

---

## CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS REPRESENTANDO SECUENCIAS NATURALES DE LEISHMANIA SPP

Télles-Quintero Senobia, Latorre Lisette, Velasquez Zamira  
Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina, Laboratorio de  
Parasitología  
stellessq@gmail.com

### Resumen

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 los receptores de células T. A nivel mundial se realizan múltiples estudios con la finalidad de identificar y caracterizar componentes antigénicos de *Leishmania* que puedan ser utilizados en la detección de la enfermedad y/o en ensayos terapéuticos para prevenir la infección o post-infección. En este sentido y desde hace varios años nuestro laboratorio esta avocado a la búsqueda e identificación de péptidos naturales de *Leishmania spp.* con potencialidad de estimular subpoblaciones de células T productoras de citocinas asociadas con protección de la enfermedad. En estudios inmunológicos previos, utilizando sueros y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con *leishmaniasis* y fracciones de péptidos naturales de *Leishmania brasiliensis* (obtenidas en nuestro laboratorio), hemos logrado detectar reactividad importante en dos de las fracciones ensayadas. El objetivo del presente trabajo es la caracterización inmunológica de 4 péptidos sintéticos (representando las secuencias de los péptidos naturales presentes en las fracciones peptídicas señaladas), frente a células y sueros de pacientes con y sin tratamiento. Los resultados mostraron la capacidad de los péptidos de generar la estimulación de CMSP con una respuesta celular Th1. Tres de los péptidos ensayados mostraron la mayor reactividad en los inmunoensayos (Maba y Elisa-péptido), lo que sugiere continuar con ensayos de especificidad serológica con un mayor número de sueros de pacientes y estudios con animales experimentales utilizando los péptidos individuales y mezclas de los mismos para evaluar la posibilidad de su inclusión en ensayos diagnóstico y/o inmunoterapias.

**Palabras clave:** caracterización cronologista, péptido, leishmania Spp.

## Introducción

La infección por *Leishmania* constituye un problema de extraordinaria importancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que afecta a la población de 88 países de zonas intertropicales y templadas, de los cuales sólo en 40 es de declaración obligatoria, por lo que de los aproximadamente 2 millones de casos nuevos estimados por año, sólo 600.000 se declaran oficialmente. La prevalencia está en torno a los 12 millones de enfermos y la población en riesgo de más de 350 millones de personas (WHO, 2001). El conocimiento de la respuesta inmune en la infección por *Leishmania*, ha sido desarrollado fundamentalmente a partir de modelos experimentales, particularmente en ratones, que permiten conocer el desarrollo de dos subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, Th1 y Th2. La identificación de tales subpoblaciones se basa en el diferente perfil de producción de citoquinas que se desencadena ante la estimulación antigénica (Mosmann, *et al.*, 1986, Scott y col., 1991, McSorley y col. 1996, Bourreau, *et al.*, 2001). La interacción entre citoquinas, es uno de los aspectos determinantes de la respuesta inmunitaria y del progreso o no de la infección, se ha sugerido que para la activación de respuestas Th1, es necesaria la presencia de IL-12, mientras para Th-2 se necesita IL-4 para su desarrollo (Babaloo y col. 2001, Nashed y col., 2001). Las proteínas del parásito, juegan un papel fundamental en la respuesta inmunológica del hospedero que va a depender principalmente al tipo de moléculas del complejo mayor

de histocompatibilidad (CMH) al que se asocian (Clase I o Clase II), las cuales actúan como proteínas transportadoras y presentadoras de antígeno en la superficie del macrófago para la activación de las células T, siendo esta activación la que desempeña un papel determinante en la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania*. En vista de la importancia de esta parasitosis no sólo por su complejidad en la interacción hospedador-parásito, sino por la ausencia de esquemas terapéuticos y/o profilácticos efectivos, se han desarrollado numerosos estudios enfocados hacia la identificación, aislamiento y caracterización de antígenos con potencialidad para ser usados en estos esquemas. En este sentido, el presente trabajo, tuvo como objetivo evaluar mediante un estudio piloto la caracterización inmunológica de 4 péptidos sintéticos correspondientes a secuencias de péptidos naturales obtenidos previamente en nuestro laboratorio mediante su aislamiento a partir de complejos péptido/CMHII (Liscano y col., 2011). Para ello se utilizaron diversos inmunoensayos como Elisa- Péptido, Multi Antigen Blot Assay (MABA), ensayos de linfoproliferación y detección de citocinas mediante el estímulo de células de sangre periférica provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea, con el fin de investigar su potencialidad como agentes inmunoprofilácticos e inmunoterapéuticos o como una alternativa en el inmunodiagnóstico.

