

Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*

Claudia Cuervo Biol. *,
Diana C Mayorga Est. Bact. *,
Paula Pavía Bact. *,
Manuel Carlos López Ph.D **,
Concepción Puerta Ph.D **

Resumen

Objetivo: dada la relevancia inmunológica de la región amino terminal de la proteína HSP70 de *Trypanosoma cruzi*, así como el hecho de que la inmunización de ratones con *Trypanosoma rangeli* protege a los animales contra la infección por *T. cruzi*, el presente trabajo se centró en el aislamiento y caracterización molecular del fragmento homólogo en *T. rangeli*. **Materiales y Métodos:** la región amino terminal del gen codificante para la HSP70 de *T. rangeli* fue amplificada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos TrHSP70F/R2, diseñados con base en la secuencia homóloga de *T. cruzi*. El fragmento amplificado fue purificado, clonado en el vector pGEM®-T Easy (Promega) y secuenciado en un 373 Automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). La organización genómica de los genes HSP70 se determinó mediante ensayos de "Southern blot" y PFGE. **Resultados:** los genes HSP70 de *T. rangeli* tienen un tamaño aproximado de 2.400 pb, se encuentran repetidos en tándem y se localizan en un cromosoma de 1.030 y 1.090 Kb en la cepa H14,

KP1(+) y de 1.100 Kb en la cepa Tre, KP1 (-). La secuencia de nucleótidos correspondiente a la región amino terminal de la proteína tiene una identidad del 99% entre las cepas H14 y Tre de *T. rangeli* y del 94% entre éstas y *T. cruzi*, presentando además polimorfismos para diversas enzimas de restricción. La secuencia de aminoácidos de dicha región entre ambos parásitos tiene una identidad del 95%. **Conclusiones:** el extremo amino terminal de las proteínas HSP70 de *T. cruzi* y *T. rangeli* guardan una elevada identidad de secuencia lo que abre un camino a la posible utilización de la HSP70 de *T. rangeli* en inmunoterapia. Asimismo y dado que en esta región se localizan epítopes B y T inductores de respuesta inmune en pacientes chagásicos, la HSP70 puede estar implicada en la reacción inmunológica cruzada entre estos parásitos. **Palabras clave:** *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, proteína de choque térmico, HSP70. ☉

Infectio 2005; 8(4): 268-278

Recibido para evaluación: 12/08/04 - Aceptado para publicación: 22/12/04

* Laboratorio de Parasitología Molecular. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43 - 82, Laboratorio 113, Bogotá, D.C., Colombia.

** Laboratorio de Parasitología Molecular. Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Calle Ventanilla 11, 18001, Granada, España.

Correspondencia: Concepción Puerta, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia. E-mail: cpuerta@javeriana.edu.co Tel.: (+571) 3208320 ext. 4024, Fax: (571) 3208320, extensión 4021.

Introducción

Trypanosoma rangeli es un protozoo parásito de algunos insectos y animales en América Latina (1,2). A pesar de que este parásito se considera no patógeno para el hombre, su importancia radica en que su presencia complica el diagnóstico y la epidemiología de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas (3). Además de compartir huéspedes y reservorios, estos parásitos son simpátricos, presentan estadios de desarrollos morfológicamente parecidos y presentan reacción inmunológica cruzada (1-5). Adicionalmente, diferentes esquemas de inmunización de ratones con *T. rangeli* han evidenciado que este parásito protege a los animales frente al reto con cepas virulentas de *T. cruzi* (6-9).

Por otra parte, las proteínas de choque térmico (HSP) han sido encontradas en las células de todos los organismos tanto procariotes como eucariotes, siendo altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos, regulación y funciones bioquímicas (10). Entre ellas, las proteínas HSP70 son chaperonas moleculares que en condiciones normales participan en el plegamiento, ensamblaje y desensamblaje de proteínas y complejos macromoleculares, translocación de polipéptidos a organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y cloroplasto, presentación antigénica y desensamblaje de vesículas recubiertas de clatrina (11). Bajo condiciones de estrés térmico o químico, estas proteínas se inducen transcripcionalmente y facilitan la renaturación de las proteínas denaturadas, confiriendo así tolerancia al estrés, que de otra manera sería letal para la célula (12). En parásitos, los genes HSP se inducen muy pronto durante la infección y juegan un papel muy importante en la adaptación del parásito al nuevo ambiente (13). Es así como se han encontrado proteínas HSP en el curso de varias infecciones parasitarias, tales como aquellas producidas por *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Schistosoma* y nemátodos (14).

La proteína HSP70 de *T. cruzi* ha sido ampliamente caracterizada tanto molecular como bioquímicamente (15). Esta proteína es altamente inmunogénica e induce una fuerte respuesta humoral en pacientes chagásicos (16,17). Además, tiene *per se* un singular efecto estimulador sobre células de bazo y de ganglio de ratones *naive*, el cual da lugar a una rápida e intensa estimulación de linfocitos T seguida de un proceso de

internalización de los receptores CD3+ y TCRab y un proceso de apoptosis no dependiente de Fas/L, mecanismos que podrían estar relacionados con capacidad de generar memoria inmunológica (18). Recientemente, también se ha observado que esta proteína así como también un fragmento interno de la misma (192-433), es capaz de madurar células dendríticas inmunológicamente funcionales (19). Adicionalmente, la fusión de la HSP70 a la proteína 11 de membrana de kinetoplastos (KMP-11) induce tanto inmunidad humoral como celular en ratones; así como también es capaz de proteger dichos animales frente al reto con los parásitos luego de haber sido éstos inmunizados con dicha proteína quimérica (20,21).

