

LAS HISTONAS DE *LEISHMANIA*

LEISHMANIA HISTONES

Laura Ramírez¹, Salvador Iborra², Camila Indiani de Oliveira³, Marcia Weber³, Daniel R. Abánades¹, Victor M. González⁴, Laura Corvo¹, Carlos G. Nieto⁵, Carlos Alonso¹, Pedro Bonay¹, Aldina Barral³, Manoel Barral-Netto³, Manuel Soto¹

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, (CSIC-UAM). Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España; ²Unidad de Inmunología Viral, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España; ³Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/CPqGM - Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ; ⁴Departamento de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España; ⁵Departamento de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

Los genes que codifican para las diferentes histonas de *Leishmania* han sido caracterizados en la última década del siglo XX. En este artículo de revisión describimos los principales aspectos relacionados con la organización génica y la expresión regulada durante el ciclo celular de los genes codificantes para las histonas de *Leishmania*. En este trabajo también hemos revisado los datos relacionados con la antigenicidad y la inmunogenicidad de las histonas del parásito durante la infección natural de diferentes especies de *Leishmania* en humanos y perros. Se discuten los principales aspectos de la respuesta inmunitaria generada contra las histonas del parásito. Finalmente, hemos analizado los resultados obtenidos cuando estos antígenos parasitarios fueron empleados como moléculas profilácticas contra la infección del parásito en diferentes modelos de leishmaniosis cutánea y visceral.

Palabras-clave: *Leishmania*, genes, expresión, histonas, antígenos, diagnóstico, vacunas.

In the last decade of the XXth century the genes coding for different Leishmania histones have been characterized. In this review article we describe the main aspects related with the gene organization and the cell cycle regulated expression of Leishmania histone coding genes. In this work we have also reviewed the data related to the antigenicity and immunogenicity of the parasite histones during natural infection with different Leishmania species in humans and dogs. The main aspects of the immune response elicited against parasite histones are discussed. Finally, we have analyzed the results obtained when these parasite antigens were employed as prophylactic molecules against parasite infection in different models of cutaneous and visceral leishmaniasis.

Key words: *Leishmania*, genes, expression, histones, antigens, diagnosis, vaccines.

Las histonas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular y alto contenido en lisina y arginina, que se asocian al ADN de todas las células eucariotas para formar la cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, constituido por la interacción entre la fibra de ADN y un núcleo proteico formado por la agrupación de dos copias de cada una de las histonas nucleosomales (H2A, H2B, H3 y H4) (Luger *et al.*, 1997). Este complejo nucleoproteico se repite a lo largo del material genético formando una fibra de 11 nm que constituye la unidad básica de organización de los cromosomas eucariotas. Existe una quinta histona, denominada H1, que interacciona con el ADN localizado entre los diferentes nucleosomas compactando el material genético a una estructura conocida como fibra de 30 nm. Una característica común a las histonas es el elevado grado de conservación en su estructura primaria que permite preservar la función de estas proteínas a lo largo de la escala evolutiva de los eucariotas Thatcher; Gorovsky, 1994;

Wells, 1986). Esta conservación es muy marcada en las histonas H3 y H4 mientras que la H2A, H2B y especialmente la histona H1 pueden presentar ligeras variaciones en secuencia (Malik; Henikoff, 2003).

La caracterización de los genes codificantes para las histonas de los tripanosomátidos ha puesto de manifiesto la existencia de un alto grado de variabilidad en la secuencia de las histonas de estos protozoos en relación a las histonas de eucariotas superiores (Galanti *et al.*, 1998). Las diferencias observadas parecen estar relacionadas con las peculiares características de la cromatina de los kinetoplastidos ya que, aunque su material genético se encuentra estructurado en nucleosomas, su cromatina no experimenta procesos de condensación en ninguna etapa de su ciclo celular (Solari, 1995). La débil interacción entre el ADN y el nucleosoma provocada por el menor grado de hidrofobicidad de sus histonas H3 y H4 (Bender; Betschart; Hecker, 1992; Bender *et al.*, 1991) junto al menor tamaño su histona H1 (Espinza *et al.*, 1996), hace imposible la compactación de la cromatina para formar la fibra de 30 nm y estructuras superiores.

