



KMP-11: proteína 11 de Membrana de Kinetoplástidos

Hugo Diez Ortega², Manuel Carlos López¹, Maricarmen Thomas¹,
Concepción Puerta Bula²

¹ Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC.
Calle Ventanilla No. 11, 18001, Granada, España.

² Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No.43-82, Edificio 50, Laboratorio 113, Bogotá,
Colombia. E-mail: cpuerta@javeriana.edu.co

RESUMEN

La proteína KMP-11 de la membrana de kinetoplástidos es una glicoproteína de 11 kDa presente en todos los estadios de vida de los kinetoplástidos, con una mayor abundancia en las formas parasitarias que interactúan con el insecto vector. Las peculiaridades presentadas por esta proteína, tales como su elevado grado de conservación entre los kinetoplástidos, su asociación tanto a membrana como a citoesqueleto y a flagelo de los parásitos y su reactividad inmunológica; hacen de esta proteína un blanco atractivo de estudio tanto para el desarrollo de estrategias de quimioterapia como de inmunoterapia contra las enfermedades causantes por dichos parásitos. En este contexto, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de los genes codificantes para la proteína KMP-11 de *Trypanosoma rangeli*.

Palabras clave: KMP-11, Kinetoplástidos, *Leishmania*, *Trypanosoma*.

ABSTRACT

The kinetoplastid membrane protein KMP-11 is a 11kDa glycoprotein, is present on the surface of all stages of parasites life cycle, but is expressed at higher levels in vector insect stages. The characteristics presented by this protein, such as its remarkably high degree of sequence homology among kinetoplastids, its association to the membrane, as well as to the cytoskeleton and the flagellum, and its immunological reactivity make this protein a potential target for developing chemotherapy or immunotherapy strategies against the diseases caused by these parasites. In this context, here we present the results of the KMP-11 genes study from *Trypanosoma rangeli*.

Key words: KMP-11, Kinetoplastids, *Leishmania*, *Trypanosoma*.

INTRODUCCION

Los protozoos del orden *Kinetoplastida* son organismos unicelulares flagelados que deben su nombre a la presencia de una red compacta de maxicírculos y minicírculos de ADN, conocida como el kinetoplasto, el cual constituye el ADN mitocondrial del

parásito (Thomas et al., 1993). Entre los miembros del orden *Kinetoplastida*, se encuentran dos géneros de importancia médica humana y veterinaria: los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, causantes de Leishmaniasis (*Leishmania sp.*), enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*), enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y

tripanosomiasis bovina (*Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*). (Ramírez et al., 1998; Tanowiitz et al., 1992; Dickind y Gibson, 1989). El impacto generado por estas patologías infecciosas representa un serio desafío para la salud y economía mundial que exige un pronto y satisfactorio control y erradicación de las mismas, surgiendo la formulación de vacunas como posible alternativa. Una de las estrategias para el diseño de vacunas se centra en el estudio de moléculas que sean abundantes en la superficie de los parásitos y generen respuesta inmune protectora contra la infección. En *Leishmanias* están descritas y parcialmente caracterizadas moléculas mayoritarias de membrana como el lipofosfoglicano (LPG), la metaloproteínasa gp63, y el antígeno de superficie de los promastigotes (PSA), en tanto que en tripanosomas se han detectado la glicoproteína gp60, las trans/sialidasas, la cisteínil proteínasa, el antígeno flagelar Rod, y el antígeno de superficie de los tripomastigotes (TSA). Una nueva molécula común a las dos especies y que hasta ahora empieza a ser caracterizada, es la proteína de 11 kDa de la membrana de superficie del kinetoplastido o KMP-11 (Berberich et al., 1997a).

La KMP-11 es una proteína de 11 kDa presente y altamente conservada en la mayoría de los kinetoplastidos incluyendo *Leishmanias*, *Trypanosomas*, *Crithidias*, *Leptomonas* y *Phytomonas* (Stebeck et al., 1995). Esta molécula fue aislada y caracterizada por primera vez en *Leishmania donovani* en donde se co-aisló asociada al LPG de la membrana celular del parásito razón por la cual se le denominó inicialmente LPGa o proteína asociada al lipofosfoglicano. Trabajos posteriores demostraron claramente que la proteína de 11 kDa presente en las preparaciones de LPG era la responsable de los efectos de linfoproliferación, inmunoprotección y antigenicidad atribuidos al LPG. Por lo anterior, se le denominó KMP-11 Proteína

11 KDa de membrana de kinetoplastidos (Jardim et al., 1995a,b).

Estudios posteriores verificaron la presencia de KMP-11 en *Trypanosoma brucei* (Bridge et al., 1998; Stebeck et al., 1995; 1996), *Leishmania infantum* (Berberich et al., 1997a, b), *Leishmania panamensis* (Ramírez et al., 1998) y más recientemente en *T. cruzi* (Thomas et al., 2000). Dichos estudios han demostrado que la proteína en la mayoría de las kinetoplastidos tiene características comunes tales como peso molecular de 11 kDa, elevado número de copias (1×10^6 - 2×10^6 moléculas por célula), localización en la superficie de la membrana del parásito, flagelo y bolsillo flagelar, carácter anfipático, estructura secundaria caracterizada por la presencia de dos α -hélices unidas por un segmento enrollado al azar, asociación a la bicapa lipídica de la membrana del parásito, expresión en todos los estadios del ciclo de vida del parásito, con mayor abundancia en los estadios desarrollados en el insecto y relevancia a nivel inmunológico, ya que es un potente inductor de inmunidad humoral y celular. Por lo tanto, dado que esta proteína no se encuentra en mamíferos, constituye un excelente blanco para células citotóxicas (CD8+) y células NK específicas de antígeno.

LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA PROTEÍNA KMP-11

Los estudios realizados coinciden en que la proteína KMP-11 se encuentra codificada por genes repetidos presentando 3 copias en las diferentes especies de leishmanias (Berberich et al., 1997a, b, Jardim et al., 1995, Ramírez et al., 1998) y 4 copias en tripanosomas (Bridge et al., 1998, Thomas et al., 2000) a excepción de *Trypanosoma brucei rhodesiense cepa Vital 1.1* en el cual el gen es de copia única (Stebeck et al., 1996).

Los genes KMP-11 poseen un marco de lectura abierto de 276 a 279 pb el cual se encuentra flanqueado por regiones intergénicas de longitud variable para el caso de leishmanias con un rango de 1,5 a 3,5 kb (Berberich et al., 1997b, Jardim et al., 1995b, Ramírez et al., 1998) y de longitud constante, aproximadamente 300 pb para tripanosomas (Bridge et al., 1998, Thomas et al., 2000). La localización cromosómica de estos genes solo ha sido estudiada en *T. cruzi* en donde el locus de 4 copias se localiza en una banda de 1,9 Kb (Thomas et al., 2000).

