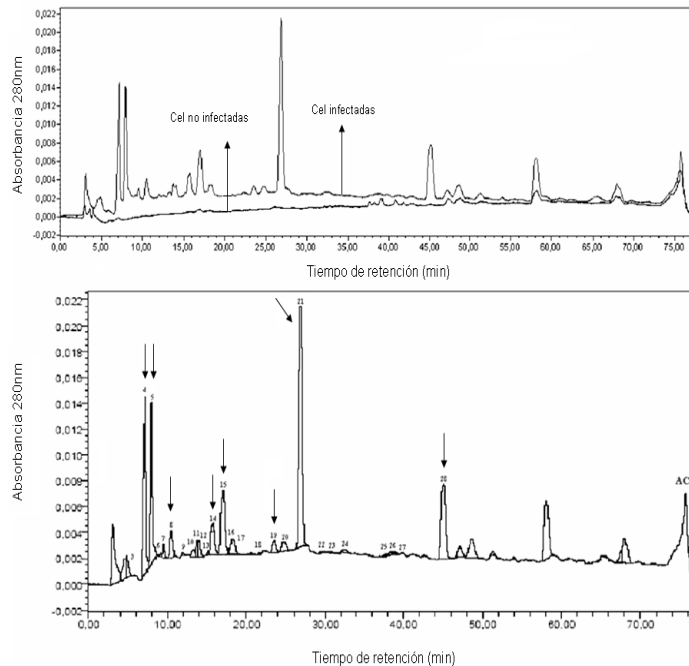


Fig. 3. Perfil cromatográfico (HPLC) de péptidos aislados de los complejos purificados (HLA/DR/péptidos). Los péptidos se aislaron a partir de macrófagos humanos infectados y no infectados con *L. brasiliensis* (MHOM/BR/84/LTB300). Comparación de Cromatogramas de células infectadas (arriba) versus no-infectadas (abajo). Los picos peptídicos presentes sólo en la preparación de macrófagos infectados se muestran enumerados. Las fracciones de péptidos seleccionados se indican con flechas.

Ensayos de estimulación de CMSP de pacientes con la enfermedad. Para detectar la activación linfocítica se realizaron ensayos de proliferación linfoblástica utilizando los antígenos solubles y las fracciones peptídicas naturales formando complejos con las moléculas del CMH previamente purificadas (fra/péptido-HLA/DR) usando CMSP provenientes de pacientes portadores de la enfermedad. En el caso de las fracciones peptídicas solubles, se observó una estimulación linfocitaria menor ubicada entre 180 y 260 cpm con respecto al antígeno soluble total (entre 380 y 640), el cual fue utilizado como control positivo. En el caso de los resultados con los complejos fra/péptido-HLA/DR y el AgT-HLA/DR, se detectó mayor estimulación con todos los pacientes (entre 200 y 400 cpm y 300 – 1400 cpm, respectivamente).

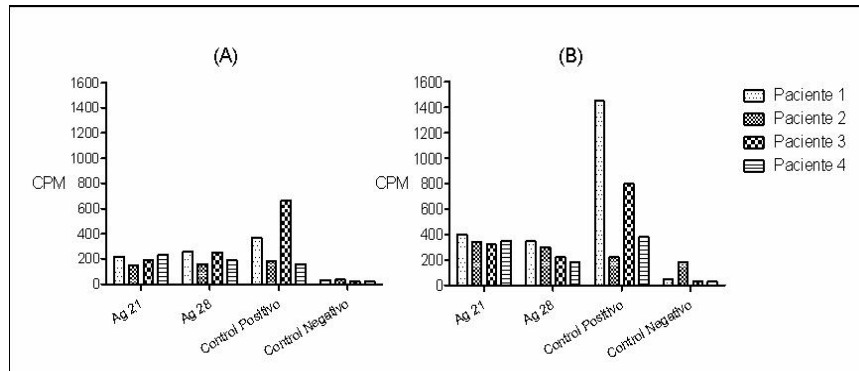


Fig. 4. Comparación gráfica del CPM determinado en los ensayos utilizando **A.** antígenos solubles y **B.** complejos pép/HLA-DR.