## Objetivo General

Caracterizar inmunológicamente péptidos sintéticos correspondientes a secuencias de antígenos naturales de *Leishmania spp.*

## Materiales y Métodos

**Población de estudio.** En este estudio se utilizó una muestra de 20 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 del antígeno total se utilizó la cepa de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/84/LTB300. 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 de cultivos de 5 días de crecimiento.

### Péptidos sintéticos

Los péptidos (correspondientes a secuencias naturales), fueron obtenidos mediante su síntesis química con la tecnología t-boc en el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela como cortesía del Dr. Oscar Noya. Secuencias y pesos moleculares: P1) P-M-P-T-Y-F-Q-Y-F-T-N-A-F-L-G, (2049,26 gr/Mol) P2) K-Y-E-Q-A-D-K-M-Q-R-D-A-L-E-A, (2048,18 gr/

Mol)

P3) L-E-N-Y-A-Y-S-M-K-N-T-V-S-D-T, (1988,08 gr/Mol) P4) Q-V-Q-G-S-W-K-V-T-G-M-M-G-R-I, (1930,17 gr/Mol)

### Multi Antigen Blot Assay (MABA)

En este ensayo se utilizaron 10ug/ml de cada péptido y sueros de pacientes con la enfermedad donados por el Laboratorio de Inmunología II del Servicio Autónomo de Biomedicina- MPPS. El ensayo permite detectar el reconocimiento de los péptidos sintéticos por parte de los anticuerpos específicos de leishmania presentes en el suero de personas infectadas con el parásito *Leishmania*. Mediante el mismo, se realiza el análisis simultáneo de diferentes antígenos basado en un ensayo dot-blot Elisa y en el cual se distribuyen e inmovilizan los mismos en una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las tiras conteniendo los antígenos se cortaron perpendicularmente y se exponen a los sueros (diluidos 1:250) por 1 hora a 37°C, se realizaron dos lavados para posteriormente desarrollar el revelado por dos métodos: incubados por 1 hora a 37°C con un Anti IgG Fc Humana de cabra, marcado con peroxidasa (Immuno Pure), la reacción se reveló en película: Fuji Medical 8 x 10 x Ray Film, equipo KODAK X – OMAT 200 y con un conjugado de Fosfatasa alcalina (Immuno Pure®) en un ensayo western blot. La técnica se realiza en un sistema acrílico (Minibloter® 28 S-L Immunetics Inc, Cambridge, MA, USA).

### Elisa-Péptido

El estudio consistió en la determinación de la reactividad de los péptidos al

ser incubados con un pool de sueros de pacientes con Leishmaniasis cutánea de mediante el ensayo de ELISA. Cada uno de los péptidos se evaluó por triplicado, haciéndose ensayos de los péptidos solos y con mezclas de ellos. En este caso, el estudio se realizó alterando la superficie de las placas mediante la utilización de una solución de glutaraldehído al 2 %, lo cual favorece la fijación de los péptidos a la placa. Se utilizó un conjugado de Anti IgG humana marcado con peroxidasa (Immuno Pure®). Las lecturas fueron realizadas a 492 nm en un espectrofotómetro BIO-RAD Smart-Spect™ 300.

### **Ensayos *in vitro* de proliferación de células T y determinación de citocinas.**

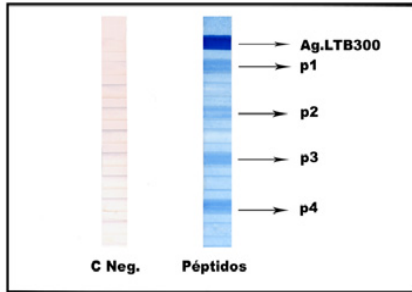
Células de sangre periférica (CMSP) fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad usando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Para los ensayos de proliferación de CMSP,  $2 \times 10^5$  células/pozo fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (GIBCO aíslely, United Kingdom) suplementado con penicilina/estreptomycin, L- glutamina y 10% de suero fetal bovino (GIBCO), más 1% de medio mínimo esencial, siguiendo con su incubación a 37°C en un ambiente de 95% aire y 5% de CO<sup>2</sup> por triplicado, en placas fondo plano con los péptidos y/o mezclas de péptidos a (5 µg/pozo) 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 estimulatorias usadas en los ensayos de linfoproliferación previamente descritas, colectados luego de 18, 24 and 72 h de incubación. La producción de citocinas IL-4, IL-12 e INF-γ se determinó mediante ELISA usando el inmunoensayo humano Quantikine (R&D Systems), siguiendo las indicaciones del fabricante.