El análisis de la secuencia de los genes KMP-11 demuestra la existencia de polimorfismo entre las diferentes copias de una misma especie de parásito. Dicho polimorfismo es más acentuado en las regiones 5' y 3' no traducidas, que en las regiones codificantes. Es así como para el caso de *T. brucei*, se detectaron tan solo dos cambios silentes en las cuatro copias del gen (Bridge et al., 1998), en *L. infantum* se detectaron dos cambios de nucleótidos en dos de las tres copias existentes los cuales a su vez se traducen en la sustitución de glicina por ácido aspártico y de lisina por arginina (Berberich et al., 1997b) y finalmente, en *T. cruzi*, en la primera copia del gen se detectó la sustitución de la lisina 92 por un codon de parada (Thomas et al., 2000).

EXPRESIÓN DE LOS GENES KMP-11

La transcripción de los genes KMP-11 da lugar a un ARN mensajero de tamaño variable con 0,5 kb en *T. cruzi*, 0,8 kb en *T. brucei* y 1,3 kb en *L. infantum* (Berberich et al., 1998, Bridge et al., 1998, Thomas et al., 2000). A pesar de que la proteína es mas abundante en las formas parasitarias desarrolladas en el insecto tanto en leishmanias como en tripanosomas, en *L. infantum* los niveles de ARN mensajero para la KMP-11 son mas abundantes en el estadio de promastigote que de amastigote. Este he-

cho, unido a la transcripción policistronica característica de tripanosomátidos (Thomas et al., 1993), sugiere que el control de la expresión de los genes KMP-11, al menos en esta especie de leishmania, se lleva a cabo a nivel postranscripcional.

Por su parte, en *T. cruzi* los niveles de los transcritos de la KMP-11 se mantienen constantes durante los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito. Estudios realizados por Thomas et al., (2000), demostraron inhibición en la síntesis *de novo* de la KMP-11 en parásitos tratados con vinblastina, droga que actúa despolimerizando los microtúbulos. Dado que esta inhibición no está acompañada por una caída en el nivel citoplasmático de los mensajeros KMP-11 maduros, se sugirió la existencia de una regulación de la síntesis de KMP-11 a nivel traduccional, en donde posiblemente la KMP-11 ejerce por sí misma un mecanismo de regulación autógena.

Adicionalmente, Berberich et al., (1998) y Thomas et al., (2000) han demostrado la existencia de un mecanismo de regulación extra que opera a nivel postranscripcional, encargado de reducir los niveles de ARN mensajero cuando el parásito pasa de la fase logarítmica a la fase estacionaria de crecimiento, en el estadio de promastigote y epimastigote, de leishmania y tripanosoma, respectivamente.

LA PROTEÍNA KMP-11 DE LOS KINETOPLÁSTIDOS

Los primeros estudios sobre la KMP-11 fueron realizados Jardim et al., (1995a), quienes aislaron y caracterizaron la proteína en promastigotes de *L. donovani* a partir de la cepa LD3, encontrando que la proteína de 92 aminoácidos, posee un punto isoeléctrico de 4,8, se asocia a la superficie de la membrana del promastigote, se expresa en $1-2 \times 10^6$ copias por parásito y se encuentra glicosilada mediante enlaces O-

glicosídicos. En concreto, se pudo establecer la presencia de galactosamina, galactosa, glucosa y residuos de manosa (Jardim et al., 1995a). Otra modificación postraducional encontrada en la KMP-11 de *L.donovani* fue la presencia de un residuo N⁶-monometil-arginina en la posición 45, el cual parece estar implicado en la supervivencia del parásito dentro de la vacuola fagolisosómica por cuanto se ha visto que la monometil-arginina es un inhibidor competitivo de la oxido nítrico sintasa. Adicionalmente, se estableció que la proteína presenta un motivo conservado de hélice-vuelta-hélice en su estructura secundaria con un fuerte carácter anfipático y que además se encuentra asociada a la capa bilipídica de la membrana del parásito (Jardim et al., 1995 a, b).

En tripanosomas africanos el análisis de lisados de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei brucei*, *T.b.rhodesiense*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma simiae*, mostraron mediante "Inmunoblot" con los anticuerpos monoclonales L98 y L157 dirigidos contra la KMP-11 de *L. donovani*, la presencia de la banda de 11 kDa (Stebeck et al., 1995). La proteína en concreto sólo ha sido caracterizada en *T.b.rhodesiense* en donde se ha encontrado que la proteína de 92 aminoácidos tiene un peso aproximado de 11,1 kDa, punto isoelectrico de 6,0 y estructura secundaria conformada por dos a hélices anfipáticas unidas por un segmento enrollado al azar (Stebeck et al., 1996).

Llamativamente, en la posición 45 de la proteína en lugar de una arginina se encuentra una lisina, situación que sucede igualmente con la KMP-11 de *L.infantum* y *T.cruzi* (Ramírez et al., 1998, Thomas et al., 2000). Sin embargo, la presencia de un residuo de arginina modificado en otra posición de la proteína, no puede ser descartado (Stebeck et al., 1996).

Por su parte, en *L.infantum* es importante destacar que la KMP-11 presenta una elevada resistencia a condiciones denaturantes. Por ejemplo, se ha determinado que la proteína es estable a un rango de pH de 2 a 7, su estructura conformacional se conserva hasta 50 °C y a medida que se aumenta la temperatura va perdiendo progresivamente la estructura de a hélice hasta que a 85°C, se encuentra por completo enrollada, recuperando, sin embargo su conformación nativa al bajar nuevamente la temperatura, comportamiento que resulta muy similar al de las apolipoproteínas (Fuertes et al., 1999).

De otra parte, es importante destacar no solamente el elevado grado de homología que existe entre las proteínas KMP-11 de ambos géneros de tripanosomátidos, sino la homología que existe entre éstas y las apolipoproteínas, de una parte y la proteína asociada a citoesqueleto CIP1 de *Arabidopsis thaliana*, de otra (Thomas et al., 2000).

FUNCIONES DE LA PROTEÍNA KMP-11

Hasta el momento, la función biológica precisa de esta proteína se desconoce, pero su conformación estructural, homología con las apolipoproteínas y posible asociación en la membrana de los parásitos con otros componentes anfipáticos como el LPG en *Leishmania* y las proteínas acídicas repetitivas en *T.brucei* sugieren que ella puede interactuar con la bicapa lipídica, regulando la presión e incrementando la consistencia de la membrana al permitir la estabilidad de moléculas como el LPG. Así mismo, el carácter anfipático explica como la proteína al ser cargada puede estar insertada dentro de la membrana lipídica (Jardim et al., 1995b).

