

## Caracterización de la expresión y aislamiento de proteínas de choque térmico (HSP) en *Trypanosoma cruzi*

Torrealba Saibel, Ferraz Sabrina, Pérez José Luis, Mosca Walter y Campos Yelitza

Laboratorio de Fisiopatología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela

### RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad del Chagas, la cual afecta a unas 18 millones de personas, siendo para muchos países de Centro y Sur América uno de los principales problemas de salud pública. En Venezuela, algunos estudios reportan un 11.2% de seroprevalencia frente a *T. cruzi*, principalmente en localidades rurales. Hasta la fecha, la quimioterapia convencional es efectiva solo en la fase aguda de la enfermedad, además origina efectos secundarios indeseados en los pacientes, este problema asociado a la ausencia de tratamientos de inmunoprofilaxis, hace prioritario el estudio y el aislamiento de nuevas moléculas o antígenos de *T. cruzi*, capaces de inducir una respuesta inmune protectora, que permita ofrecer una alternativa a la población susceptible. En este sentido, se ha descrito que las proteínas de choque térmico (HSP) juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral y están involucradas en la inducción de inmunidad contra agentes infecciosos. Es por ello, que esta investigación está orientada a evaluar distintas condiciones experimentales sobre el aumento en la expresión de HSP de *T. cruzi*, que puedan ser utilizadas para un aislamiento más eficiente de las mismas, con la finalidad de evaluar posteriormente su potencial uso como herramienta en la inmunoterapia. En función de esto, se tomaron cultivos de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, en fase estacionaria de crecimiento, se les sometió a diferentes condiciones de estrés (nutrientes, temperatura y temperatura-nutrientes) durante distintos tiempos de incubación y se evaluó el perfil de proteínas obtenido a través de electroforesis en geles de poliácridamida SDS-PAGE, evidenciándose diferencias cualitativas y cuantitativas de una condición a otra. Posteriormente, para demostrar la presencia de la proteína de interés, se realizó inmunoblot de las distintas condiciones experimentales, y se enfrentaron contra anticuerpos anti-HSP70, obteniéndose 2 bandas que varían en intensidad según la condición de estrés. La condición de estrés de nutrientes, aplicado durante 4 horas, fue la condición donde se observó mayor expresión de HSP70, por ello, se escogió esta condición para realizar una purificación parcial de HSP70 por ultracentrifugación, estableciéndose así el protocolo de expresión y purificación necesario para las evaluaciones futuras que se realizarán en el Laboratorio de Fisiopatología.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, proteínas de choque térmico HSP.

## (HSP) Hot shock proteins isolation and expression in *Trypanozoma cruzi*

### SUMMARY

*Trypanosoma Cruzii* is the ethiological agent of Chagas disease that affects around 18 million persons, being one of the public health main problems in some south and central American countries. In Venezuela some reports and researches show 11.2% of seroprevalence for TC specially at communities in the country. Until now the standard chemotherapy is effective only in the acute stage of the disease and produces unexpected secondary effects to the patients, this situation besides a lack of immunoprofilaxis treatments, make necessary the research and isolation of new molecules or TC antigens capable to produce immune protective answers in order to give an option to the susceptible population. Hot shock proteins (HSP) are very important for the development of a humoral and cellular immune answer, and are related to the immunity against infecting agents, this is why this research is designed to evaluate the different experimental conditions about the increasing of HSP expression in TC in order to be used for a better isolation of the same, with the aim of evaluating their power as a tool in immunotherapy. According to this goal some TC epimastigotes cultures were taken in growing stage and were affected with different stress condition (nutrients-temperature, temperature-nutrients) during the procedure and the proteins profile obtained was evaluated by electrophoresis with polyacrilamid SDS-PAGE finding quantitative and qualitative differences from one condition to another, in order to demonstrate the protein existence, immunoblot of the different experimental conditions were faced against anti-HSP70 antybodies obtaininf two stripes of different intensities according to the stress condition. The nutrient stress condition applied during 4 hours was the highest expression of HSP-70, for this reason this condition was selected to make a partial purification of HSP-70 by ultracentrifugation, giving the expression and purification protocol needed for next evaluations at the fisiopathology laboratory.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, HSP Hot shock proteins.

## Introducción

La enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública para América latina, afectando entre 16 – 18 millones de personas principalmente en áreas rurales (1); en Venezuela, algunos estudios reportan un 11.2% de seroprevalencia frente a *T. cruzi*, principalmente en localidades rurales, donde el 8.5% de los infectados fueron niños menores de 10 años, sugiriendo transmisión activa durante las últimas 2 décadas (2). Además, hay que tomar en cuenta lo poco eficiente de la quimioterapia convencional y el grado de morbilidad que produce el no tener una alternativa de inmunoprofilaxis contra la enfermedad de Chagas, lo que hace prioritario el estudio y aislamiento de nuevas moléculas que puedan ser usadas para tal fin y que aporte una alternativa a la población susceptible. Entre las moléculas que están siendo investigadas en la actualidad en este campo de estudio, encontramos las proteínas de choque térmico (HSP).