Organización y regulación de la expresión de los genes de histonas en *Leishmania*

En el año 1991 se publicó por primera vez la secuencia de los genes codificantes para la H2B de *Leishmania enriettii*,

Recebido em 16/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Dr. Manuel Soto. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, (CSIC-UAM). Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. Tel.: +34 91 1964508; fax +34 91 1964420. E-mail: msoto@cbm.uam.es (M. Soto).

Gazeta Médica da Bahia 2009;79 (Supl.3):129-133
© 2009 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

primera histona caracterizada en el género *Leishmania* (Genske *et al.*, 1991). En la actualidad se han caracterizado los genes codificantes para el resto de las histonas en diferentes especies de *Leishmania* (Alzate *et al.*, 2006; Belli *et al.*, 1999; Lukes; Maslov, 2000; Padilla *et al.*, 2002; Papageorgiou; Soteriadou, 2002; Soto *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1996a) Como ocurre en otras familias génicas de este parásito, existen diferentes copias de los genes codificantes para cada una de las histonas. Se encuentran formando agrupaciones independientes compuestas por un número limitado de copias organizadas en tándem (entre 2 y 3 copias). Estas agrupaciones génicas se encuentran dispersas en el genoma, localizándose incluso en diferentes cromosomas (Wincker *et al.*, 1996). Esta disposición, semejante a la descrita para otros eucariotas inferiores, se diferencia de la que tiene lugar en eucariotas superiores donde los genes de las diferentes histonas están asociados en las mismas regiones del genoma, facilitando así su expresión coordinada en la fase S del ciclo celular (Hentschel; Birnstiel, 1981; Maxson *et al.*, 1983).

El análisis de la secuencia de los genes caracterizados, ha puesto de manifiesto un elevado grado de conservación entre las regiones codificantes de las diferentes copias génicas de cada histona. Sin embargo, existen pequeñas diferencias de secuencia que generan diferentes isoformas de cada una de las histonas, proteínas que varían entre sí en un número limitado de aminoácidos. Por otra parte, el análisis comparativo entre las histonas de *Leishmania* y las histonas de otros eucariotas ha revelado la existencia de importantes diferencias, localizadas fundamentalmente en las regiones amino y carboxilo terminales, dominios proteicos que quedan expuestos hacia el exterior de los nucleosomas (Luger *et al.*, 1997). Aun existiendo diferencias, se ha detectado un mayor grado de conservación en las zonas globulares implicadas en las interacciones que estabilizan el nucleosoma entre las histonas de *Leishmania* y las de otros eucariotas. La divergencia alcanza su punto máximo en el caso de la histona H1. Esta proteína carece del dominio globular necesario para la compactación de la cromatina (Aslund *et al.*, 1994; Fasel *et al.*, 1993), y únicamente presenta similitud con el extremo carboxilo terminal de la H1 de eucariotas superiores (Galanti *et al.*, 1998).

La conservación de secuencia en las regiones codificantes de cada una de las histonas contrasta con la divergencia existente entre las regiones 5' y 3' no traducidas (UTRs). Como ejemplo, en los seis genes codificantes para la histona H2A de *L. infantum* se pueden encontrar diferentes combinaciones de tres regiones 5' UTRs y tres regiones 3' UTRs (Soto *et al.*, 2003). Además, estas regiones son distintas a las regiones UTRs de los genes codificantes para el resto de las histonas, que a su vez son divergentes entre sí. Estas diferencias pueden afectar tanto al número de copias de ARN mensajero (ARNm) presentes en el citosol del parásito, como al tamaño de los mismos, habiéndose detectado mensajeros de diferentes tamaños para las histonas H3 y H4 de *L. infantum* (Soto *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1996a). Pese a estas diferencias, todos los

tránscritos de los genes codificantes para las histonas de *Leishmania* descritos hasta el momento están poliadenilados (Galanti *et al.*, 1998), como ocurre en los ARNm de las histonas H3 y H4 de plantas, en los tránscritos de histonas en levaduras y en las variantes de histonas de expresión disociada con el ciclo celular de eucariotas superiores (Zhao; Hyman; Moore, 1999).