No obstante, la presencia mayoritaria de la KMP-11 en los estadios desarrollados en el insecto, tanto en las formas infectivas de

vertebrados como no infectivas, hacen pensar que esta proteína puede tener otras funciones relacionadas con la interacción del parásito con el huésped vector y/o con el huésped vertebrado durante la infección.

Es así como, estudios de inmunofluorescencia sugieren que la KMP-11 se localiza principalmente a lo largo del flagelo y en la base flagelar de los parásitos. Por ejemplo, en parásitos como *L.infantum*, *T.congolense* y *T.brucei*, se demostró inmunoreactividad principalmente a lo largo del flagelo y en el bolsillo flagelar, mientras que en *L.donovani* aunque se presentó localización flagelar, exhibió un patrón de fluorescencia mucho más disperso en toda la célula (Berberich et al., 1997a, Stebeck et al., 1995). Por su parte, mediante estudios de "Western blot" e inmunomicroscopía electrónica se ha demostrado que la KMP-11 de *T.cruzi* se encuentra asociada al citoesqueleto del parásito, probablemente con los microtúbulos subpelículaes localizados debajo de la membrana plasmática, principalmente en el bolsillo flagelar (Thomas et al., 2000). De manera que, los anteriores hallazgos sugieren que la proteína KMP-11 puede estar implicada tanto en la movilidad del parásito como en su unión a la célula huésped.

Recientemente, se encontró que el segmento enrollado al azar localizado entre las dos hélices de la proteína KMP-11 de *L.infantum*, presenta homología del 67 % con los motivos de unión a calcio presente en proteínas fijadoras de calcio, como la EF-hand de 40 kDa del hongo *Physarum polycephalum*. Mas aún, se encontró que la KMP-11 no sólo es capaz de unir calcio, sino que el Ca^{+2} modifica la estructura secundaria y terciaria de la proteína de manera dependiente del pH y la temperatura, y adicionalmente, altera las propiedades de solubilidad de la misma (Fuertes et al., 2001).

Puesto que los iones de calcio desempeñan un papel importante en muchas funciones

celulares, asociadas tanto con las apolipoproteínas como con movilidad y penetración del parásito en la célula huésped; el hallazgo de que la KMP-11 es una proteína fijadora de calcio (CaBP), arroja, sin lugar a dudas, luces en el papel biológico desempeñado por esta proteína.

RELEVANCIA INMUNOLÓGICA DE LA PROTEÍNA KMP-11

Diferentes estudios han evidenciado que la KMP-11 tiene tres papeles inmunológicos claramente definidos:

- Inmunoestimulador de células B.
- Inductor de linfoproliferación y respuesta citotóxica.
- Inmunoprotector en modelos animales.

INMUNOESTIMULACIÓN DE CÉLULAS B

Los primeros estudios de reactividad serológica se realizaron con la proteína KMP-11 de *L.infantum*, agente etiológico de la leishmaniasis visceral canina y humana en el viejo continente. Dichos estudios, evidenciaron una reactividad serológica del 96% en sueros de caninos infectados con el parásito y del 70% en sueros de pacientes con leishmaniasis (Berberich et al., 1997a). Adicionalmente, estudios recientes de Carvalho et al. (2003) muestran como la KMP-11 de *L.infantum* es reconocida por el suero de pacientes con leishmaniasis visceral, cutánea y pacientes asintomáticos infectados por *Leishmania chagasi*.

Así mismo, los estudios de Ramírez et al., (1998) apoyan la antigenicidad de la KMP-11, puesto que la proteína recombinante de *L.panamensis*, agente causal de leishmaniasis cutánea, mucocutánea y leishmaniasis cutánea diseminada en Colombia; es reconocida por el 80, 77 y 100% de sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Adicionalmente, esta proteína presenta una seropositividad del 86% en sueros de pacientes asintomáticos.

cos infectados con el parásito. De igual manera, los estudios de Jensen et al., (1998) confirman el carácter inmunoestimulador de células B de la KMP-11. Concretamente, estos autores trabajaron con la proteína de *L.donovani*, agente etiológico de leishmaniasis visceral en el viejo continente. Los estudios muestran que los linfocitos B de pacientes con leishmaniasis visceral reconocen la KMP-11 y que dicha reactividad disminuye levemente cuando los pacientes reciben tratamiento. Por su parte, estudios realizados por Trujillo et al., en 1999, evidencian que las subclases de inmunoglobulinas implicadas en la respuesta frente a la KMP-11 de *Leishmania* son en orden de reactividad IgG1, IgG3, IgG2 e IgG4, respuesta muy similar a la vista frente a extractos crudos del parásito. Además, estos autores demuestran la existencia de reactividad cruzada entre la KMP-11 de *T. cruzi* y de *Leishmania*. De igual forma, en *T.cruzi* se ha verificado que la KMP-11 es un antígeno inmunodominante altamente reconocido por el suero de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y leishmaniasis visceral (Thomas et al., 2001).

La respuesta inmune humoral frente a la KMP-11 ha sido valorada no solo contra la proteína nativa y recombinante, sino también frente a péptidos sintéticos y fracciones proteicas recombinantes de la misma. Por su parte, Jensen et al., en 1998, usando tres péptidos sintéticos sobrelapados que cubren la totalidad de la molécula, pudo establecer que aún cuando estos péptidos eran reconocidos por los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral (30-58%), dicha reactividad no alcanzaba los niveles de reconocimiento de la proteína nativa.

De manera que, estos resultados sugieren que los determinantes antigénicos de la KMP-11 de *L.donovani* son de carácter conformacional, hecho confirmado más adelante por los estudios de Trujillo et al.,

(1999) y Thomas et al., (2001). Adicionalmente, el uso de versiones recombinantes truncadas en los extremos amino y carboxi de la proteína KMP-11 de *T.cruzi* ha demostrado que el suero de pacientes chagásicos reconoce predominantemente determinantes antigénicos lineales localizadas en la región carboxi terminal de la proteína. Resultados que fueron confirmados mediante ensayos de competición utilizando el péptido 12642 (aminoácidos 76-92). Llamativamente, mientras dicho péptido fue reconocido por la totalidad de los sueros chagásicos, los pacientes con leishmaniasis visceral no presentaron reacción frente al mismo; lo cual sugiere que el péptido 12642 puede ser un buen candidato para realizar diagnóstico diferencial entre estas dos entidades parasitarias (Thomas et al., 2001).