Dentro del anterior contexto, en este trabajo se presenta la caracterización molecular parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*, con el fin de aportar herramientas que ayuden en un futuro a dilucidar la participación de la proteína HSP70 no sólo en la reacción inmunológica cruzada con *T. cruzi*, sino también en el posible uso de esta proteína en esquemas de inmunoterapia o prevención de la enfermedad de Chagas.

Métodos

Obtención de los parásitos: Se trabajó con formas epimastigotas de las cepas No.3 (MDID/CO/87No.3, Pavía et al. 2003), Munanta (IRHO/CO/85/Munanta, Pavía et al. 2003), Shubacbarina (IRHO/CO/95Shubacbarina, Pavía et al. 2003) e Y (MHOM/BR/00/Y, Pavía et al. 2003) de *T. cruzi* y de las cepas H14 (MHOM/Hond/H14, Pavía et al. 2003), Choachí (IRHO/CO/86/Choachí, Pavía et al. 2003), 5048 (MHOM/CO/99/5048, Pavía et al., 2003), C23 (MAOT/CO/82/C-23, Pavía et al. 2003) y Tre de *T. rangeli* (Pavía et al. 2003), gentilmente donadas y caracterizadas mediante isoenzimas por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS) (23) y mediante PCR con los cebadores S35/S36/KP1L por el Laboratorio de Investigación en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima (24). Los epimastigotes fueron cultivados en medio REI modificado suplementado con 2 % de suero bovino fetal (SBF) y 100 mg/ml de gentamicina, a 24 °C.

Diseño de iniciadores: los cebadores se diseñaron con base en la secuencia del extremo amino

terminal de la proteína HSP70 de *T. cruzi* (No. de acceso al GenBank X07083) usando el programa Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu>). Es así como se sintetizaron los cebadores HSP70F (5'-ATGACGTACGAGGGAGCC-3') y HSP70R2 (5'-AGGTCCTTGCCTTGTCTT-3'). Adicionalmente, se diseñó un tercer cebador anti-sentido con el fin de amplificar el gen completo en *T. cruzi* y utilizarlo como sonda en los estudios de "Southern blot", HSP70R (5'-TCAGTCAACTTCTCCAC-3').

Reacción de amplificación: el ADN de los parásitos fue extraído según lo indicado por Escalante et al. 1997 (25). La reacción se realizó en un volumen final de 25 ml, conteniendo: Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, triton x-100 0,1%, dNTPs 200 mM, cebadores (HSP70F: y HSP70R2) 20 pmoles, MgCl₂ 1,5 mM, Taq DNA polimerasa 1,25 U y ADN 125 ng. Esta reacción fue sometida al siguiente programa en un termociclador PTC-100 MJ-Research:

Denaturación 95 °C por 5 min, 30 ciclos con denaturación a 95 °C por 1 min, anillaje a 58°C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min. Como control negativo se utilizó la misma reacción pero con la adición de agua en reemplazo del ADN. Una alícuota de 10 ml de la reacción de PCR fue visualizada en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, transferida a filtros de "nylon" e hibridada con la región codificante del gen HSP70 de *T. cruzi*, TcRcHSP70 (26).

Clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados: los fragmentos de 760 pb amplificados tanto en la cepa Tre como en la cepa H14 del parásito fueron clonados en el plásmido pGEM ®T Easy (Promega). Ambas hebras de la cadena de ADN de los insertos fueron secuenciadas en un Secuenciador Automático 373 (Applied Biosystems) utilizando los cebadores M13F y M13R según el método de Sanger (27). Las secuencias fueron analizadas utilizando los programas BLAST (28) y MULTIALIN (29) entre otros.

Ensayos de "Southern Blot": 10 mg de ADN de los parásitos fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción y los fragmentos resultantes fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% y transferidos a membranas de "nylon" (Magnagraph MSI, Fisher) siguiendo el protocolo de transferencia salina (30).

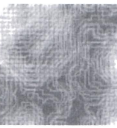
Posteriormente, las membranas fueron prehibridadas a 42 °C durante dos horas en una solución de formamida 50%, Na₂HPO₄ (pH 7,2) 0,12 M, NaCl 0,25 M, SDS 7%, EDTA 1 mM, y 200 mg/ml de esperma de salmón previamente denaturada. La hibridación se realizó durante toda la noche a 42 °C usando como sonda los fragmentos de PCR TcAtHSP70 o TrAtHSP70, correspondiente a los primeros 765 nucleótidos de la región codificante de la HSP70 de *T. cruzi* y *T. rangeli* respectivamente, marcados con biotina según las indicaciones de la casa fabricante (Gibco-BRL). Posteriormente, los filtros fueron enjuagados brevemente en SSC 2X (Solución salina citrato 1X: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0) y lavados durante 15 min con: SSC 1X, SDS 0,5% a 42 °C; SSC 0,5X, SDS 0,5% a 50 °C y SSC 0,1X, SDS 0,5% a 65 °C. A continuación, las señales fueron detectadas con el conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina (GIBCO-BRL) y reveladas por color o quimioluminiscencia según las indicaciones de la casa fabricante (GIBCO-BRL).

Ensayos de electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE): los parásitos fueron embebidos en bloques de agarosa a una concentración de 8 X10⁷ parásitos (31). 1/5 de dichos bloques fueron sometidos a electroforesis en un Gene Navigator (Pharmacia Biotech) usando geles de agarosa al 1% en TBE 0,5 X. Las condiciones de corrido electroforético fueron: Pulsos de 250, 500, 750 y 1000 segundos sobre un periodo de 96 horas (h) a 84 voltios y 12 °C. Después de visualizar los cromosomas teñidos con bromuro de etidio, éstos fueron transferidos a membranas de "nylon" (Biorad) siguiendo el método de transferencia alcalina (26) e hibridados con la sonda TrAtHSP70 según lo descrito anteriormente.