Las proteínas de choque térmico o Heat Shock Proteins (HSP), se han descrito en todos los organismos vivos y son altamente conservadas de una especie a otra, además cumplen una función importante en el mantenimiento de la homeostasis celular al funcionar como chaperonas moleculares ayudando al plegamiento de péptidos nacientes y previniendo la agregación de proteínas en el citoplasma celular (3). Así, las HSP constituyen hasta 5% de las proteínas intracelulares totales sin embargo, bajo condiciones de estrés, tales como exposición a las altas temperaturas, a toxinas, a condiciones oxidativas o a la privación de glucosa, sus niveles pueden elevarse hasta 15% o más, pudiendo encontrar la forma constitutiva (HSC) y la forma inducible (HSP), esta última es la encargada de prevenir la agregación de proteínas importantes para la célula, cuando se encuentra bajo alguna condición que represente un estrés para ella (4). Además de sus funciones como chaperonas moleculares, se ha descrito que las HSP juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral. En este sentido, se ha encontrado que las HSPs purificadas de un determinado tipo celular, por ejemplo de células cancerosas, están asociadas con una variedad de péptidos, que constituyen un repertorio propio de las células de donde se aislaron (5). Actualmente, se está usando la inmunización con los complejos HSP-péptidos derivados endógenamente o reconstituidos "in vitro" para desencadenar una potente respuesta contra los péptidos asociados a HSP y por ende contra las células de donde se originaron. Esta estrategia se está utilizando en el tratamiento de tumores, virus y otras enfermedades infecciosas, obteniéndose buenos resultados (6).

Con respecto a *T. cruzi*, se ha analizado el efecto de las proteínas de choque térmico del parásito en la maduración de células dendríticas precursoras de ratón; los resultados obtenidos demostraron que la HSP70 sola, unida al antígeno KMP11, así como también fragmentos de HSP70, son capaces de ma-

durar las células dendríticas murinas. La célula dendrítica madura aumenta la expresión de IL-12, de citocinas como TNF- $\alpha$ , de moléculas coestimuladoras y marcadores de activación, demostrando un aumento claro en la capacidad aloestimuladora. Así estos resultados sugieren que la HSP70 de *T. cruzi*, puede ser un vehículo muy útil para desarrollar inmunoprofilaxis e inmunoterapia basadas en células dendríticas, contra el agente infeccioso (7).

Es evidente, que las HSP representan un tema que puede aportar alternativas a la enfermedad de Chagas, y no sólo ellas como moléculas dominantes en diversos organismos, sino la importancia de los péptidos que ellas acoplan y protegen, de los cuales algunos pueden tener potencial inmunológico, tal como lo sugieren algunos trabajos (8), es por ello, que esta investigación está orientada a evaluar distintas condiciones experimentales sobre el aumento en la expresión de HSP de *T. cruzi*, que puedan ser utilizadas para un aislamiento más eficiente de las mismas (solas y acopladas a péptidos del parásito), con la finalidad de evaluar posteriormente su potencial uso como herramienta en la inmunoterapia.

## Metodología

**Cultivo de parásitos** se realizó a partir de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, con un inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  parásitos/ml en un volumen final de 100ml en medio LIT enriquecido con suero Newborn al 5%, sangre desfibrinada de conejo 0.2% y gentamicina 50ig/ml colocado en 4 frascos para cultivo celular de 400ml (Falcon) los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente. Se hicieron recuentos diarios hasta llegar a fase estacionaria de crecimiento, donde se procedió a colocar cada cultivo bajo las condiciones experimentales establecidas.

**Estrés de nutrientes** consistió en colocar los parásitos en medio mínimo de nutrientes (RPMI + gentamicina). El estrés de temperatura consistió en colocar el cultivo de parásitos en la estufa a 37°C. Estrés de nutrientes – temperatura, ambas condiciones combinadas; cada una a distintos tiempos de incubación (2, 4, y 24 horas).

**Procesamiento de los cultivos** posterior cumplidas las condiciones experimentales establecidas, se colocó el cultivo en tubos cónicos plásticos estériles centrifugándolo a 1500 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con buffer PBS pH 7.4, centrifugando en cada caso bajo las mismas condiciones. Luego, se resuspendió el sedimento en 1ml de buffer PBS pH 7.4 y se agregó un cocktail de inhibidor de proteasas 10x (Protease inhibitor cocktail. SIGMA) con una dilución 1/10. Posteriormente los parásitos se sonicaron (sonicador SONIFIER 250, Branson), dando 7 pulsos de 10 watts con intervalos de 5 segundos cada uno, con la muestra colocada en hielo; una vez lizados los cultivos, se centrifugaron 10 minutos a 1000 g y se alicuotó



200µl del sobrenadante, en tubos eppendorf nuevos y finalmente se guardaron a -20°C hasta su uso.

**Cuantificación de proteínas** cuantificación de las proteínas totales de los lisados de *T. cruzi*, utilizando el Micro Lowry, (modificación del Lowry 1951). Se leyó a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Beckman Du 640B.