Inmunoestimulación de linfocitos T

La KMP-11 ha tenido gran interés, dada su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T. Es así como Tolson et al., en 1994 demostraron que la KMP11 de *L.donovani*, *T.b.rhodesiense*, *T.b.brucei*, *T.simiae* y *T.congolense* es un potente estimulador de los linfocitos CD4⁺, CD8⁻ de ratones inmunizados con la KMP-11 de *L.donovani*, o con promastigotes de la misma especie, en una forma no restringida al sistema mayor de histocompatibilidad H-2. Mas adelante, Jensen et al., en 1998 muestran como las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 10 pacientes de un total de 17 pacientes con historia previa de leishmaniasis visceral, responden frente a uno o más péptidos de un total de tres péptidos sintéticos de 38 mer que cubren la totalidad de la KMP-11 de *L.donovani*.

Estudios realizados por Marañón et al., en 2001, evidencian como la inmunización de ratones transgénicos A2/K^b con una proteína de fusión, integrada por la proteína de

choque térmico HSP70 y la KMP-11 de *T.cruzi*, induce una respuesta citotóxica contra células humanas que expresan la KMP-11 del parásito. Adicionalmente, estos autores identifican una epítipo citotóxica A2 restringida, localizada en los aminoácidos 4 a 12 de la proteína, denominada K1. Es más, Planelles et al., en 2002, encontraron que la proteína de fusión HSP70/KMP-11, es capaz de madurar células dendríticas de ratón, con la consecuente producción de interleukina (IL) 12 y factor de necrosis tumoral α (TNF α) Y, aunque este efecto es debido principalmente a la HSP70, la presencia de la KMP-11 aumenta los niveles de producción de las citquinas.

Inmunoprotección en modelos animales

Las investigaciones en KMP11 recientemente se han orientado hacia su papel inmunoprotector frente a infecciones por *Leishmania* y *T.cruzi*. Es así como, ensayos de Mukhopadhyay et al., en 1999 evidencian que la inmunización de hámsters con la cepa UR6 de *L.donovani*, la cual carece de LPG pero expresa gran cantidad de ARN mensajero para la KMP-11, confiere protección frente al reto con cepas virulentas del parásito. Adicionalmente, Ramírez et al., (2001) mostraron que la inmunización de ratones BALB/c con una cepa atenuada de *Toxoplasma gondii* que expresa la proteína KMP-11 de *Leishmania*, induce una respuesta inmune específica e inmunoprotectora en dichos animales. Igualmente, se ha demostrado que la KMP-11 fusionada a la HSP70 de *T.cruzi* induce una respuesta inmune tanto citotóxica como humoral en ratones, que permite la protección de dichos animales, tras el reto con el parásito (Planelles et al., 2001).

Finalmente, los estudios de Berberich et al., 2003, demuestran que la inmunización de ratones con células dendríticas murinas pulsadas con una mezcla de antígenos recombinantes de *Leishmania*, entre ellos la

proteína KMP-11, son capaces de controlar la infección por *Leishmania major*.

En conclusión, los hallazgos anteriormente presentados, así como también el hecho de que la expresión de tanto el LPG como de la proteína KMP-11 en cultivos axénicos de promastigotes de *L.donovani* disminuyen con los subcultivos, conforme disminuye la virulencia del parásito (Mukhopadhyay et al., 1998); sugieren el uso potencial de la proteína KMP-11 en esquemas de inmunoprofilaxis e inmunoterapia contra la infección por *T.cruzi* y *Leishmanias*.

AVANCES EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LA PROTEÍNA KMP-11 DE *TRYPANOSOMA RANGELI*

Actualmente el laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de Microbiología de la Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, trabaja en el aislamiento y caracterización molecular de los genes codificantes para la proteína KMP-11 de *Trypanosoma rangeli*; parásito que aún cuando carece de patogenicidad para el hombre, reviste una gran importancia médica, por cuanto comparte vectores, reservorios y huéspedes con su contraparte patogénica *T.cruzi*, además de la presencia de reacción inmunológica cruzada entre ambos parásitos (D'Alessandro y Saravia, 1999) (Figura 1).

La presencia de los genes codificantes para la proteína KMP-11 en *T.rangeli* fue determinada mediante ensayos de "Southern blot", utilizando como sonda los genes KMP-11 de *T.cruzi*. Es así como, en la figura 2 se observa la presencia de los genes KMP-11 en *T.rangeli*, los cuales presentan un tamaño aproximado de 600 pb.

Adicionalmente, el perfil de restricción con la endonucleasa XhoI (Figura 2, línea XhoI) sugiere tanto la presencia de varias copias del gen, como la existencia de polimorfis-

mo entre las mismas. La amplificación de los genes, usando cebadores que amplifican la región codificante de la KMP-11 de *T.cruzi*, indicó a su vez, tanto la existencia de mas de una copia, como el arreglo o disposición de las mismas en tándem. Es así como, en la figura 3A se observan dos bandas de amplificación, de 280 y 830 pb, correspondientes a la amplificación de una región codificante y de un fragmento conteniendo dos regiones codificantes separada por la región intergénica, respectivamente (Figura 3B). Así mismo, el número de copias fue determinado mediante ensayos de "Dot blot", en los cuales se compararon las intensidades de hibridación del ADN de *T.rangeli* y *T.cruzi*, frente a la sonda de la KMP-11. Los resultados obtenidos, sugieren la presencia de 4 copias del gen codificante para la proteína KMP-11 en *T.rangeli* (Figura 4).

Por otra parte, la expresión de los genes KMP-11 de *T.rangeli*, se determinó mediante ensayos de "Northern blot", los cuales indican que estos genes se transcriben en un ARN mensajero de aproximadamente 530 bases (Figura 5).

Con el objetivo de secuenciar los genes KMP-11 de *T.rangeli*, se clonaron los fragmentos de amplificación de 280 y 830 pb en el plásmido pGEM ®T Easy. Los resultados de la secuenciación de ambas cadenas del ADN tanto con cebadores universales como con cebadores internos, para el caso del fragmento de 280 pb, revelaron que la secuencia de la región codificante de *T.rangeli* (depositada en GenBank con el número de acceso: AY147904), presenta un 88% de identidad a nivel de nucleótidos y un 98% a nivel de aminoácidos con la KMP-11 de *T.cruzi*, tripanosoma perteneciente al grupo Stercoraria. En tanto que la identidad de dicho fragmento con la KMP-11 de *T. brucei*, tripanosoma perteneciente al grupo Salivaria, es del 70% para nucleótidos y 92% para aminoácidos (Figuras 6A y 6B).

Los anteriores resultados son importantes a la luz del debate de la posición taxonómica de *T.rangeli*, el cual dada su capacidad de transmitirse tanto por saliva como por heces, no ha sido posible clasificarlo dentro del grupo Salivaria o Stercoraria (D'Alessandro y Saravia, 1999).