Los mecanismos que regulan la expresión de los genes de histonas en *Leishmania* están siendo estudiados en la actualidad. Es destacable señalar que parece existir una relación entre la expresión de los genes de histonas y la infectividad del parásito. Este aspecto ha sido estudiado fundamentalmente en la histona H1. La sobre-expresión de esta proteína en promastigotes recombinantes de *L. major* provoca un retraso en la progresión del ciclo celular (Smirlis *et al.*, 2006) que reduce su infectividad *in vitro* (Papageorgiou; Soteriadou, 2002) e *in vivo* (Smirlis *et al.*, 2006). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la regulación de las histonas del parásito a lo largo del ciclo celular. Como ocurre en el resto de eucariotas, la expresión de los genes de las histonas de *Leishmania* está asociada a la síntesis del ADN, produciéndose fundamentalmente durante la fase S del ciclo celular. Sin embargo, el mecanismo que controla esta expresión difiere de los descritos para otros organismos eucariotas, incluyendo al resto de los kinetoplastidos. Así, en *Leishmania* no se han detectado variaciones significativas en el nivel de los ARNm a lo largo del ciclo celular (Soto *et al.*, 2000), mientras que en eucariotas superiores e inferiores (Osley, 1991) y en parásitos del género *Trypanosoma* (Ersfeld *et al.*, 1996; Garcia-Salcedo; Gijon; Pays, 1999; Sabaj *et al.*, 2001) estos mensajeros sólo se encuentran presentes en la fase S. El inicio de la transcripción controlada por promotores que se activan al final de la fase G₁ y comienzo de la fase S, así como el correcto procesamiento de los tránscritos y la estabilización de los ARNm de histonas son los principales mecanismos que, actuando conjuntamente, restringen la presencia de los ARNm en la fase del ciclo donde se duplica el material genético (Marzluff; Duronio, 2002; Osley, 1991). En *Leishmania* esta expresión dependiente de ciclo celular es regulada fundamentalmente a nivel traduccional (Soto *et al.*, 2000), ya que los ARNm de las histonas nucleosomales del parásito sólo se asocian con los ribosomas en la fase S del ciclo celular (Soto *et al.*, 2004). Existe un modelo que postula la existencia de factores proteicos que modulan la traducción de los ARNm al interactuar con un pequeño elemento de secuencia que está presente en la región 3' UTR de todos los genes de histonas de *Leishmania* (Haralambous; Smirlis; Soteriadou, 2005).

Antigenicidad e inmunogenicidad de las histonas de *Leishmania*

Las histonas de *Leishmania* son moléculas reconocidas por el sistema inmunitario de los pacientes afectados de leishmaniosis. Existen numerosas evidencias que señalan a estas moléculas como diana de las respuestas humorales

generadas durante la infección. En el suero de pacientes con leishmaniosis visceral (LV) se han detectado anticuerpos contra las histonas H2B y H2A (Passos *et al.*, 2005; Maalej *et al.*, 2003) y las histonas H2B y H1 son reconocidas por pacientes con leishmaniosis cutánea (LC) y mucocutánea (LMC) (Carmelo *et al.*, 2006; Montoya *et al.*, 1997). La antigenicidad de las histonas también se ha demostrado en la leishmaniosis canina. Así, las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *Leishmania* son antígenos reconocidos por sueros de perros que padecen leishmaniosis visceral (LV) (Soto *et al.*, 1999). Todos estos trabajos indican que estas proteínas de localización nuclear son reconocidas por el sistema inmunológico del hospedador vertebrado tras la infección natural con el parásito. Por otra parte, y empleando modelos de leishmaniosis experimentales, se ha reforzado la idea de que estas proteínas son antígenos inmunodominantes del parásito ya que se han detectado anticuerpos anti-histonas en el suero de hámsteres (Requena *et al.*, 2000b) y perros (Nieto *et al.*, 1999) infectados experimentalmente con *L. infantum*, y de ratones infectados con *L. major* (Iborra *et al.*, 2004). Estas respuestas humorales pueden relacionarse con la patología asociada con algunas de las formas de leishmaniosis, fundamentalmente por la formación de inmunocomplejos que pueden asociarse con la generación de daños tisulares (Ginel; Camacho; Lucena, 2008) así como por la producción de interleuquina-10 (IL-10), linfoquina asociada con la inactivación de respuestas celulares (Miles *et al.*, 2005). Es destacable señalar que pese al carácter conservado de estas proteínas, la respuesta humoral generada contra ellas es específica de las histonas del parásito, no existiendo reactividad cruzada con las histonas del hospedador (Requena; Alonso; Soto, 2000a). Como se muestra en la Figura 1A los sueros de perros afectados de LV reconocen a las histonas en extractos nucleares del parásito sin mostrar reconocimiento frente a las histonas de eucariotas superiores. Esta especificidad es debida a que la localización de los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos de los perros enfermos, coincide con las regiones menos conservadas de estas proteínas en relación a las histonas del hospedador (Soto *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 1996b; Soto *et al.*, 1999). Estas regiones se localizan en el extremo amino terminal de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y en el extremo carboxilo terminal de la H2A (Figura 1B).