**Evaluación del perfil de proteínas de los lisados de *T. cruzi*** se evaluó el perfil de proteínas de los lisados a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones disociantes y desnaturizantes por el método SDS – PAGE. Se colocó 10µg de cada muestra en pozos independientes en un volumen total de 25µl completado con buffer de muestra 1X. Se usó 2µl del marcador de PM para cada gel (Broat Range Protein Molecular Weight Markers, PROMEGA). Para iniciar la corrida se colocó la fuente de poder a 80v constante, hasta observar que las muestras se alinearan al final del gel de apilamiento, luego se aumentó el voltaje a 160v constantes, hasta el final de la corrida. Una vez finalizada se realizó a cada gel, la tinción de azul brillante de Coomassie. Los pesos moleculares de las bandas reveladas se calcularon a través del Software “Quantity one” de BIO-RAD.

**Electrotransferencia e inmunoblot** se realizaron corridas electroforéticas con geles preparativos para cada muestra (poliacrilamida 10%), se usó un marcador de PM preteñido (BenchMark™ Prestained Protein Ladder, INVITROGEN). Una vez culminada la corrida, se montó el sistema de transferencia a nitrocelulosa durante 1 hora usando 70V, 130 mA, 9W. Al final de la transferencia se tiñó con rojo ponceu cada una para corroborar la transferencia de proteínas. Posteriormente se realizó inmunoblot (modificación del método de Southern 1975), a cada muestra transferida en nitrocelulosa, usando como anticuerpos primarios anti – HSP70 (producida por el laboratorio del Dr. Tomás Hermoso) (dilución 1/50), pool de sueros negativos y positivos para la enfermedad de Chagas (1/1000); anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Goat anti-human IgG (H+L) GIBCO – BRL, Anti-conejo, Anti-Rabbit IgG phosphatase alkaline BIO-RAD) (dilución 1/1000), y sustrato para fosfatasa alcalina (Sustrato 1-Step™ NBT/ BCIN, PIERCE). Se usó como control positivo para HSP70: HSP70 de extracto de corazón homólogo con la secuencia HSP70 de *Leishmania sp.*

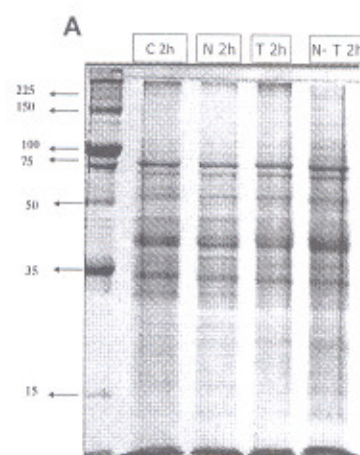
**Purificación parcial de HSP70** se realizó a partir de cultivos masivos de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, en fase estacionaria de crecimiento, siguiendo las mismas condiciones descritas para la inducción de las HSP en estrés de nutrientes de 4 horas. Aproximadamente  $1 \times 10^9$  parásitos se resuspendieron en 10ml de tampón de lisis A (50mM tris/HCl pH 8, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) + inhibidor de proteasas. Posteriormente se homogeneizó en un sonicador (SONIFIER 250, Branson), dando 7 pulsos de 10 watts con intervalos de 5 segundos cada

uno, manteniendo la muestra en hielo. Se ultracentrifugó 100.000 xg 1 hora a 4°C, luego se separó la fracción soluble S1, donde se ha descrito que se encuentra la HSP70 (16).

A esta fracción soluble (S1) se le realizó todo el procedimiento de electrotransferencia e inmunoblot descrito anteriormente utilizando como anticuerpo primario anti-HSP70, revelando así la presencia en mayor cantidad de la proteína de interés para esta condición.

## Resultados

**Evaluación del perfil de proteínas de los lisados de *T. cruzi*** al evaluar los cambios en el perfil de proteínas de los lisados de *T. cruzi* bajo las distintas condiciones de estrés (temperatura, nutrientes y nutrientes-temperatura) a los distintos tiempos de incubación (2, 4 y 24 horas), por el método de electroforesis SDS – PAGE, observamos que estos varían cualitativa y cuantitativamente, dependiendo de la condición experimental aplicada.



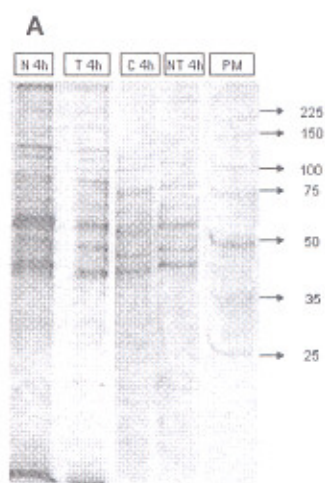
**B Condiciones/ Intensidades**

| Peso molecular | Control | Nutrientes | Temperatura | Nutrientes – temperatura |
|----------------|---------|------------|-------------|--------------------------|
| 79,02          | 136,91  | 113,18     | 124,94      | 147,62                   |
| 68,75          | 121,34  | 102,25     | 114,03      | 134,76                   |
| 53,75          | 119,69  | 96,02      | 108,49      | 123,75                   |
| 45,66          | 114,07  | 102,21     | 103,85      | 118,95                   |
| 40,89          | 149,35  | 131,76     | 139,69      | 161,70                   |
| 36,62          | 135,64  | 109,85     |             | 139,35                   |
| 34,11          | 149,04  | 122,82     | 119,61      | 134,35                   |
| 30,26          | 115,34  | 92,35      | 104,19      | 98,02                    |