Por otra parte, la secuenciación del fragmento de 830 pb (depositada en GenBank con el número de acceso: AY325812) confirmó de una parte, la existencia de varias copias del gen dispuestas en tándem, así como también la presencia de polimorfismo entre las mismas, tanto a nivel de nucleótidos, como de aminoácidos. Llamativamente, se observan cuatro cambios conservados entre las secuencias de aminoácidos de las dos copias secuenciadas (Figuras 7 y 8).

En conclusión, los genes codificantes para la proteína KMP-11 de *T.rangeli* tienen un tamaño de 550 pb, se encuentran repetidos en cuatro copias dispuestas en tándem y presentan polimorfismos tanto en su secuencia de nucleótidos como de aminoácidos, siendo hasta ahora la especie con mayor polimorfismo en la región codificante de las diferentes copias del gen. Además, la KMP-11 de *T.rangeli* muestra una mayor identidad con los genes y proteínas homólogas de *T.cruzi*, que de *T.brucei*. Resultado que puede ser importante para esclarecer la posición taxonómica de *T.rangeli*. Actualmente, se está trabajando tanto en la localización de la proteína en el parásito, como en la expresión de la proteína recombinante para su uso en ensayos inmunológicos de reactividad serológica y activación linfocitaria.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por Colciencias y la Fundación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología del Banco de la República, según contratos N° 190-200 y 200115, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- BERBERICH C., FUERTES M.A., MACHADO G. Y ALONSO C. 1997A. KMP-11, una proteína abundante en la superficie de los kinetoplastidos. *Ars Pharmaceutica* 38: 237-244.
- BERBERICH C., REQUENA J. Y ALONSO C. 1997b. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Experimental Parasitology* 85: 105-108.
- BERBERICH C., MACHADO G., MORALES G., CARRILLO G., JIMÉNEZ-RUIZ A. Y ALONSO C. 1998. The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochimica et Biophysica Acta* 1442: 230-237.
- BERBERICH C. RAMÍREZ-PINEDA J.R., HAMBRECHT C., ALBER G., SKEIKY Y.A.W. Y MOLL H. 2003. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigen. *Journal of Immunology* 170: 3171-3179.
- BRIDGE M.A., ZHOU Q., KOOP B.F. Y PEARSON T. W. 1998. Cloning and characterization of the Kinetoplastid membrane protein-11 gene locus of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91: 359-363.
- D'ALESSANDRO A. Y SARAVIA N. 1999. *Trypanosoma rangeli*. En: Gilles H.M. (ed.). Protozoal Diseases. Oxford University Press Inc. New York, USA. págs. 398-412.
- DECARVALHO L.P., SOTO M., JERÓNIMO S., DONDJI B., BACELLAR O., LUZ V., ORGE O.G., ALONSO C., JESÚS A.R. Y CARVALHO E.M. 2003. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes and Infection* 5: 7-12.
- DICKIN S. Y GIBSON W. 1989. Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33: 135-142.
- FUERTES M., BERBERICH C., LOZANO R.M., JIMÉNEZ-GALLEGO G. Y ALONSO C. 1999. Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11(KMP11) from *Leishmania infantum*. *European Journal of Biochemistry* 260: 559-567.
- FUERTES M., PEREZ J.M., SOTO M., LOPEZ M.C. Y ALONSO C. 2001. Calcium induced conformational changes in *Leishmania infantum* kinetoplastid membrane protein-11. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6: 107-117.
- JARDIM A., FUNK V., CAPRIOLI R. Y OLAFSON R.W. 1995a. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Journal of Biochemistry*. 305: 307-313.
- JARDIM A., HANSON S., ULLMAN B., MCCUBBIN W.D., KAY C.M. Y OLAFSON R.W. 1995b. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Journal of Biochemistry* 305: 315-320.
- JENSEN A.T.R., GASIM S., ISMAIL A., GAAFAR A., KURTZHALS J.A.L., KEMP M., EL HASSAN A.M., KHARAZMI A. Y THEANDER T.G. 1998. Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Journal of Scandinavian Immunology* 48: 103-109.
- MARAÑÓN C., THOMAS M.C., PLANELLES L. Y LÓPEZ M.C. 2001. The immunization of A2/K^b transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T.cruzi* KMP-11 antigen: identi-

- cation of A2- restricted epitopes. *Molecular Immunology* 38: 279-287.
- MUKHOPADHYAY S., SEN P., MAJUMDER H.M. Y ROY S. 1998. Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplastid membrane protein (KMP-11) in *Leishmania donovani* promastigotes in axenic cultures. *Journal of Parasitology* 84: 644-647.
- MUKHOPADHYAY S., SEN P., BHATTACHARYYA S., MAJUMDAR S. Y ROY S. 1999. Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 17: 291-300.
- PLANELLES L., THOMAS M.C., ALONSO C. Y LOPEZ M.C. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and Immunity* 69: 6558-6563.
- PLANELLES L., THOMAS M.C., PULGAR M., MARANON C., GRABBE S. Y LOPEZ M.C. 2002. *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP-11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* 80: 241-247.
- RAMÍREZ J., BERBERICH C., JARAMILLO A., ALONSO C. Y VELEZ I.D. 1998. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93: 247-254.
- RAMÍREZ J.R., GILCHRIST K., ROBLEDOS S., SEPULVEDA J.C., MOLL H., SOLDATI D. Y BERBERICH C. 2001. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 12: 455-461.
- STEBECK C.E., BEECROFT R. P., SINGH B. N., JARDIM A., OLAFSON R. W., TUCKEY C., PRENEVOST K. D. Y PEARSON W. T. 1995. Kinetoplastid membrane protein-11 is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 71: 1-13.
- STEBECK C. E., BARON G.S., BEECROFT R.P. Y PEARSON T.W. 1996. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein -11 from African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 81: 81-88.
- TANOWITZ H., KIRCHHOFF L., SIMON D., MORRIS S., WEISS L. Y WITTNER M. 1991. Chagas' Disease. *Clinical Microbiology Review* 5:400-19.
- THOMAS M.C., FERNÁNDEZ A., MORO A., GARCIA-SALCEDO J.A. Y GONZALEZ A. 1993. Biología molecular de tripanosomátidos. En: Rivas, L.I. y López, M.C. (eds.). Nuevas tendencias de parasitología molecular. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. págs. 135-143.
- THOMAS M.C., GARCÍA-PÉREZ J.L., ALONSO C. Y LÓPEZ M.C. 2000. Molecular characterization of KMP-11 from *Trypanosoma cruzi*: A cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA and Cell Biology* 19: 47-57.
- THOMAS M.C., LONGOBARDO M.V., CARMELO E., MARANON C., PLANELES L., PATARROYO M.E., ALONSO C. Y LOPEZ M.C. 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T.cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clinical and Experimental Immunology* 123: 465-471.
- TOLSON D.L., JARDIM A., SCHNUR L.F., STEBECK C., TUCKEY C., BEECROFT R.P., TEH H., OLAFSON R. W. Y PEARSON T. W. 1994. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African try-

panosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infection and Immunity* 62: 4893-4899.