A continuación, las señales fueron detectadas con el conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina (GIBCO-BRL) y reveladas por color o quimioluminiscencia según las indicaciones de la casa fabricante (GIBCO-BRL).

Resultados

Amplificación y caracterización del extremo amino terminal de los genes codificantes para la proteína HSP70 de *Trypanosoma rangeli*: con el objetivo de amplificar los genes HSP70 de *T. rangeli* se diseñaron oligonucleótidos con base en



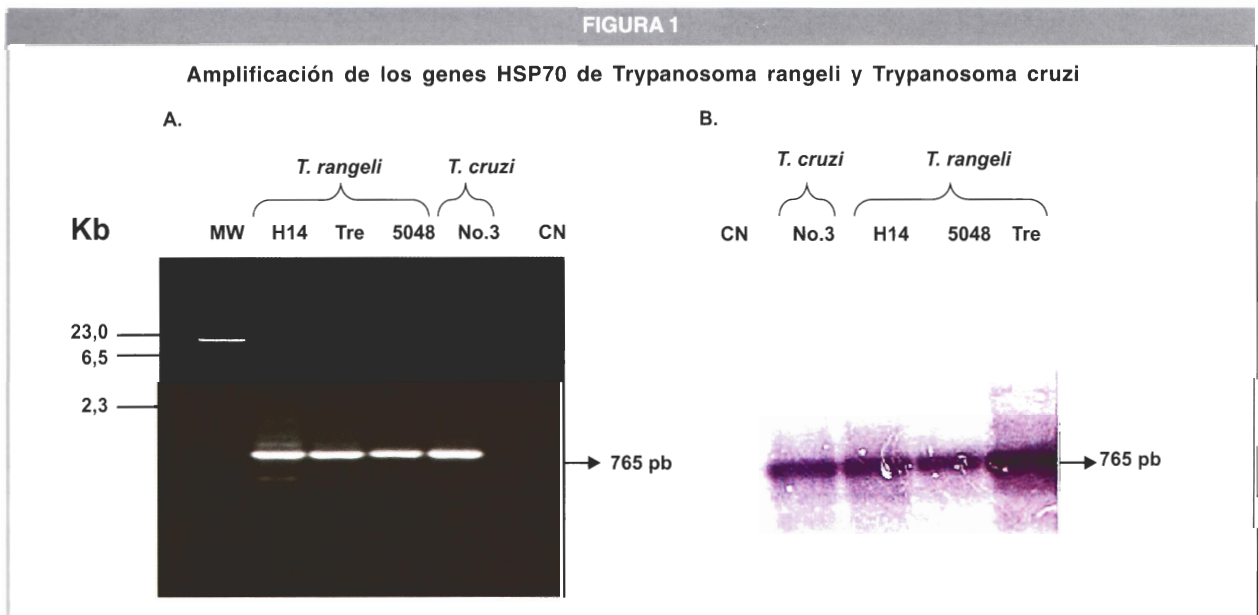
la secuencia homóloga de *T. cruzi*. Tal como se muestra en la figura 1A se obtuvo el fragmento de amplificación esperado de 760 pb correspondiente al extremo amino terminal de la proteína, tanto en las cepas Tre y H14 de *T. rangeli*, como en la cepa No.3 de *T. cruzi*. Estos fragmentos fueron a su vez reconocidos por la sonda TcRcHSP70, correspondiente a la región codificante de la HSP70 de *T. cruzi* (figura 1B). Es importante anotar cómo se logró la amplificación de la región codificante completa de la proteína en *T. cruzi* más no en *T. rangeli* (Resultados no mostrados).

Los fragmentos de PCR obtenidos tanto en la cepa H14 como en la cepa Tre de *T. rangeli* fueron clonados y secuenciados (figura 2, Números de acceso al GenBank AY495381 y AY495382, respectivamente), encontrándose una identidad del 99% entre ellos, del 94% con la misma región de la HSP70 de *T. cruzi*, 84% con *T. brucei*, 89-87% con *Leishmanias* y 82% con *Homo sapiens*.

Estos resultados confirman en primera instancia que las secuencias clonadas y secuenciadas codifican para la HSP70 de *T. rangeli*. Además, se observa el alto grado de conservación de este fragmento no sólo en tripanosomátidos, sino también en relación a la secuencia de humanos. Adicionalmente, análisis del uso de codones de este gen muestra como no hay diferencias significativas

entre los codones usados por ambas cepas de *T. rangeli*, mientras que en relación a *T. cruzi* se puede observar el uso exclusivo de algunos codones, como por ejemplo de GGT para codificar alanina, CTA para leucina, AAT para asparagina, CCA para prolina, CGA para arginina, TCA para serina, AAA para lisina y ACA y ACT para treonina.

Organización genómica de los genes HSP70 de *Trypanosoma rangeli*: con el fin de determinar la organización genómica de estos genes se realizaron varios ensayos de "Southern blot". Es así como en las figuras 3A, 3B y 3C se observa como estos genes en ambas cepas, Tre y H14, tienen un tamaño de 2.400 pb y su patrón de restricción concuerda con la presencia de varias copias organizadas en tándem. Con la enzima Aval se liberan dos fragmentos de 2.300 pb y 1.900 pb, al igual que con la enzima PstI, la cual libera dos fragmentos de 2.300 pb y 1.500 pb, siendo en ambos casos la banda de 2.300 pb menos intensa, por lo cual se sugiere que dicho fragmento corresponde al extremo 5' de la agrupación de los genes. Estos resultados sugieren además que estas enzimas cortan dos veces dentro del gen, una en la región 5' del gen generando las bandas de 1.900 pb (Aval) y 1.500 pb (PstI) y la otra en la región 3' del mismo produciendo fragmentos de

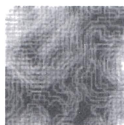


A. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10µl del producto de PCR obtenido de los ADNs de las cepas de *T. rangeli* H14, Tre y 5048 y de la cepa No.3 de *T. cruzi*. En el control negativo (CN), se usó agua destilada como templado. ADN del fago lambda digerido con HindIII (Invitrogen) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda. B. Ensayo de "Southern blot" de los fragmentos amplificados en A, híbridos con la sonda TcRcHSP70.

Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del extremo amino terminal de los genes codificantes para la proteína HSP70 de *T. rangeli*

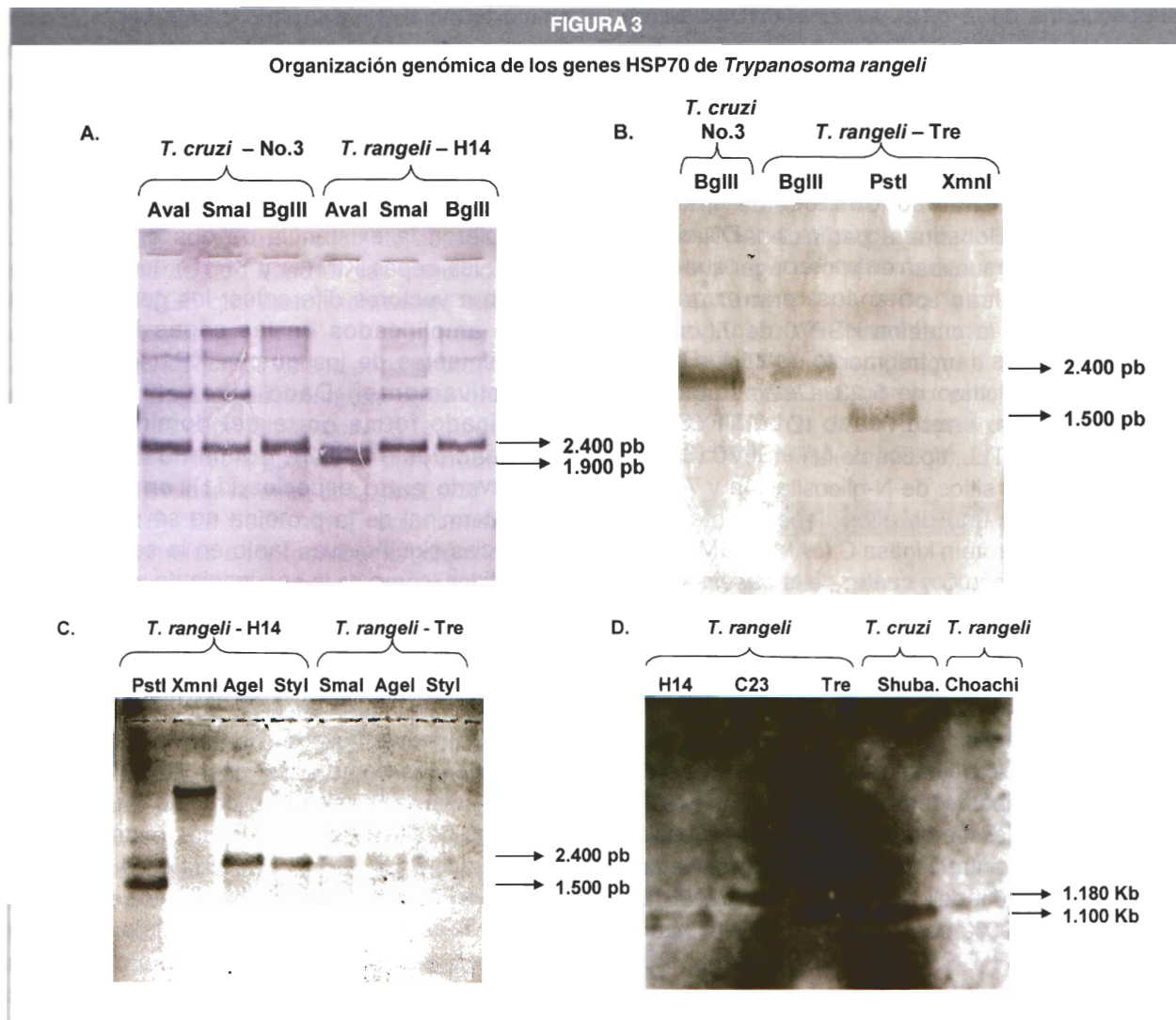
1	atgacgtacgaggggagccattggcatcgatctcggcacgacgtactcgtgcggttggtgtg	60
1	M T Y E G A I G I D L G T T Y S C V G V	20
61	tggcagaacgagcgcggtggagatcattgccaacgatcaggccaaccggacgacgccgtcg	120
21	W Q N E R V E I I A N D Q G N R T T P S	40
	* * *	
121	tatgtggcggtttaccgacacggagcgtctgatcggtgacgcggcgaagaaccaggtggcg	180
41	Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A	60
	▲ ▲ ▲ ▲	
181	atgaaccgacgaacaccgctcttcgacgcgaagcgcctcattgggcggaagttcagcgac	240
61	M N P T N T V F D A K R L I G <u>R K F S</u> D	80
	▲ ▲ ▲ ▲	
241	tccgttgtagcagtcggacatgaagcactggcccttcaaggtcatcgccaagggcgacgac	300
81	S V V Q S D M K H W P F K V I A K G D D	100
301	aagccggtgatccaggtgcagttccgcgggcagaccaagacggttcaaccggaggaggtg	360
101	K P V I Q V Q F R G E T K T F N P E E V	120
361	agctcgatgggtgctgctgaagatgaaggaggttgccggagtcgtacctggggaagcaggtg	420
121	S S M V L L K M K E V A E S Y L G K Q V	140
421	aagaaggccggtggtgacggtgcccgctacttcaacgactcgcagcggcaggcgacgaag	480
141	K K A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K	160
481	gacgcggcagcagatcgcgggggatggaggtgctgcgcatcatcaacgagccgacggccgcc	540
161	D A G T I A G M E V L R I I N E P T A A	180
541	gccattgctgtaggggctggacaaggtggaggaaggcagggagcgcacgctgctgatcttt	600
181	A I A Y G L D K V E E G R E R H V L I F	200
601	gaccttggcggcggcagcgttgacgtcacctgctgacgatcgacggcggcatctttgag	660
201	D L G G G T F D V T L L T I D G G I F E	220
661	gtgaaggcgacgaacggcgacacgcacctggcggcggcaggacttcgacaaccgcctcgtg	720
221	V K A T N G D T H L G G E D F D N R L V	240
	* ▲ ▲ ▲ ▲	
721	gcgcactccacggacgagttcaagcg	746
241	A H S T D E F K	248
	▲ ▲ ▲ ▲	