**Figura 1. Perfil proteico del lisado de *T. cruzi* bajo condiciones de estrés de 2 horas (A) Electroforesis SDS – PAGE 10% en condiciones disociantes del lisado de *T. cruzi*, cultivados bajo condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, nutrientes- temperatura y control (sin estrés), durante un tiempo de 2 horas. Tabla 1. (B). Peso molecular e intensidades de las bandas mas evidentes separadas en la electroforesis. Analizadas por el programa Quantity one.**

Así observamos que en la condición de estrés de nutrientes y de temperatura, la intensidad de las bandas disminuyen, esto al ser comparadas con el control, lo que sugiere que ha comenzado a producirse cambios en el pool de proteínas del parásito, bajo estas condiciones. Por el contrario en la condición de nutrientes-temperatura, observamos una intensidad de las, particularmente aquellas que se encuentran en un rango de pesos moleculares de 73 a 30 KDa, por debajo de esta rango se mantienen bajas con respecto al control (Figura 1, Tabla 1).

Cuando se mantiene la condición de estrés durante 4 horas, igualmente observamos que las intensidades de las bandas son menores que las observadas en el control, exceptuando en las condiciones de temperatura y nutrientes-temperatura, en donde se observa un mayor grado de intensidad en las bandas localizadas entre 50 y 40 KDa (Figura 2, Tabla 2).

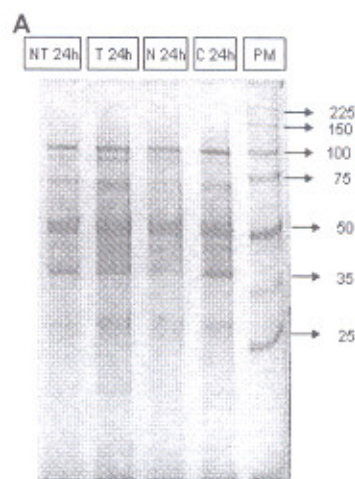


**B Condiciones/ Intensidades**

| Peso molecular | Control | Nutrientes | Temperatura | Nutrientes – temperatura |
|----------------|---------|------------|-------------|--------------------------|
| 104.77         | 98.93   | 114.39     | 83.74       | 72.28                    |
| 93.54          | 93.96   | 104.58     | 75.58       | 77.36                    |
| 74.16          | 119.75  | 105.26     | 99.03       | 78.07                    |
| 73.30          | -       | -          | 79.30       | 91.68                    |
| 66.95          | 99.72   | 92.31      | 81.52       | 93.39                    |
| 62.87          | 122.54  | 97.55      | 115.77      | 83.68                    |
| 53.93          | 148.39  | 143.48     | 106.03      | 134.6                    |
| 46.87          | 118.25  | 116.39     | 87.26       | -                        |
| 46.13          | 156.50  | 101.87     | 123.29      | -                        |
| 41.53          | 172.25  | 123.81     | -           | 159.61                   |

**Figura 2.** Perfil proteico del lisado de *T. cruzi* bajo condiciones de estrés de 4 horas (A) Electroforesis SDS – PAGE 10% en condiciones disociantes del lisado de *T. cruzi*, cultivados bajo condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, nutrientes- temperatura y control (sin estrés), durante un tiempo de 2 horas. Tabla 2.- (B). Peso molecular e intensidades de las bandas mas evidentes separadas en la electroforesis. Analizadas por el programa Quantity One.

Después de 24 horas de transcurrido el estrés, la condición de temperatura afecta de tal manera al parásito, que aumenta la intensidad de las bandas analizadas entre los 92 hasta 39 KDa, y en nutrientes-temperatura las variaciones ocurren en determinadas fracciones, así tenemos aumento entre 70 y 60 KDa y disminución en bandas de 66, 61, 50 y 40 KDa (Figura 3, Tabla 3). Estos resultados sugieren que, dependiendo de las condiciones del entorno del parásito, este va a dirigir su maquinaria a la síntesis y/o degradación de un grupo de proteínas que le permitan a adaptarse al nuevo entorno y así garantizar su supervivencia. Algunas de las proteínas de nueva síntesis, pueden ser HSP, que como se ha descrito actúan en la protección de moléculas importantes para el parásito, desempeñando su rol en situaciones de estrés como es el caso.