TRUJILLO, C., RAMÍREZ R., VELEZ I.D. Y BERBERICH C. 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishma-

niasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunology Letters* 70: 203-209.

Recibido: 14.10.2003
Aceptado: 18.03.2004

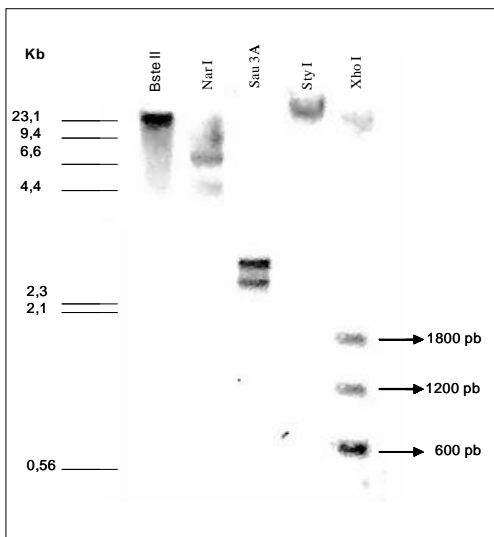
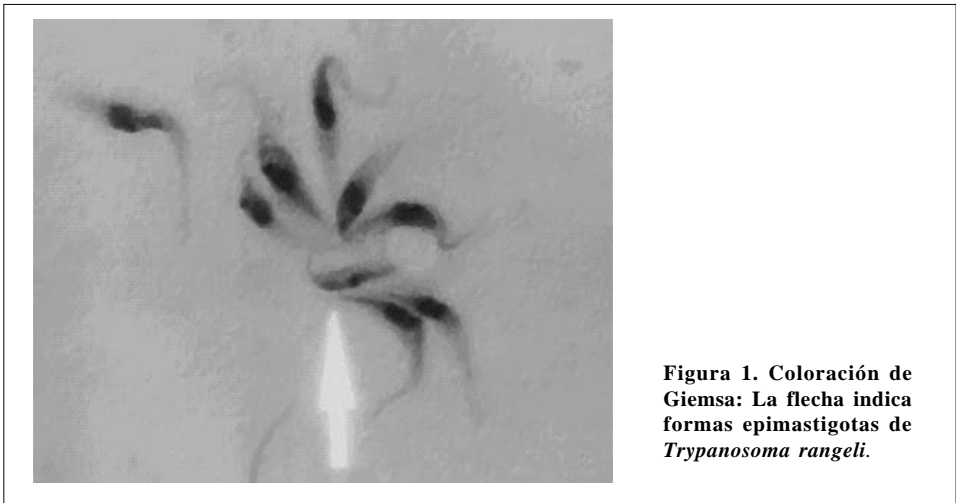


Figura 2. Análisis de “Southern blot” del ADN genómico de *Trangeli* hibridado con la región codificante para la proteína KMP-11 de *T. cruzi*: 2 µg de ADN fueron digeridos con enzimas de restricción, resueltos en un gel de agarosa al 0,8%, transferidos a membranas de “nylon” e hibridados con la región codificante de la KMP-11 de *T. cruzi*, amplificada mediante PCR y marcada radiactivamente. A la izquierda se indica el corrido del patrón de peso molecular λ-Hind III (Gibco - BRL). A la derecha se indican los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidas con la enzima Xho I.

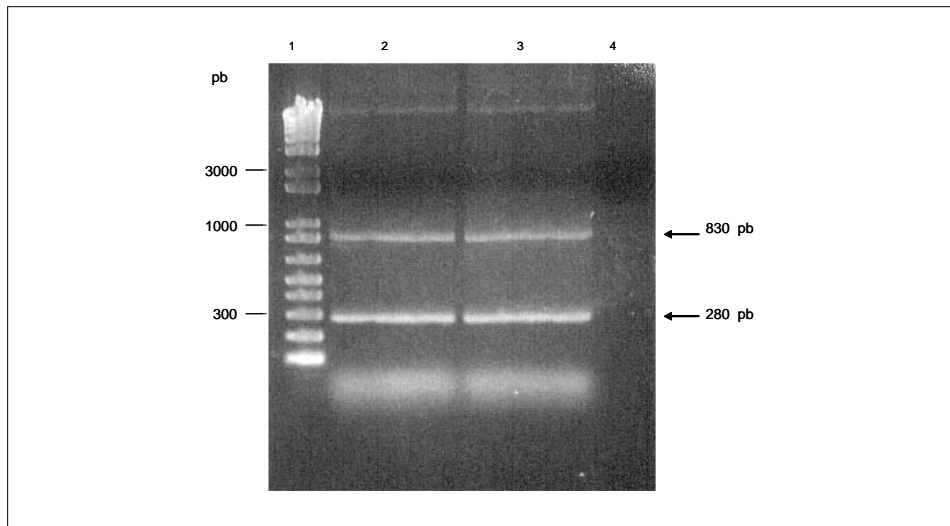


Figura 3A. Amplificación de los genes codificantes para la proteína KMP-11 en *Trangeli*. 100 μ l del producto de amplificación con los cebadores KMP11F/R fueron resueltos en un gel de agarosa al 1,5 %, coloreado con bromuro de etidio. 1: Patrón de peso molecular 1 Kb Ladder (Gibco-BRL), 2 y 3: producto de amplificación y 4: control negativo de la reacción de PCR.

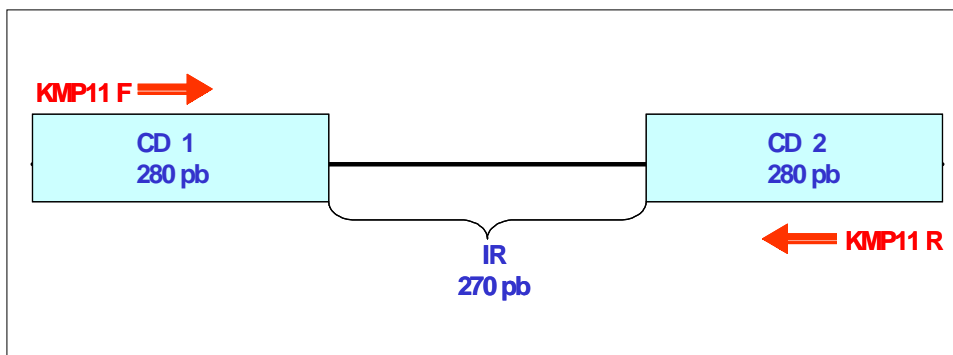


Figura 3B. Diagrama de la organización del fragmento de 830 pb amplificado en *Trangeli*. Las cajas representan las regiones codificantes de la primera copia (CD1) y segunda copia del gen (CD2) y la barra, denota la región intergénica entre ellas. Se indica la dirección de los cebadores empleados en la PCR.