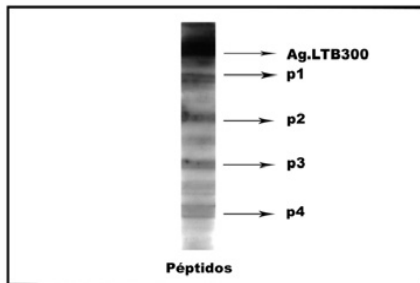
## **Resultados**

### **Multi Antigen Blot (Maba)**

En el caso de los resultados correspondientes al ensayo de Multi Antigen Blot (Maba), los mismos mostraron la reactividad de los péptidos utilizados en este estudio con los anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes, determinándose una importante reactividad con los péptidos 1 y 4 (P1, P4) que muestran una mayor amplitud y definición de las bandas en los dos ensayos realizados. (Figuras 1 y 2).



**Figura 1 :** Ensayo de Multi Antigen Blot ( MABA ). Reactividad de los antígenos con un pool de sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea. El antígeno total (LTB300) se utilizó como control positivo). A la derecha: péptidos ( p1, p2, p3, p4 ). Izquierda: control negativo. Se utilizó un conjugado de Fosfatasa alcalina (Immuno Pure ®). Figura escaneada en densitómetro ( BIO- RAD) Model GS-690 Imaging, a través del programa FotoLook32 V .09.02.

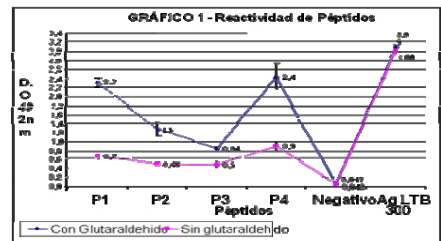


**Figura 2:** Ensayo de Multi Antigen Blot ( MABA ) . La figura muestra la reactividad de los péptidos con anticuerpos específicos presentes en el pool de sueros de pacientes con leishmaniasis, se utilizó como conjugado un Anti IgG Fc Humana

de cabra, marcado con peroxidasa ( Immuno Pure ®). Revelado en película : Fuji Medical 8 x 10 x Ray Film , equipo KODAK X – OMAT 200

## Elisa-péptido

El ensayo Elisa-péptido, se desarrolló en placas tratadas o no con glutaraldehído. Las mayores reacciones coinciden con las obtenidas en el ensayo de MABA (P1 y P4) a excepción del péptido 3, que resultó menos reactivo que el péptido 2. Se observa mayor reactividad de los péptidos en las placas tratadas con glutaraldehído. Las mezclas M3 y M4 mostraron la mayor reactividad (2,4 y 2,0, respectivamente). El antígeno total (LTB300) no mostró diferencia significativa en su reactividad al utilizar placas tratadas o no con glutaraldehído, resultado esperado dado el número de especificidades antigénicas presentes en el mismo.



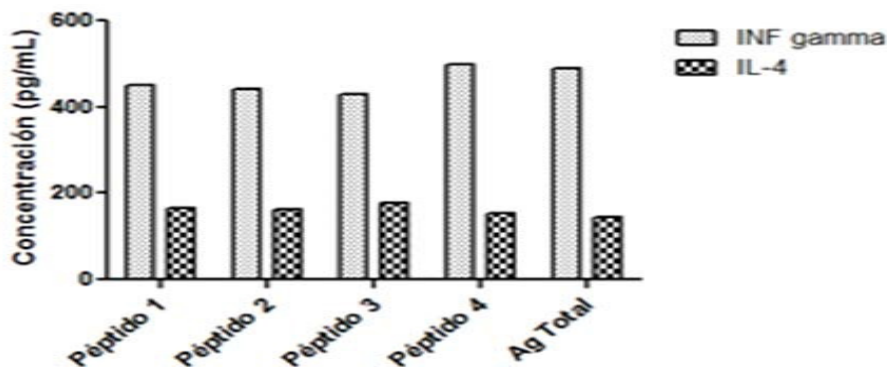
**Figura 1 y 2: Elisa-Péptido.**

Comparación de la reactividad de péptidos individuales y mezclas de péptidos frente anticuerpos específicos presentes en sueros de pacientes ócon Leishmaniasis cutánea en ensayos de Elisa. Cada uno de los puntos, representan el promedio de tres determinaciones realizadas para cada ensayo por mezcla de péptido.