Por otra parte, también se ha demostrado que las histonas de *Leishmania* son capaces de generar respuestas celulares asociadas con protección durante la infección. Así, la histona H2B es capaz de inducir la proliferación y la secreción de interferón- γ (IFN- γ) *in vitro* en ensayos de estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con LC, o un clon de células T obtenido a partir de un individuo inmune frente a la LV (De Carvalho *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 2001). También, la estimulación en cultivo de PBMC de pacientes con LC empleando una versión recombinante de la histona H3 es capaz de generar niveles detectables de IFN- γ (De Carvalho *et al.*, 2003).

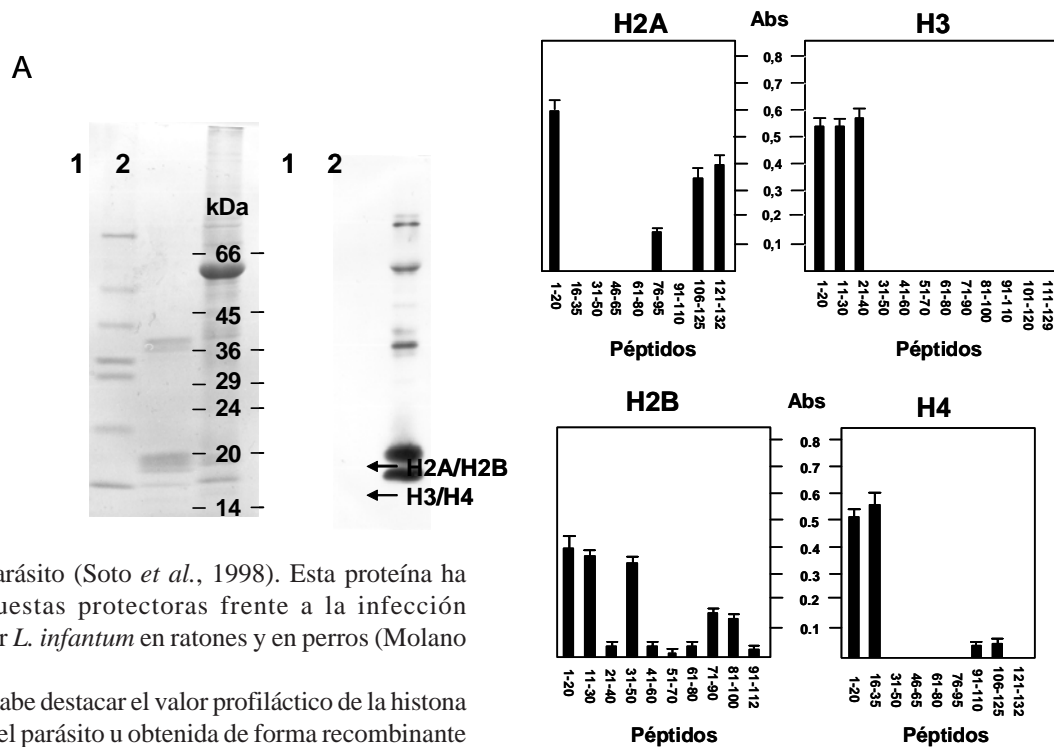
Empleo de las histonas de *Leishmania* para el desarrollo de vacunas