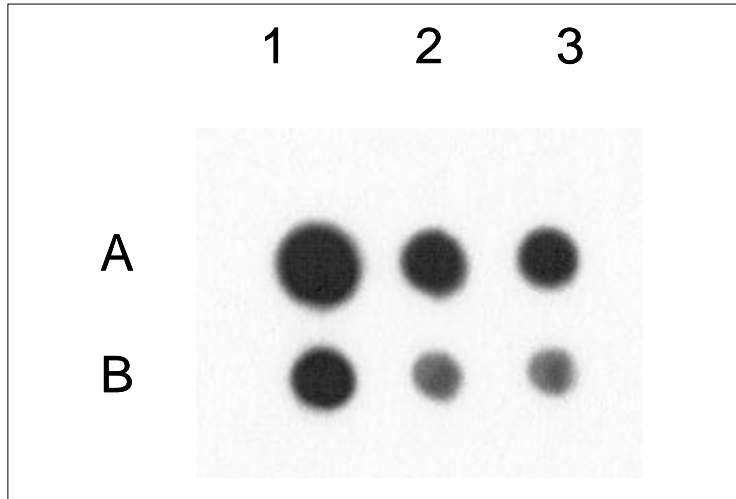


Figura 4. Ensayo de “Dot blot” del ADN genómico de *Trangeli* y de *T. cruzi*, hibridados con un fragmento de PCR, correspondiente a la región codificante de la KMP-11 de *Trangeli*. **A.** 1: 15 µg de ADN de la colonia 2tliA, que contiene la región codificante de la KMP-11 de *Trangeli*, 2: 15 µg de ADN de la cepa Y de *T. cruzi*, y 3: 15 µg de ADN de la cepa Tre de *Trangeli*. **B.** 1: 7,5 µg de ADN de la colonia 2tliA, 2: 7,5 µg de ADN de la cepa Y y 3: 7,5 µg de ADN de la cepa Tre.

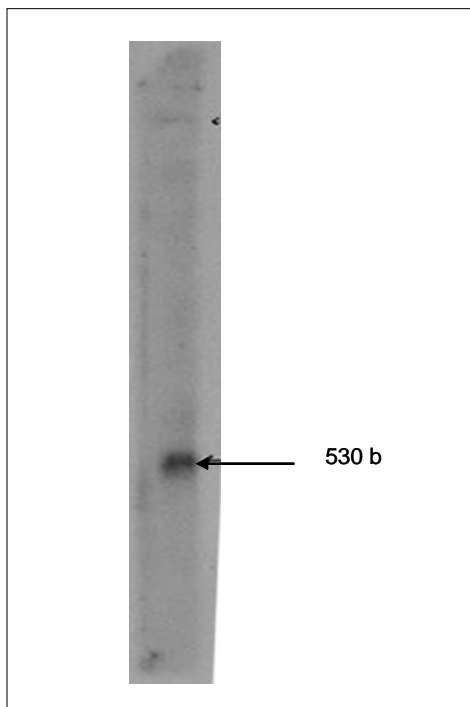


Figura 5. Análisis de “Northern blot” del ARN total de formas epimastigotas de *Trangeli* hibridadas con un fragmento de PCR, correspondiente a la región codificante de la KMP-11 de *Trangeli*. A la derecha se indica el tamaño de la banda en bases.