**B Condiciones/ Intensidades**

| Peso molecular | Control | Nutrientes | Temperatura | Nutrientes – temperatura |
|----------------|---------|------------|-------------|--------------------------|
| 101.15         | 223.26  | 164.74     | 204.52      | 181.13                   |
| 90.63          | 110.5   | 108.65     | 154.56      | 110.87                   |
| 71.66          | 130.65  | 115.78     | 161.44      | 143.48                   |
| 69.94          | 146.44  | 117.78     | 185.87      | 103.48                   |
| 59.10          | 135.39  | -          | 170.70      | 126.74                   |
| 55.30          | 159.82  | 140.30     | 148.13      | 137.09                   |
| 51.17          | 244.48  | 231.09     | 255.00      | 233.52                   |
| 45.69          | 186.09  | 165.78     | 211.82      | 161.74                   |
| 42.81          | 163.04  | 144.96     | 221.26      | 145.30                   |
| 39.69          | 201.30  | 143.48     | 198.74      | 189.48                   |
| 29.02          | -       | 107.09     | 206.52      | -                        |

**Figura 3.** Perfil proteico del lisado de *T. cruzi* bajo condiciones de estrés de 24 horas (A) Electroforesis SDS – PAGE 10% en condiciones disociantes del lisado de *T. cruzi*, cultivados bajo condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, nutrientes- temperatura y control (sin estrés), durante un tiempo de 2 horas. Tabla 3.- (B). Peso molecular e intensidades de las bandas mas evidentes separadas en la electroforesis. Analizadas por el programa Quantity one.

**Determinación de HSP70 en los lisados de *T. cruzi*** se enfrentaron los lisados de *T. cruzi*, obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales, contra anticuerpos anti-HSP70, con la finalidad de detectar la presencia de dicha proteína y a su vez, determinar la condición experimental donde se expresa en mayor proporción; además se decidió enfrentar las muestras, a pool de sueros de pacientes positivos para la enfermedad Chagas, debido a que se ha descrito que en estos pacientes se han encontrado anticuerpos capaces de reconocer la HSP70 del parásito (9) y queríamos evaluar si cambian el patrón de reconocimiento bajo las distintas condiciones de estrés. Así, se orientó este ensayo a evaluar si había reconocimiento dentro del rango de pesos moleculares que corresponde con la proteína de interés (80 – 60 KDa) y determinar si este varía según la condición analizada.

Los resultados obtenidos indican, que la HSP70 esta presente en todos los lisados de *T. cruzi*, obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales, pero al hacer el análisis de las bandas de reconocimiento se encontró, que la intensidad de estas varía dependiendo de la condición de estrés, lo que es indicativo de que la expresión de HSP70, depende del estrés aplicado y el tiempo empleado.

Podemos observar que ya a las 2 horas de incubación bajo las distintas condiciones de estrés, existe un aumento de HSP70, condición que se mantiene a lo largo del tiempo, (4 y 24 horas); además de reconocer bandas entre 80 y 60 KDa, rango de pesos descritos para la familia de HSP70, también hay reconocimiento en regiones de menor peso molecular (50 – 30 KDa), ocurriendo este hecho sólo en las situaciones en que el parásito esta siendo estresado; así para el tiempo de 2 horas estas bandas de menor peso se observaron en todas las condiciones de estrés, a 4 horas en nutrientes y nutrientes-temperatura; y para 24 horas sólo en la condición de nutrientes (Figuras 4, 5, 6 A). Estos pequeños cambios son compatibles con los observados en el perfil electroforético, donde las bandas de proteínas dentro del rango entre 50 y 30 KDa son unas de las más intensas.

Cuando se observó el perfil de reconocimiento del pool de sueros positivos, enfrentado a los lisados de *T. cruzi*, es evidente que hay variación de las proteínas reconocidas bajo las distintas condiciones de estrés (Figuras 4, 5 y 6 A). Es de señalar que dentro de las proteínas reconocidas por el pool positivo, hay algunas que se encuentran en la zona de peso molecular de la HSP70, inclusive se presentan como bandas de gran intensidad, lo que puede indicar que los sueros de pacientes positivos reconocen las HSP70 que se encuentran en los lisados de *T. cruzi*, y varían dependiendo de la condición de estrés utilizada. Sin embargo es necesario confirmar este reconocimiento con el anticuerpo específico, lo cual esta planteado en trabajos futuros. Otro punto importante que mencionar, es que según los datos obtenidos, la condición de estrés de nutrientes aplicado por un tiempo de 4 horas, es donde se

encontró mayor expresión de HSP70, por lo cual fue la escogida para purificar la proteína de interés, estableciendo de esta manera un protocolo a seguir para futuros estudios que requieran inducción de HSP.