### Ensayo de Proliferación celular.

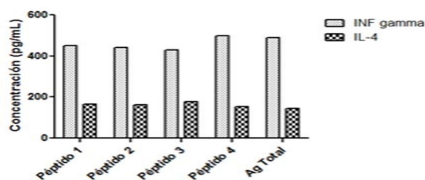
Los análisis de estimulación de CMSP con los péptidos demostraron la estimulación de todos los péptidos utilizados en el estudio, detectándose la mayor estimulación con el péptido 1

(P1)m, seguido del péptido 3 (P3) y el péptido 2 (P2), mientras el péptido 4 (P4) mostró la menor estimulación. El antígeno total LTB300, mostró la mayor estimulación. (Figura 3).



**Figura 3.** Índice de Estimulación de CMSP: en esta figura se reflejan los índices de estimulación de los cuatro péptidos utilizados (P1, P2, P3 y P4), del Antígeno total utilizado como control positivo y del mitógeno celular PHA, control del método.

**Determinación de citocinas.** Utilizando los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos post estimulación (18h, 24h y 72h) se evaluó la producción de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL12, utilizándose un inmunoensayo Quantikine, R & D Systems, siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado. No se observaron diferencias significativas de secreción inducidas por los péptidos y la secreción inducida por el antígeno total de Leishmania. (Figura 4).



**Figura 4.** Determinación de citocinas: en la figura se muestran los valores (pg./ml) obtenidos en el ensayo

### Discusión

En el estudio de enfermedades parasitarias 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 [(Malik y col., (2000), Green y col., (1990), Rogers y col., (2004)]. 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. 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 (Demontz, *et al.*, 1989, Rudensky A, Janeway Jr C. 1993, Rötzschke, O., Falk, K. 1994,). 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.* [(Campos Neto, *et al.*, (1995)]. En nuestro trabajo, pionero en los estudios de péptidos sintéticos correspondientes a secuencias naturales de *Leishmania*, los resultados mostraron en el ensayo de Maba la reactividad de los péptidos utilizados con los anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes con la enfermedad leishmanica. Se detectó la mayor reactividad con los péptidos P2, P4 y P1 tanto en el ensayo de revelado por quimioluminiscencia como en el ensayo de western blot. En ambos ensayos se detectó la mayor reactividad con el antígeno total de *Leishmania* debido a su condición multiantigenica. Los resultados obtenidos en el ensayo Elisa-péptido, en placas tratadas o no con glutaraldehído sugieren que el tratamiento con glutaraldehído al 2% favorece la fijación de los péptidos a la placa; lo cual se refleja en los mayores valores de reactividad, posiblemente motivado a que el glutaraldehído altera la carga de la placa favoreciendo la fijación de los grupos polares de los péptidos a la misma. Cabe destacar, la ausencia reacciones sinérgicas de reactividad significativa al comparar los resultados entre las mezclas de péptidos y los péptidos individuales. El estudio correspondiente a la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mostró que, de un total de 20 pacientes utilizados en el ensayo, provenientes de la consulta clínica para Leishmaniasis del Servicio Autónomo Instituto de biomedicina, el 70% de los pacientes mostraron Índices