Un asterisco (*) denota los nts y aa que cambian en la cepa Tre: t@c (posición 132); c@t (posición 159); c@t (posición 728) y el aminoácido en negrita S@F (posición 243). Los motivos característicos de la familia HSP70 se encuentran subrayados, en un cuadro se indican los motivos de N-glicosilación, con línea gruesa se indica un motivo de fosforilación dependiente de CAMP, los 5 indican motivos de fosforilación dependiente de PKC y en negrita se indican los motivos de fosforilación dependiente de CK2 (este motivo en la posición 243 - 246 no existe en la cepa Tre).



aproximadamente 600 pb (Aval) y de 900 pb (PstI), los cuales no son reconocidos por la sonda. La secuencia de *T. cruzi* por su parte, presenta un único sitio de corte para estas enzimas. Igualmente, se puede observar la presencia de polimorfismos entre *T. rangeli* y *T. cruzi* para la enzima XmnI, la cual tiene un sitio de corte en la secuencia de *T. cruzi* (nucleótido 2363), mientras que *T. rangeli* carece de diana de restricción para la misma, observándose una señal de hibridación de alto peso molecular. Adicionalmente,

vale la pena anotar como con las enzimas Aval, SmaI, BglII (figura 3A) y PstI, AgeI y StyI (figura 3C) se observan bandas de hibridación débiles, las cuales pueden corresponder a la existencia de polimorfismo dentro de las copias para las dianas de restricción dentro de una misma cepa del parásito y/o a los extremos de la agrupación. Es más, llamativamente el perfil de estas bandas de hibridación débiles es diferente entre *T. rangeli* y *T. cruzi* para las enzimas Aval y SmaI (figura 3A).



A. Ensayo de "Southern blot" del ADN de las cepas H14 de *T. rangeli* y No.3 de *T. cruzi* digerido con las endonucleasas *Ava* I, *Sma* I y *Bgl* II e hibridados con la sonda *TcAtHSP70*. A la derecha se indica el tamaño de los fragmentos generados. **B.** Ensayo de "Southern blot" del ADN de la cepa *Tre* de *T. rangeli* digerido con las endonucleasas *Bgl* II, *Pst* I y *Xmn* I y ADN de la cepa No.3 de *T. cruzi* digerido con la endonucleasa *Bgl* II hibridados con la sonda *TcAtHSP70*. A la derecha se indica el tamaño de los fragmentos generados. **C.** Ensayo de "Southern blot" del ADN de las cepas de *T. rangeli* H14 digerido con las endonucleasas *Pst* I, *Xmn* I, *Age* I y *Sty* I; y de la cepa *Tre* digerido con las endonucleasas *Sma* I, *Age* I y *Sty* I, hibridados con la sonda *TrAtHSP70*. A la derecha se indica el tamaño de los fragmentos generados. **D.** Ensayo de "Southern blot" de los cromosomas de las cepas H14, C23, *Tre* y Choachi de *T. rangeli* y *Shubacarina* de *T. cruzi*, separados mediante PFGE e hibridados con la sonda *TrAtHSP70*. A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos generados.

Por otra parte, para determinar la localización cromosómica de estos genes en las cepas Tre y H14, se realizaron ensayos de PFGE, cuyos resultados indican que en la cepa H14 éstos genes se localizan en dos cromosomas de 1.030 y 1.090 Kb, mientras que en la cepa Tre, se ubican en un único cromosoma de 1.100 Kb (figura 3D). Llama la atención como en las cepas C23, KP1(-) y Choachí, KP1(+) de *T. rangeli* éstos genes se localizan en un cromosoma de 1180 y 1120 Kb, respectivamente. Por su parte, en la cepa Shubacharina de *T. cruzi*, la señal de hibridación se detectó a nivel de 1090 Kb.

Caracterización del extremo amino terminal de la proteína HSP70 de *Trypanosoma rangeli*:

Las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos de los insertos amplificados y clonados a partir del ADN de las cepas Tre y H14 muestran en primer lugar que estos insertos codifican para los primeros 248 aminoácidos de la proteína HSP70 de *T. rangeli*, correspondientes a un fragmento de 27,4 kDa con un punto isoeléctrico de 5,23. Dicho fragmento presenta los motivos IDLGTTYs y IFDLGGGTFDVTLL, típicos de las HSP70 (32) así como también 2 sitios de N-glicosilación y 7 sitios de fosforilación, uno de ellos dependiente de la cAMP y cGMP proteína quinasa C (cAMP,cGMP), dos de la proteína quinasa C y cuatro de la caseína quinasa II. Por otra parte, la comparación de las secuencias entre las cepas de *T. rangeli* indican que de los 3 cambios de nucleótidos entre ellas, solo uno se traduce en un cambio de aminoácido, concretamente una serina (S) a fenilalanina (F) (figura 2), para una identidad de aminoácidos del 99,6% entre ambas cepas del parásito.