Determinación de citocinas. Nuestros resultados mostraron que el tiempo mínimo requerido para la activación del proceso de producción de citocinas fue de 24 horas. La producción por parte del antígeno total de las citocinas INF- γ e IL-10 fue mayor que la producción de ambas fracciones estudiadas. En el caso de INF- γ , la fracción 28 indujo mayores valores que la fracción 21, mientras que para IL-10 se observan mayores valores para la fracción 21 que para la fracción 28. Con respecto a IL-4 e IL-12, los valores de absorbancia obtenidos, fueron muy cercanos al límite de sensibilidad de la técnica empleada, por lo que no se muestran los resultados.

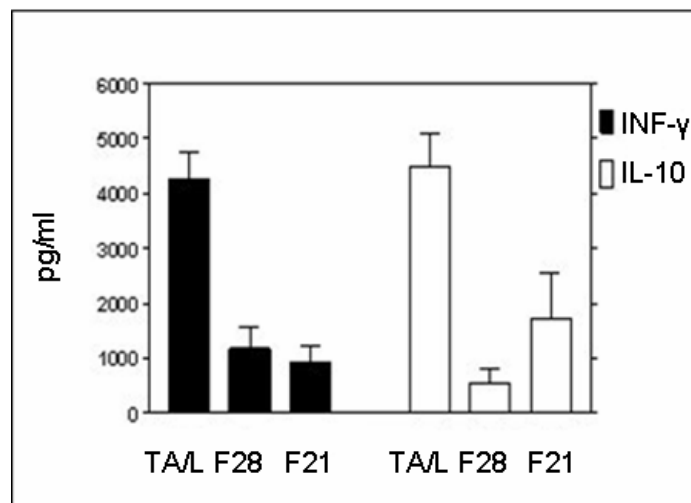


Fig. 5. Producción de IL-10 e IFN - γ detectada en sobrenadantes de CMSP (2.5×10^4 células) estimuladas con los antígenos (HLA/DR/TA/Leish, HLA/DR/F-28 y HLA/DR/F-21) y los antígenos sin HLA/DR (TA/Leish, F28 y F21). La producción de IL-10 e IFN- γ se determinó mediante la técnica de ELISA en sobrenadantes tomados después de 72 horas. Cada dato representa el valor promedio de cultivos celulares por triplicado.

DISCUSIÓN

En el estudio de enfermedades parasíticas y desarrollo de vacunas, es importante identificar péptidos que puedan estimular el receptor de células T (TCR). Numerosos estudios de respuestas de células T, frente a antígenos proteicos desarrollados en humanos y animales experimentales, han llevado al conocimiento del papel principal que juegan las proteínas del CMH en el control de la respuesta inmune (9-10). En humanos, la activación de células T cooperadoras por péptidos enlazados a proteínas HLA es de primordial importancia para la iniciación de la respuesta inmune. Por ello, el aislamiento y caracterización de péptidos asociados con moléculas del CMH es relevante para el conocimiento de la biología de la presentación antigénica y también para aspectos prácticos con respecto a su uso en sistemas experimentales y clínicos, tales como formulaciones de vacunas y ensayos diagnósticos.

Algunos autores han mostrado que la habilidad de los macrófagos para procesar y presentar antígenos de *Leishmania* es necesaria para su interacción eficiente con células T efectoras y para la secreción específica de citocinas inductoras de actividad leishmanicida (11). Nosotros desarrollamos y evaluamos un ensayo para determinar la mayor tasa de infección y analizamos la presentación antigénica a un simple nivel celular para obtener péptidos naturales de *Leishmania* capaces de estimular células T.

Mediante la infección de una línea celular de monocitos humanos con *Leishmania brasiliensis*, se detectó la presencia de un total de treinta y ocho picos por medio del fraccionamiento por RT-HPLC, estando los mismos consistentemente presentes en la preparación de péptidos obtenidos a partir de las células infectadas y ausentes en la preparación obtenida de las no infectadas. La comparación de los cromatogramas obtenidos en ambos casos mostró la presencia de fracciones de péptidos procesados y presentados por los macrófagos infectados.