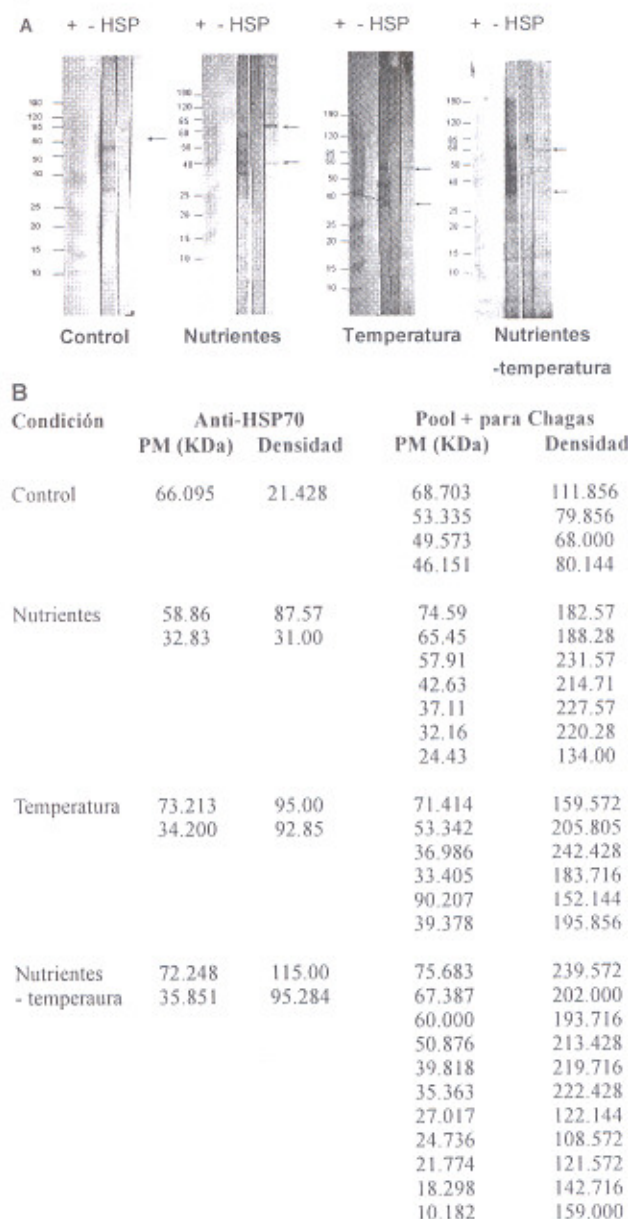
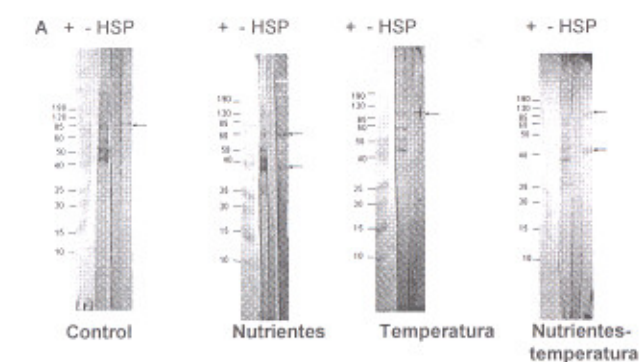
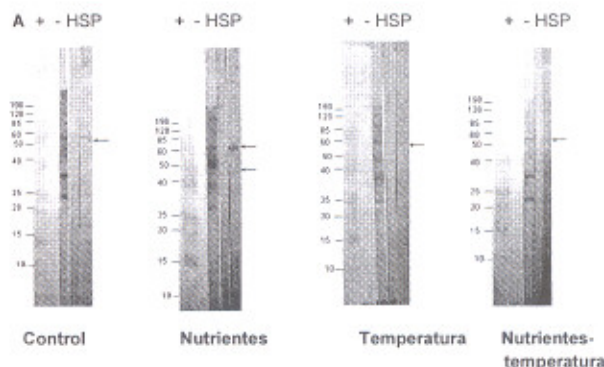


**Figura 4. (A)** Inmunoblot de las condiciones de estrés de 2 horas. Se observa los inmunoblot de las muestras sometidas a estrés de una duración de 2 horas y el del control (sin estrés). Se usó un pool de suero de pacientes con serología positiva para Chagas (+), un pool de suero negativo para el Chagas (-) y un anticuerpo contra HSP70 (HSP), en ese orden (de izquierda a derecha) respectivamente. **Tabla 4.- (B)** Pesos moleculares y densidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-HSP70 y Pool de sueros positivos para Chagas respectivamente.



| Condición                   | Anti-HSP70 |          | Pool + para Chagas |          |
|-----------------------------|------------|----------|--------------------|----------|
|                             | PM (KDa)   | Densidad | PM (KDa)           | Densidad |
| Control                     | 94.406     | 158.000  | 497.122            | 131.000  |
|                             |            |          | 230.301            | 130.428  |
|                             |            |          | 187.980            | 136.144  |
|                             |            |          | 156.751            | 140.284  |
|                             |            |          | 132.115            | 127.144  |
|                             |            |          | 106.436            | 136.856  |
|                             |            |          | 90.254             | 160.572  |
|                             |            |          | 54.573             | 149.284  |
|                             |            |          | 47.729             | 175.144  |
|                             |            |          | 40.751             | 192.000  |
| Nutrientes                  | 71.060     | 119.716  | 26.222             | 105.284  |
|                             |            |          | 80.073             | 132.000  |
|                             |            |          | 59.250             | 150.284  |
|                             |            |          | 52.911             | 185.000  |
|                             |            |          | 48.581             | 205.428  |
| Temperatura                 | 64.650     | 135.428  | 41.168             | 135.856  |
|                             |            |          | 91.230             | 134.856  |
|                             |            |          | 58.315             | 147.000  |
|                             |            |          | 52.153             | 137.144  |
|                             |            |          | 42.843             | 161.572  |
| Nutrientes<br>+ temperatura | 86.977     | 92.572   | 29391              | 137.716  |
|                             |            |          | 373.990            | 168.856  |
|                             |            |          | 204.298            | 142.284  |
|                             |            |          | 79.874             | 115.856  |
|                             |            |          | 48.431             | 125.856  |
|                             | 44.366     | 58.716   | 40.320             | 160.144  |
|                             |            |          | 29.489             | 119.716  |