Así mismo, la comparación de las secuencias de aminoácidos entre *T. rangeli* y otros organismos resulta en un 95,6% de identidad con *T. cruzi*, 95,1% con *T. brucei*, 90% con *Leishmanias* y 81% con *Homo sapiens*.

Discusión

Los genes codificantes para la proteína de choque térmico-70 han sido aislados y caracterizados en un sin número de organismos, entre ellos algunos miembros del orden *Kinetoplastida* tales como *Trypanosoma cruzi* (33), *Trypanosoma brucei* (34), *Leishmania infantum* (35), *Leishmania major* (36) y *Crithidia fasciculata* (37).

Dada la importancia de la HSP70 de *T. cruzi* no sólo en la inducción de respuesta inmune específica contra el parásito (16,17,39) sino también en sus propiedades inmunomodulatorias frente a los péptidos unidos a esta proteína (40-41); en este trabajo se amplificaron y caracterizaron los genes codificantes para la HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. Para ello, se utilizaron iniciadores basados en la secuencia de *T. cruzi*, encontrándose una fuerte señal de amplificación solamente cuando se usaban los cebadores correspondientes a la región amino terminal de la proteína. Este hecho indica que aún entre especies tan cercanas como *T. cruzi* y *T. rangeli* el extremo carboxilo terminal de la proteína varía, lo cual está de acuerdo con la función de unión a péptidos de esta región de la proteína (11).

Teniendo en cuenta que Vallejo et al. 2003 (42) describieron la existencia de dos grupos de *T. rangeli*: las cepas KP1(+) y KP1(-), las cuales se asocian a vectores diferentes; los genes HSP70 fueron amplificados en las cepas H14 y Tre, representantes de los grupos KP1(+) y KP1(-), respectivamente. Dado que el fragmento amplificado forma parte del dominio ATPasa (aminoácidos 1-383), dominio altamente conservado entre especies (11), en la fracción amino terminal de la proteína no se encontraron diferencias significativas tanto en la secuencia de nucleótidos, como en la secuencia de aminoácidos entre las cepas H14 y Tre.

Por el contrario, en comparación con la secuencia de *T. cruzi* se encontró un 6% de divergencia en la secuencia de nucleótidos, la cual origina polimorfismos de restricción para varias endonucleasas como es el caso de Avall, Bcgl, Bmpl y Pvull las cuales han perdido su diana en los genes de *T. rangeli*. O el caso de las enzimas AatII, Acul, Bsal y Zral, las cuales solamente digieren en *T. rangeli*. Así mismo, cuando se analiza el perfil de restricción del gen completo, obtenido según los estudios de "Southern blot", no se encuentran diferencias entre las cepas de *T. rangeli*, pero sí entre éstas y *T. cruzi*.

Por otra parte, en cuanto a la organización genómica de los genes HSP70 en *T. rangeli* se encontró que de acuerdo con lo reportado para otros tripanosomátidos, estos genes se encuentran repetidos y organizados en tándem (32-37). Probablemente con presencia de polimorfismos entre copias de una misma cepa. Hecho comúnmente

observado en los genes de tripanosomátidos repetidos en tándem como la histona H2A (43) y la HSP70 de *T. cruzi*, entre otros (33).

Adicionalmente, llama la atención como el tamaño de los cromosomas en donde se localizan estos genes en *T. rangeli* varía ligeramente entre cepas independiente de si éstas son KP1(+) o KP1(-). Este hecho, reportado previamente por Toaldo et al. (44), puede deberse a la plasticidad que tienen los cromosomas de estos parásitos para adaptarse a su huésped (45). Adicionalmente, en la cepa H14 se detectó la presencia del gen en dos cromosomas diferentes, lo cual puede corresponder a polimorfismos en el tamaño de los cromosomas homólogos, situación descrita para otros genes en tripanosomátidos (46). Sin embargo, los estudios de Toaldo et al. 2001 (44) muestran como los genes HSP70 en la cepa H14 se localizan en un solo cromosoma de 1.125 Kb. No obstante, esta diferencia puede explicarse con base en las condiciones de corrido del PFGE que fueron totalmente diferentes en los dos estudios.

En cuanto a *T. cruzi*, vale la pena anotar que los genes HSP70 se localizan en una única banda de 1.090 Kb en la cepa Shubacbarina (zimodema I), mientras que en la cepa Silvio-X10/4 (zimodema I) estos genes se localizan en dos bandas de 1.100 y 1.000 Kb (15). Es decir, en *T. cruzi* también se presentan cambios en la localización cromosómica de los genes HSP70 entre cepas, inclusive del mismo zimodema.

Finalmente, a pesar de su elevado grado de conservación las proteínas de choque térmico se comportan como antígenos inmunodominantes en enfermedades infecciosas (17). En la infección frente a *T. cruzi* por ejemplo, se han encontrado epítopes tanto humorales (17) como celulares (M.C.López, comunicación personal), estando algunas de ellas localizadas en la región amino terminal de la proteína. Es así como los péptidos 9 (aminoácidos 93-107), 12 (aminoácidos 135-155) y 14 (aminoácidos 160-180) son reconocidos por sueros chagásicos con un alto nivel de reactividad (17), mientras que el péptido A72 (aminoácidos 210-218) induce la respuesta de linfocitos T citotóxicos en sistemas murinos experimentales (M.C.López, comunicación personal). Llamativamente, estos péptidos se conservan en las secuencias de *T. rangeli*, con la excepción de los péptidos 12 y 9, los cuales presentan uno y dos cambios respectivamente, en sus aminoácidos en relación a la secuencia de *T. cruzi* (figura 4).