de Estimulación importantes con los 4 péptidos utilizados, de estos, 30% respondieron con todos los péptidos. El trabajo mostró que los péptidos ensayados son capaces de generar un estímulo para la producción INF- $\gamma$ , una de las principales citocinas que se asocian con una respuesta de tipo (th1) por parte de linfocitos T CD4. Además cabe destacar, que no se observó diferencia significativa entre la estimulación de la producción de INF- $\gamma$  e IL-4, por parte de cada péptido, con respecto a la producción por parte del antígeno total, este resultado significa que estos péptidos, individualmente, fueron capaces de inducir prácticamente la misma respuesta que el antígeno total, lo que llama mucho la atención si tomamos en cuenta que los péptidos ensayados, corresponden a secuencias de aminoácidos muy pequeñas (entre 12 y 14 residuos), en comparación con el antígeno total. Finalmente, en base a nuestros resultados que mostraron el reconocimiento de los péptidos sintéticos correspondientes a secuencias naturales de antígenos de *Leishmania* por Anticuerpos específicos presentes en sueros de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Localizada, se demostró un importante índice de estimulación de la proliferación celular de un 70% de la población en estudio, observándose la mayor estimulación con el péptido 3 (P3), con valores similares al Antígeno total LTB300. Los ensayos de producción de citocinas post-estimulación de las CMSP con los péptidos demostraron la inducción de respuestas inmunes celulares del tipo Th1, detectándose mayores concentraciones de IL12 (datos

no mostrados),  $\gamma$ -INF en comparación con la secreción de IL4 (citocina del tipo Th2). Todo lo anterior, sugiere que estamos en presencia de epítopes restringidos por el CMHII capaces de generar respuestas estimuladoras de tipo Th1 como se observa por la proliferación de células T y producción de citocinas, haciéndose necesaria una muy cuidadosa caracterización inmunológica con un mayor número de sueros de pacientes con las distintas enfermedades leishmanicas para explorar la posibilidad de su inclusión ya sea en esquemas inmunoterapéuticos e inmunoprolácticos, o bien dado su potencial antigénico, en esquemas del diagnóstico de la enfermedad.

## Agradecimientos

Dr. Oscar Noya, del Instituto de Medicina Tropical, Laboratorio de Química de Proteínas por la síntesis de los péptidos. 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/WHOPrograma especial para la búsqueda y entrenamiento en Enfermedades Tropicales.

## Referencias Bibliográficas

Babaloo, Z.; Kaye, P.M.; Eslami, M.B. (2001). Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytoquines. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95:85-88.  
Bourreau, E.; Prevot, G.; Pradinaud R. et al. 2001. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in



localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4<sup>+</sup> T cells unresponsive to IL-12. *J Infect Dis* 183:953-59.

Campos-Neto, A.; Soong, L.; Cordova, J.L.; Sant'Angelo, D.; Skeiky, Y.A.; Ruddle, N.H.; Reed, S.G.; Janeway, C. Jr.; McMahon-Pratt, D. (1995). 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.* 82(5):1423-1433.

Demontz SA, Grey E, Apella EY, et al. 1989. Characterization of a naturally processed.

*Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naïve humans. *Am J Trop Med Hyg* 71: 568-576. Histocompatibility Complex Class II Molecules of Infected Macrophages. *J Exp Med.* 182: 1423-1433

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, et al. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Immunol* 144: 278-282.

*Leishmania donovani* Gene Instructed by a Peptide Isolated from Major MHC class II-restricted T cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature* 342: 682-684.

Liscano María Gabriela, Zahira Longa, Mariangela Infante, Senobia Telles. 2011. Evaluación de un método para el aislamiento de péptidos naturales de *Leishmania* spp. *Salus* Abril 15: 1, 41-53

Malik P. Strominger JL. 2000.

Perfusion chromatography for very rapid purification of class I and II MHC proteins. *J Immunol Meth* 234: 83-88.

Mosmann T.R. Cherwinsky H. Bond M.W. et al. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to 154 profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-57.

McSorley S. Proudfoot L. O'Donnell C.A. et al. 1996. Immunology of murine leishmaniasis. *Clin Dermatol* 14:451-64.

Nashed B.F. Maekawa Y. Takashima M. et al. 2000. Different cytokines are required for induction and maintenance of the Th2 type response in DBA/2 mice resistant to infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 2:1435-43.

Rogers KA, Titus, RG. 2004. Characterization of the early Cellular Immune response to .

Rudensky A, Janeway Jr C. 1993. Studies on naturally processed peptides associated with MHC class molecules. *Chem Immunol* 57: 134-151.

Scott P. 1991. Host and parasite factors regulation the development of CD4<sup>+</sup> subsets in experimental cutaneous Leishmaniasis. *Research in Immunology* 42: 32-36.

Rötzschke, O., Falk, K. 1994. Origen, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr Opin Immunol* 6: 45 - 51.

WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. 2010.

WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1