Trabajos recientes de varios laboratorios sugieren que INF- γ secretado por células Th1 es la citocina más potente en la activación de macrófagos y en la inducción de resistencia del hospedador contra la infección con el parásito *Leishmania* (12). Nuestros resultados, sugieren que el INF- γ puede ser un estímulo decisivo para inducir la expresión de moléculas CMH clase II sobre la superficie del macrófago, además de activar el procesamiento y presentación de *Leishmania* intracelular (13-14). Con respecto al estudio de ocho de los principales picos obtenidos en el fraccionamiento por RT-HPLC, se determinó que dos de las fracciones HPLC (F21 y F28) ensayadas para verificar su capacidad de estimular respuestas de proliferación de células de sangre periférica de pacientes con leishmaniosis, mostraron que 60% de los pacientes estudiados fue capaz de responder a estos antígenos. Sin embargo, tal como se ha descrito en numerosos trabajos, estos resultados indican que las células

T son estimuladas con mayor eficiencia por antígenos presentados junto a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

La mayor proliferación se detectó con el antígeno total en los dos casos (soluble y formando complejos). Este hallazgo, resulta lógico si consideramos la multiplicidad antigénica presente en el antígeno total del parásito, comparado con las fracciones utilizadas que sólo contienen uno o pocos péptidos. También, con el ensayo de los complejos se demostró que la cantidad de péptido antigénico necesario para disparar respuestas de proliferación, puede ser tan baja como 0.5 µg/mL (0.05 µg/pozo), en comparación con los ensayos con el antígeno soluble (5–20 µg/mL)

Con respecto a la activación de células mononucleares detectada, se encontró concordancia con otros estudios que indican que ésta debe ser sostenida por un período aproximado de 24 horas para una óptima expansión y diferenciación en células efectoras (15-16). Las fracciones individuales obtenidas por RT-HPLC fueron escaneadas en ensayos de proliferación y por su habilidad para inducir la producción de IL-4, IL-10, IL-12 e INF-γ en células mononucleares de sangre periférica, aisladas de pacientes con leishmaniosis cutánea. Los resultados indicaron que el período de activación más corto requerido para la iniciación de este mecanismo fue de 24 horas. Los ensayos con las dos fracciones peptídicas (F28 y F21) mostraron que la secreción de IL-4 e IL-12 no fue significativa, en comparación con la secreción de IL-10 e INF- γ (en 50% y 60% de los pacientes, respectivamente). Los niveles detectados de IL-4 e IL-12 resultaron cercanos al límite de sensibilidad de la técnica empleada, probablemente debido a la mínima síntesis o bien, al consumo de las citocinas.

Estos resultados sugieren la inducción predominante de citocinas asociadas a la respuesta de tipo Th1, además de la presencia del componente regulador IL-10; sin embargo, los altos niveles de INF-γ producidos por los dos antígenos no pueden ser asociados con una respuesta protectora contra los mismos. Otros estudios, que incluyen la identificación de subpoblaciones particulares de células T y el perfil de citocinas asociado en respuesta a estos péptidos, deben ser ensayados para caracterizar mejor la respuesta asociada a ellos.

Los resultados de esta investigación muestran que no todos los péptidos que se unen a las moléculas del CMH clase II son capaces de estimular células T. Sólo dos fracciones (F21 y F28) mostraron reactividad en este estudio; el resto de las fracciones fueron incapaces de estimular las células T de los pacientes. Esto nos indica la necesidad de secuenciar las dos fracciones reactivas, con la finalidad de realizar futuros ensayos inmunológicos con péptidos sintéticos o antígenos recombinantes representando estas secuencias, incluyendo la caracterización completa de la respuesta inmune asociada al tipo Th1 o Th2 (*“in vivo”* e *“in vitro”*).

En conclusión, los ensayos de unión CMH-péptidos permiten identificar péptidos potencialmente antigénicos que pueden ser presentados a las células T por moléculas del CMH clase II; y la caracterización de estos péptidos

definidos permiten llegar al diseño de proteínas con especial interés en el desarrollo de vacunas. Hasta ahora, los esfuerzos han sido enfocados en vacunas profilácticas diseñadas para prevenir la progresión de la enfermedad en ratones y humanos infectados con *Leishmania spp*, y en propuestas que incluyen el uso de parásitos completos atenuados, extractos de antígenos de parásitos leishmánicos liberados, ya sea como genes o como proteínas. Todas estas propuestas indican que una vacuna humana efectiva para la leishmaniosis solo puede ser posible una vez que el blanco de una respuesta inmune apropiada sea identificado. En este sentido, el presente trabajo con péptidos naturales, pretende identificar epítopes naturales de células T de *Leishmania* capaces de inducir respuestas inmunes apropiadas. Sin embargo, es esencial mejorar el diseño de vacunas basadas en péptidos a través de varios análisis, tanto a nivel molecular como inmunológico.