Dado que la proteína HSP70 de *T. cruzi* y *T. rangeli* comparten el extremo amino terminal, región en la cual se localizan epítopes B y T inductoras de respuesta inmune en pacientes chagásicos. la HSP70 puede estar implicada en la reacción inmunológica cruzada entre estos parásitos. Lo cual unido a sus propiedades inmunomodulatorias, hacen de ésta proteína o un fragmento de la misma, un candidato para el uso en inmunoterapia contra la enfermedad de Chagas. ☺

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana y la Fundación para la Promoción de la investigación y la Tecnología, del Banco de la República, según proyectos No. 1364 y 1.710, respectivamente. Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Parasitología del INS por su valiosa colaboración en la donación de las cepas de los parásitos y al Laboratorio de Investigación en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima (Ibagué), especialmente al Dr. Gustavo Vallejo, por su valiosa colaboración en la tipificación de las cepas de *Trypanosoma rangeli* como KP1(+) o KP1(-).

TRYPANOSOMA RANGELI

Objective: taking into account the immunologic relevance of the HSP70 N-terminal from *Trypanosoma cruzi* as well as the fact that the immunization of mice with *Trypanosoma rangeli* protects the animals against *T. cruzi* infection, in this work we carried out the isolation and molecular characterization of the homologous fragment from *T. rangeli*. **Materials and Methods:** the first 765 nts of the gene coding for the HSP70 of *T. rangeli* was amplified by PCR using the TrHSP70F/R2 primers based on the homologous sequence of *T. cruzi*. The amplified fragment was purified, and cloned into the vector pGEM®-T Easy (Promega). It was sequenced in a 373 Automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). The genomic organization of the HSP70 genes was determined by Southern blot, and PFGE assays. **Results:** the HSP70 genes of *T. rangeli* have an approximate size of 2.400 bp in length. They are arrayed in a tandem located in two chromosomes of 1.030 and 1.090 Kb in the H14 KP1(+) strain, and one chromosome of 1.100 Kb in the Tre KP1 (-) strain.

Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de los extremos amino terminales de la proteína HSP70

H14	MIEYGAIGIDLGITYSQVGMQNERVELLNDQGNRTIPSYVAFIDTERLIGDAAKQVAVNPNIVFDKRLIGRKFSDSVWQSDMKH	89
TRES.....R.....P.....	
T.cS.....	
T.bS.....	
L.t	.F.....D.....S.....H.....N...A...	
L.b	.F.....S.....H.....N...A...	
L.a	.FD.....D.....S.....H.....N.L.....	
L.m	.FD.....ID.....S.....H.....N.....	
L.i	.F.....D.....S.....H.....N.....	
L.d	.FD.....D.....S.....H.....N.....	
Hom	.AKAA.....F.HGK.....L.Q.....G.P.....	
H14	WPFKVIAKIDDKFVIQVQFRGEIKTFNPEEVSVMLLKMKVEAESYLGKQVKGAWIVPVPYFNDSPQATKDACTIAGEVLRLLINEPT	178
TRES.....I.....L.....	
T.cS.....I.....L.....	
T.bA.....L.....V.....	
L.tT.A.....L.....T.....A.Y..	
L.bT.A.....L.....T.....T..H.	
L.aT.A.....S.L.....T.....S.Y..	
L.mT.A.....L.V.....T.....S.Y..	
L.iT.A.....L.....R.....T.....S.Y..	
L.dT.A.....L.....R.....T.....M.A.Y..	
Hom	...Q...T...I.A...YP...N.I...V...LN...R.ND...KV...SYK...	
H14	AAAIAYGLDKVEEGREERHVLIPDLGGITFDVLLLTIDGGIFEVKATNCDTHLGGEDFNRLVAHSTIDEFYK	249
TREF.....	
T.cD.K.N.....F.....	
T.bIAD..K.N.....F.E.....	
L.t	.E...T...IGDD.K.N.....TFF.E.....	
L.b	.E...T...IGDD.K.N.....Y.....TFF.E.....	
L.a	.E...T...KIGDD.K.N.....TFF.E.....	
L.m	.E...T...IGDD.K.N.....R.....TFF.E.....	
L.i	.E...T...IGDD.K.N.....TFF.E.....	
L.d	.E...T...IGDD.K.N.....S.....TFF.E.....	
Hom	...A.Y...ITGK...N...SI...D...A...N.FVE....	

Cepa H14 (ARR87494), cepa Tre (ARR87495) de *T. rangeli*, *T. cruzi* (P054456), *T. brucei* (P11145), *L. tarentolae* (AY423868), *L. braziliensis* (AF291716), *L. amazonensis* (Q07437), *I. major* (P14834), *L. infantum* (X85798), *L. donovani* (P17804) y *Homo-sapiens* (P08107). Los puntos indican identidad y los números a la derecha la posición en la secuencia. Los péptidos 9 (93 – 107), 12 (135 – 155), 14 (160 – 180) y A72 (210 – 218) se encuentran subrayados.

The nucleotide sequence corresponding to the A-terminal of the protein has an identity of 99% between the H14 and Tre strains, and of 94% among these and *T. cruzi*. This region also shows polymorphisms for several restriction enzymes between *T.cruzi* and *T.rangeli*. The deduced amino acid sequence of this region has an identity of 95% between these two parasites. **Conclusions:** the HSP70 N-terminal regions from *T.cruzi* and *T.rangeli* have a high identity which makes to *T.rangeli* HSP70 protein a good candidate for using in immunotherapy. Since in this region are located B and T epitopes which elicit immune response in chagasic patients, the HSP70 can be implicated in the immunological cross reaction between these parasites. **Key words:** *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi*, Heat shock protein, HSP70.