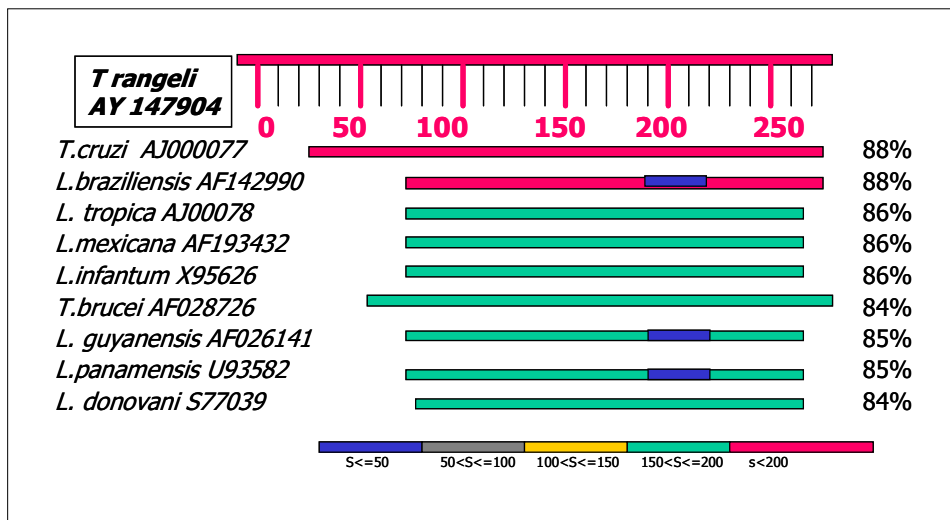


Figura 6A

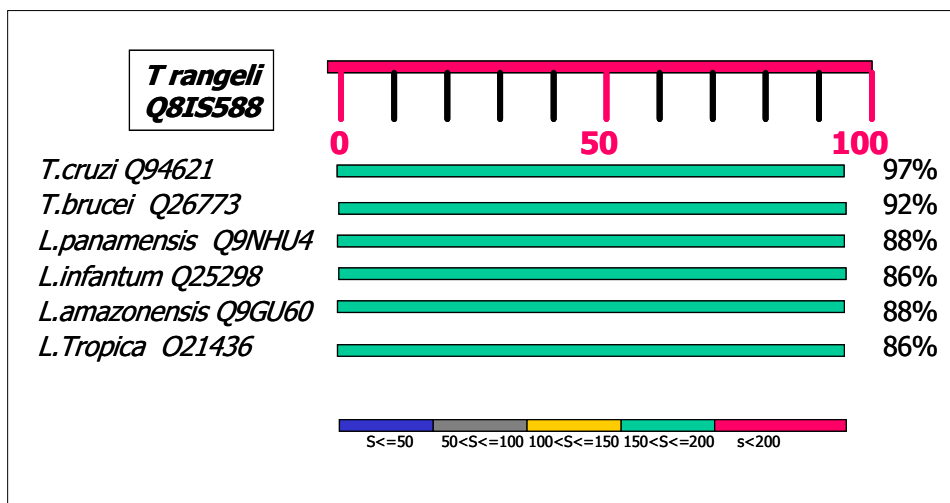


Figura 6B

Análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos (A) y de la secuencia de aminoácidos (B) de la región codificante para la proteína KMP-11 de *T. rangeli*. Los números de acceso de las secuencias al GenBank y SwissProt se indican a la izquierda y los porcentajes de identidad a la derecha. Los colores de las barras, se asignan según el puntaje (S) señalado en la figura. A mayor puntaje, mayor identidad.

```

          10          20          30          40          50          60
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ATGCCACCACTCTTGAGGAGTTTTCGCGCAAACCTTGACCGGTTGGATGCCGAGTTTGCA

          70          80          90          100         110         120
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AAGAAGATGGAGGAGCAGACCAAGAAGTCTTTGCGGACAAGCCGGACGAAGCACCCTG

          130         140         150         160         170         180
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TCTCCTGAAATGAAGGAGCACTACGAGAAGTTCGAGAGGATGATTCAGGAGCACACCAGC

          190         200         210         220         230         240
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCTGAGCACTTTAAGTCGAAGTTTGCTGAGCTG

          250         260         270         280         290         300
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CTCGAGCAACAGAAGAACGCTCAGTCCCGGGCAAGTAGGCAGAGAGGAGAGAATGGATG

          310         320         330         340         350         360
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TGACTATGTTTGGGTACGCGCGCCATTGTCTCCATTTTCGATGTTTAAATAGAATAG

          370         380         390         400         410         420
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GGGTTTTTTTGGTTATGTTTCTGGACTTATCAGACGGCAGCTACCCGGTTTGCCTGGCC

          430         440         450         460         470         480
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ACCAATGTTGCAATCTTTTTTTTTTTTATTTTGCTTTCAGGTGGGTGATGCCGCCGCCAT

          490         500         510         520         530         540
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TTCTTCCTGTGTTCTTTGCTGCTTTTCTCTCGCAGTTTGATGCGCCCAAGCTATATCTT

          550         560         570         580         590         600
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TAAGTGAACATGGCCACCACCCCTTGAGAAGTTTTCGCGCAAACCTGACCGGTTGGATGC

          610         620         630         640         650         660
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CGAGTTTGCAAGAAGATGGAGGAGCAGAACAAGAAGTCTTCGCGGACAACCCGACGA

          670         680         690         700         710         720
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GAGCACGCTCTCCCTGAAATGAAGGAGCACTATGAAAAGTTTGAAAAATGATTCAGGA

          730         740         750         760         770         780
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GCACACCGACAAATTCAACAAAAAGATGCACGAGCACTCTGAGCACTTCAAGGCCAAAT

          790         800         810         820
-----|-----|-----|-----|-----|
TGCTGAGTTGCTTGAGCAGCAGAAGAACGCTCAGTTCCCCAGGAAAGTAA

```

Figura 7. Secuencia del fragmento de 830 pb codificante para una agrupación génica de la KMP-11 de *Trangeli*. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia y las letras en negrita las regiones codificantes.

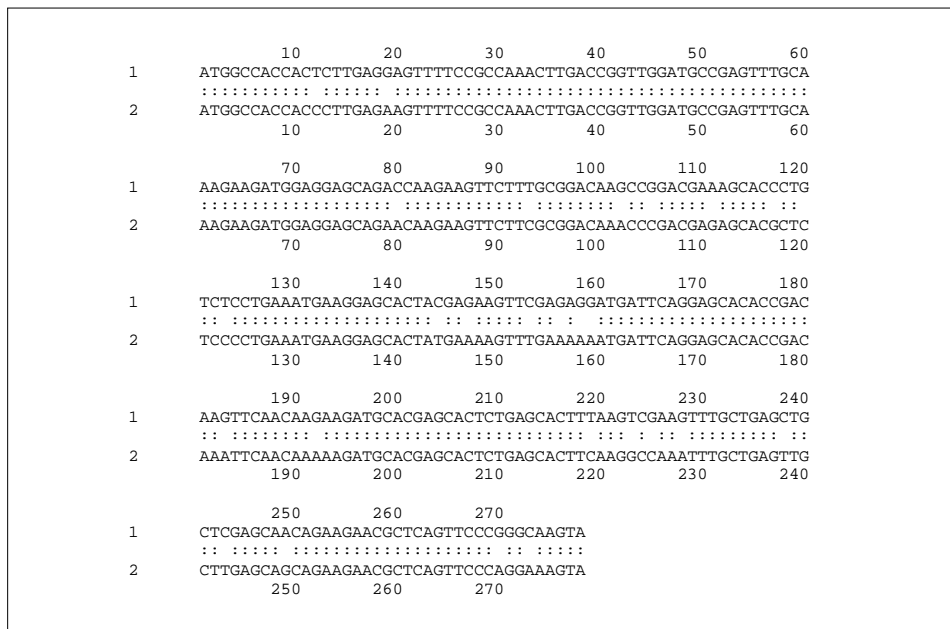


Figura 8A. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las regiones codificantes 1 y 2 de la agrupación génica de 830 pb, mostrando un 90 % de identidad entre las secuencias. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia, dos puntos indican identidad y un espacio indica falta de identidad entre las secuencias.

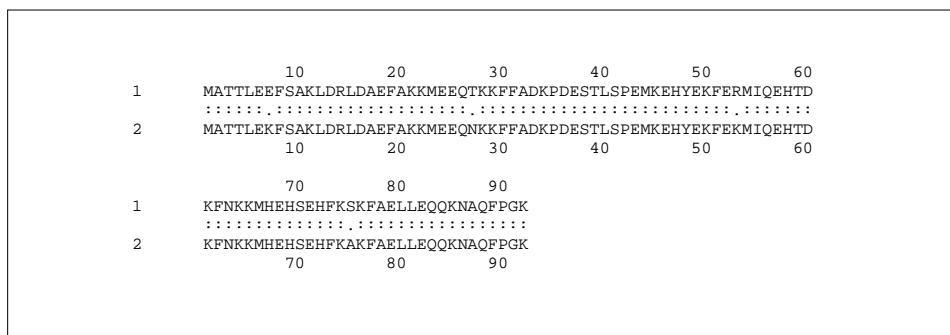


Figura 8B. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones codificantes 1 y 2 de la agrupación génica de 830 pb, mostrando un 96 % de identidad entre las secuencias. Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia, dos puntos indican identidad, un punto indica homología y un espacio indica falta de identidad y de homología entre las secuencias.