Este procedimiento descrito, de purificación de péptidos, representa una valiosa herramienta para la selección de epítopes naturales presentados por la célula hospedadora, que en el caso de la infección con *Leishmania spp* es el macrófago, bien conocida como célula presentadora de antígeno (CPA). La caracterización inmunológica de estas secuencias encontradas pueden constituir valiosas herramientas no sólo para la generación de esquemas de inmunopprofilaxia o bien en el inmunodiagnóstico efectivo de la Leishmaniosis, actualmente considerada la segunda protozoonosis más importante a nivel mundial. Además, es importante destacar que estos resultados pueden ser útiles en el caso de otras infecciones por microorganismos intracelulares.

AGRADECIMIENTOS. *Agradecemos al Dr. J.L. Strominger, del Departamento de Biología Molecular y Celular, Universidad de Harvard, Cambridge. USA, por los anticuerpos anti HLA-DR. También queremos agradecer a la Dra. Gina D'Suze del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC. Edo. Miranda, Venezuela, por su asistencia en la separación de péptidos mediante RT-HPLC, al Lic. Carlos Santaella en la separación por cromatografía de afinidad. Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT. Proyecto S1-2000000460 y Proyecto Iniciativa Científica del Milenio 4572VE, UNDO/World Bank/WHO Programa especial para la búsqueda y entrenamiento en Enfermedades Tropicales.*

BIBLIOGRAFIA

1. Scott P. Host and parasite factors regulation the development of CD4+ subsets in experimental cutaneous leishmaniasis. *Research in Immunology* 1991; 42: 32-36.
2. Germain RN. MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T lymphocyte Activation. *Cell* 1994; 76: 287-299.
3. Demontz SA, Grey E, Apella EY, et al. Characterization of a naturally processed MHC class II-restricted T cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature* 1989; 342: 682-684.
4. Rudensky A, Janeway Jr C. Studies on naturally processed peptides associated with MHC class molecules. *Chem Immunol* 1993; 57: 134-151.
5. Rötzschke, O., Falk, K. Origen, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 45 - 51.

6. Hunt, D.F., Henderson, R.A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Selinger, N., Cox, A., Apella, E., Engelhard, V.H. Characterization of peptides bound to the class II molecules HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992; 255: 1261-1263.
7. Campos-Neto A, Soong L, Córdova JL, et al. Cloning and Expression of a *Leishmania donovani* Gene Instructed by a Peptide Isolated from Major Histocompatibility Complex Class II Molecules of Infected Macrophages. *J Exp Med* 1995; 182: 1423-1433.
8. Malik P, Strominger JL. Perfusion chromatography for very rapid purification of class I and II MHC proteins. *J Immunol Meth* 2000; 234: 83-88.
9. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Immunol* 1990; 144: 278-282.
10. Rogers KA, Titus, RG. Characterization of the early Cellular Immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naïve humans. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 568-576.
11. Murray HW, Stern JJ, Welte K, et al. Experimental visceral leishmaniasis: Production of interleukin 2 and Interferon. *J Immunol* 1987; 138: 2290-2295.
12. Scott P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991; 147: 3149-3155.
13. King DP, Jones PP. Induction of Ia and H-2 antigens on a macrophage cell line by immune IFN. *J Immunol* 1983; 131: 315-318.
14. Noelle RJ, Kuziel WA, Maliszewski CR, et al. Regulation of the expression of multiple class II genes in murine B cells by B cell stimulatory factor-1 BSF-1. *J Immunol* 1986; 137: 1718-1722.
15. Convit J, Rondón A, Ulrich M, et al. Immunotherapy versus Chemotherapy in Localized Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet* 1987; 21: 401-405.
16. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 151-155.

III Congreso de la Escuela de Bioanálisis

Los invitamos a inscribirse en este magno evento Científico.

En el mismo tendrán la oportunidad de actualizarse en diferentes temas, dictados por Profesionales altamente capacitados y con gran trayectoria académica.

Este Congreso se realizará en Caracas, desde el 23 al 25 de Junio del 2011 en las instalaciones del Hotel Tamanaco Intercontinental.

Para inscribirte al Congreso, puedes solicitar mayor información por los siguientes medios: a través del correo electrónico congbioucv.inscripciones@gmail.com.