Referencias

1. **D' Alessandro A, Saravia N.** *Trypanosoma rangeli*. En: Parasitic Protozoa, JP Kreir, JR Baker, eds. Academic Press, INC. New York, USA. 1992; 2: 1-54.
2. **D' Alessandro A, Saravia N.** *Trypanosoma rangeli*. En: Protozoal Diseases, HM. Gilles ed. Arnold Publisher, London, U.K. 1999; 398-412.
3. **Gühl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA.** Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Arch Med Res 2002; 33: 362-370.
4. **Saldaña A, Sousa OE, Orn A.** Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panama: Humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. Scand J Immunol 1995; 42: 644-650.

5. **Saldaña A, Sousa OE.** *Trypanosoma rangeli*: Epimastigote immunogenicity and cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 1996; 82: 363-366.
6. **Introini MV, Basso B, Moretti E.** Experimental Chagas disease: I. Study of different immunization conditions in the infection course. *Bol Chil Parasitol* 1998; 53: 45-51.
7. **Zuñiga CA, Palau MT, Penin P, Gamallo C, de Diego JA.** Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health* 1997; 2: 482-487.
8. **Basso B, Moretti A, Vottero-Cima E.** Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli*-immunized mice. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 413-419.
9. **Palau MT, Mejía AJ, Vergara U, Zuñiga CA.** Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 543-548.
10. **Lindquist S, Craig EA.** The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677.
11. **Feige U, Polla BS.** HSP70 a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 1994; 50: 979-986.
12. **Hartl FU.** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-579.
13. **Maresca B, Kobayashi GS.** Hsp70 in parasites: As an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia* 1994; 50: 1067-1074.
14. **Shapira M, MacEwen JG, Jaffe CL.** Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J* 1988; 7: 2895-2901.
15. **Olson CL, Nadeau KC, Sullivan MA, Winquist AG, Donelson JE, Walsh CT, Engman DM.** Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1994; 269: 3868-3874.
16. **Krautz GM, Peterson JD, Godsel LM, Krettli AU, Engman DM.** Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD Heat-Shock proteins. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 137-143.
17. **Requena JM, Soto M, Guzman F, Maekelt A, Noya O, Patarroyo ME, Alonso C.** Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* HSP70 in chagasic and healthy individuals. *Mol Immunol* 1993; 30: 1115-1121.
18. **Marañón C, Planelles L, Alonso C, Lopez MC.** HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int Immunol* 2000; 12: 1685-1693.
19. **Planelles L, Thomas M, Pulgar M, Marañón C, Grabbe S, López MC.** *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 241-247.
20. **Marañón C, Thomas MC, Planelles L, Lopez MC.** The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T. cruzi* KMP11 antigen: Identification of A2-restricted epitopes. *Mol Immunol* 2001; 38: 279-287.
21. **Planelles L, Thomas MC, Alonso C, Lopez MC.** DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immunol* 2001; 69: 6558-6563.
22. **Pavía P, Cuervo C, Montilla M, Nicholls RS, Puerta C.** Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. *Infectio* 2003; 7: 129-136.
23. **Rodríguez P, Montilla M, Nicholls S, Zarante I, Puerta C.** Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 739-40.
24. **Vallejo GA, Gühl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, et al.** kDNA Markers define two major *Trypanosoma rangeli* linajes in Latin-America. *Acta Trop* 2002; 81: 77-82.
25. **Escalante M, Montilla M, Nicholls RS, Del Portillo P, Puerta CJ.** Extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante tratamiento con bromuro de hexadecil-trimetil-amonio. *Biomédica* 1997; 17: 120-5.
26. **Sambroock JF, Russell DW, Irwin N.** Molecular cloning. A Laboratory Manual. 3^{er} ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 2000.
27. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
28. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DL.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acid Res* 1997; 25: 3389-3402.
29. **Corpet F.** Multiple sequence alignment which hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 10881-10890.
30. **Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
31. **Clark CG, Lai EY, Fulton C, Cross GA.** Electrophoretic karyotype and linkage groups of the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. *J Protozool* 1990; 37: 400-408.
32. **Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A.** The PROSITE database. Its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 235-238.
33. **Requena JM, López MC, Jiménez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C.** A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1393-1406.
34. **Lee MG, Van der Ploeg LH.** Transcription of the heat shock 70 locus in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 41: 221-231.

35. **Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena M.** Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *J Biol Chem* 1997; 272: 4493-4499.
36. **Klein KG, Olson CL, Donelson JE, Engman DM.** Molecular comparison of the mitochondrial and cytoplasmic hsp70 of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42:473-476.
37. **Effron PN, Torri AF, Engman DM, Donelson JE, Englund PT.** A mitochondrial heat shock protein from *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 59:191-200.
38. **Engman DM, Dragon EA, Donelson JE.** Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1990;144:3987-3991.
39. **Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, Udono H, Srivastava K.** Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1315-1322.
40. **Suzue K, Zhou X, Eisen HN, Young RA.** Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc Natl Aca Sci USA* 1997; 94: 13146-13151.
41. **Rico AI, del Real G, Soto M, Quijada L, Martínez C, Alonso C, Requena JM.** 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. *Infect Immun* 1998; 66: 347-352.
42. **Vallejo GA, Gühl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard CE.** Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 39-45.
43. **Thomas MC, Olivares M, Escalante M, Marañón C, Montilla M, Nicholls S, et al.** Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2000; 75: 203-10.
44. **Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC.** Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding b-tubulin, cystein proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 113-21.
45. **Cruz AK, Titus R, Beverley SM.** Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1599-1603.
46. **Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, et al.** Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology* 2002; 124: 277-286.