Figura 5. (A) Inmunoblot de las condiciones de estrés de 4 horas. Se observa los inmunoblot de las muestras sometidas a estrés de una duración de 2 horas y el del control (sin estrés). Se usó un pool de suero de pacientes con serología positiva para Chagas (+), un pool de suero negativo para el Chagas (-) y un anticuerpo contra HSP70 (HSP), en ese orden (de izquierda a derecha) respectivamente. Tabla 5.- (B) Pesos moleculares y densidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-HSP70 y Pool de sueros positivos para Chagas respectivamente.



| Condición                   | Anti-HSP70       |                  | Pool + para Chagas |          |
|-----------------------------|------------------|------------------|--------------------|----------|
|                             | PM (KDa)         | Densidad         | PM (KDa)           | Densidad |
| Control                     | 54.021           | 87.284           | 216.090            | 75.144   |
|                             |                  |                  | 126.803            | 79.284   |
|                             |                  |                  | 88.320             | 81.428   |
|                             |                  |                  | 65.022             | 108.144  |
|                             |                  |                  | 53.427             | 122.572  |
|                             |                  |                  | 39.555             | 152.856  |
|                             |                  |                  | 31.271             | 112.000  |
|                             |                  |                  | 27.649             | 137.572  |
|                             |                  |                  | 187.449            | 178.856  |
|                             |                  |                  | 168.239            | 182.000  |
| Nutrientes                  | 85.000<br>60.618 | 98.428<br>79.284 | 148.970            | 170.856  |
|                             |                  |                  | 110.088            | 171.284  |
|                             |                  |                  | 90.677             | 203.428  |
|                             |                  |                  | 76.723             | 171.000  |
|                             |                  |                  | 71.414             | 178.144  |
|                             |                  |                  | 65.124             | 179.000  |
|                             |                  |                  | 58.527             | 169.572  |
|                             |                  |                  | 50.416             | 171.428  |
|                             |                  |                  | 47.561             | 161.716  |
|                             |                  |                  | 45.415             | 156.716  |
| Temperatura                 | 80.206           | 77.176           | 43.199             | 163.284  |
|                             |                  |                  | 211.256            | 96.284   |
|                             |                  |                  | 186.671            | 114.856  |
|                             |                  |                  | 143.199            | 108.572  |
|                             |                  |                  | 80.206             | 116.000  |
|                             |                  |                  | 56.102             | 107.716  |
|                             |                  |                  | 42.510             | 107.716  |
|                             |                  |                  | 24.283             | 95.284   |
|                             |                  |                  | 196.836            | 113.716  |
|                             |                  |                  | 148.351            | 119.856  |
| Nutrientes<br>- temperatura | 72.150           | 98.000           | 115.722            | 136.572  |
|                             |                  |                  | 73.643             | 163.572  |
|                             |                  |                  | 50.920             | 155.144  |
|                             |                  |                  | 34.005             | 211.856  |
|                             |                  |                  | 25.215             | 224.000  |
|                             |                  |                  |                    |          |

Figura 6. (A) Inmunoblot de las condiciones de estrés de 24 horas. Se observa los inmunoblot de las muestras sometidas a estrés de una duración de 2 horas y el del control (sin estrés). Se usó un pool de suero de pacientes con serología positiva para Chagas (+), un pool de suero negativo para el Chagas (-) y un anticuerpo contra HSP70 (HSP), en ese orden (de izquierda a derecha) respectivamente. Tabla 6.- (B) Pesos moleculares y densidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-HSP70 y Pool de sueros positivos para chagas respectivamente.

**Purificación parcial de HSP70** para el aislamiento de la fracción correspondiente con la proteína de choque térmico de 70 KDa, se escogió la condición de 4 horas de escasez de nutrientes, la densitometría demostró que el pico de la banda reconocida por los anticuerpos anti-HSP70 fue mayor que en el resto de las condiciones, una vez establecida la condición experimental, se procedió a la purificación parcial de la HSP70, tal y como se describió en materiales y métodos.

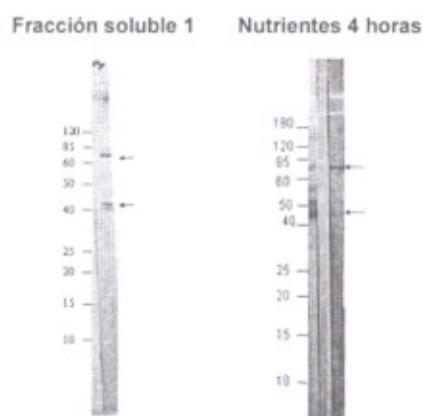


**Figura 7.** Immunoblot de la fracción soluble S1 obtenida del lizado de *Trypanosoma cruzi* ultracentrifugado bajo la condición de estrés de nutrientes en un tiempo de 4 horas que se enfrentó contra anti-HSP70; se puede apreciar el perfil de bandas que corresponden a epítopes compartidos con HSP70 que tienen distintos pesos moleculares, comparado con el immunoblot de los lizados de *T. cruzi*, sin purificar bajo las mismas condiciones experimentales.

Una vez obtenido el sobrenadante 1, se evaluó mediante el método de immunoblot con los anticuerpos anti-HSP70, los resultados obtenidos evidenciaron bandas de reconocimiento intensa lo que indicó que la proteína estaba presente en concentraciones elevadas (Figura 7).

## Discusión

Tomando en cuenta la importancia que ha adquirido la enfermedad de Chagas, tanto en América Latina como en Venezuela, por ser un problema de salud pública que afecta principalmente a individuos de zonas rurales y de bajo estrato socioeconómico, se han venido estudiando diversas moléculas de *T. cruzi*, entre las cuales encontramos las HSP70, así, se describió esta proteína como antígeno dominante en el parásito (9), y como molécula adyuvante al inducir estimulación de células dendríticas al ser aplicada ligada a un péptido (7). Según el planteamiento de estos autores, la HSP70 de *T. cruzi*, posee las características necesarias para ser usadas como moléculas para inmunoterapia y/o inmunoprolifaxis. Este trabajo se orienta a la evaluación de distintas condiciones de estrés,

con la finalidad de aumentar la expresión de HSP y determinar la condición más adecuada, para un aislamiento más eficiente de dichas proteínas.

Los resultados obtenidos sugieren que las variaciones en el entorno del parásito hacen que este modifique de alguna manera su perfil proteico ya sea por aumento o disminución de cierto grupos de proteínas, y se sugiere que dentro de las que se sintetizan de novo se encuentran las HSP70. Además, al evaluar el perfil de reconocimiento de los lizados de *T. cruzi*, con anticuerpos anti-HSP70, se evidenció reconocimiento en la zona de peso molecular esperada (80 – 70 KDa), y una banda de menor peso molecular aproximadamente 30 KDa. En este sentido se ha reportado por análisis proteómico del parásito la presencia de péptidos ubicados en un rango de pesos moleculares de 25 a 30 KDa en electroforesis de 2 dimensiones, que fueron identificados como HSP70, por análisis de secuencia peptídica (Parodi y col. 2004); lo cual sugiere que estos péptidos pueden ser de nueva síntesis o de recambio. También encontramos que el pool de sueros positivos reconoce bandas en la zona de peso molecular de la HSP70, lo cual ha sido reportado previamente, en trabajos que describen la HSP70 de *T. cruzi*, como antígeno dominante durante la infección (Marañón 2001).

## Referencias

1. WHO Technical Report Series. Control of Chagas' diseases. 2002.
2. Añez N, Crisarte G, Rojas A, Díaz N, Añez R, Carrasco H, et al. La Cara Oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Volumen XLIII. Número 2003:2: 45-57.
3. Rodríguez G, Caro A. Apuntes Científicos Uniandinos. Universidad de Cali, Colombia. 2002.
4. Craig E, Weissman J and Horwich A. Heat Shock Proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell. 1994;78, 365-372.
5. Srivastava P. Roles of Heat-Shock Proteins in Innate and Adaptive Immunity. Nature Reviews Immunology 2002;2, 185-194.
6. Wang HH, Mao CY, Teng LS, Cao J. Recent advances in heat shock protein-based cancer vaccines. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. Feb; 2006;5(1):22-7.
7. Planelles L, Thomas C, Alonso C y Lopez M. 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. 2001;p. 6558–6563 Vol. 69, No. 10.
8. Srivastava P. Therapeutic cancer vaccines. Curr Opin Immunol. Apr; 2006;18(2):201-5.
9. Marañón C, Thomas M, Patarroyo M and Lopez M. Identificación de epítopes T citotóxicos restringidos a la molécula de HLA-A2 en la proteína HSP70 de *T. cruzi*. Ars Pharmaceutica. 2001;42:1: 67-80.
10. Lindquist S and Craig E. The heat shock proteins. Annu Rev Genet 1998;22, 631-677.

11. Morimoto R. Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998;12, 3788-3796.
12. Kaufmann S and Schoel B. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* 1994;495- 531.
13. Sebastian EB, Graefe Martina Wiesigil, Iris Gaworski, Andrea Macdonald, and Joachim Clos. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Eukaryotic cell*. 2002;936-943.
14. Requena JM, Soto M, Guzman F, Mackelt A, Noya O, Patarroyo ME et al. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol Immunol* 1993;30(12): 1115-1121.
15. Hiroshi B, Tatsuya Sakurai, Noboru Inoue, Chihiro Sugimoto, and Ikuo Igarashi. Cloning and Expression of Mitochondrial Heat Shock Protein 70 of *Trypanosoma congolense* and Potential Use as a Diagnostic Antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.2003;Vol 10 N° 5: 926-993.
- 16.- Matsutake T & Srivastava PK. CD91 is involved in MHC class II presentation of gp96-chaperoned peptides. *Cell Stress Chaperones* 2000;5, 378.
17. Castellino F. *et al.* Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med*. 2000;191, 1957-1964.
18. Basu, S, Binder RJ, Ramalingam T & Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001;14, 303-313.