Teniendo en cuenta las características inmunogénicas de las histonas de *Leishmania*, estas proteínas pueden considerarse como moléculas candidatas para la generación de vacunas contra este parásito. Se ha analizado el papel profiláctico de la inmunización de estos antígenos en diferentes modelos de infección experimental. En la mayoría de los ensayos se han empleado estrategias diseñadas para la redirección de las respuestas mediadas por linfocitos CD4⁺ Th2 (generadoras de anticuerpos anti-histonas durante la infección) hacia la producción de respuestas celulares protectoras mediadas por linfocitos CD4⁺ Th1.

Con este objetivo se han utilizado vacunas de ADN desnudo basadas en plásmidos de expresión eucariota. Estas vacunas inducen respuestas mediadas por linfocitos CD4⁺ Th1 secretoras de IFN- γ y respuestas citotóxicas (Gurunathan; Klinman; Seder, 2000). Así, la inmunización de las cuatro histonas nucleosomales en forma de vacuna de ADN ha demostrado proteger a ratones susceptibles (BALB/c) de la infección con *L. major* (Iborra *et al.*, 2004). La protección se correlacionó con la generación de respuestas CD4⁺ Th1 específicas hacia las histonas de *Leishmania* que se asociaron con una disminución de las respuestas humorales hacia el resto de las proteínas del parásito. Una estrategia similar, empleando vacunas de ADN codificantes para las histonas H2B, H3 y H4 es capaz de generar una protección parcial contra la infección de especies viscerotrópicas (*L. donovani*) (Melby *et al.*, 2000). El empleo de estas vacunas de ADN basadas en las histonas se están ensayando en modelos de infección experimental con otras especies de *Leishmania* habiéndose obtenido resultados prometedores (Carneiro *et al.*, comunicación personal). Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad de las vacunas genéticas se han inmunizado ratones con células dendríticas estimuladas con las cuatro histonas nucleosomales expresadas como proteínas recombinantes y oligodesoxirribonucleótidos con motivos CpG no metilados (CpG-ODN), moléculas de ADN monocatenario que son capaces de suprimir respuestas mediadas por linfocitos CD4⁺ Th2 (Rhee *et al.*, 2002). Estas vacunas han generado protección frente al desarrollo de la LC y LV en el modelo ratón (Carrion; Folgueira; Alonso, 2008; Carrion *et al.*, 2007).

A pesar de que en ninguno de los ensayos anteriores se ha detectado la generación de respuestas frente a las histonas del hospedador, se han realizado ensayos en los que se emplean como vacunas los fragmentos de las histonas que presentan una mayor divergencia de secuencia respecto a las histonas de eucariotas superiores. Así, la inmunización del extremo amino terminal divergente de la histona H2B induce un efecto protector frente a la LC provocada por la infección de *L. major* en el ratón (Chenik *et al.*, 2006). Por otra parte, las regiones variables de la histona H2A (extremos amino y carboxilo terminales) ha sido empleadas como vacuna formando una proteína recombinante quimérica junto a otros

Figura 1. Especificidad en el reconocimiento de las histonas de *Leishmania* por los sueros de perros con leishmaniosis visceral. (A) Un extracto comercial de histonas de ternera (5 µgr; línea 1) y 10 µgr de proteínas nucleares de *L. infantum* (línea 2) se resolvieron en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 15%. En el panel de la izquierda se muestra el gel teñido con azul de Coomassie. En el panel de la derecha se muestra el resultado de incubar un filtro de nitrocelulosa donde se transfirió un gel similar, con un grupo de sueros de leishmaniosis visceral canina. Se indica en la figura la posición de las histonas del parásito. (B) Análisis de la reactividad de los mismos sueros frente a péptidos sintetizados a partir de la secuencia deducida de cada una de las histonas formadoras del nucleosoma H2A. Los sueros se analizaron individualmente mediante la técnica de ELISA a una dilución de 1/100.



antígenos del parásito (Soto *et al.*, 1998). Esta proteína ha generado respuestas protectoras frente a la infección experimental por *L. infantum* en ratones y en perros (Molano *et al.*, 2003).

Finalmente cabe destacar el valor profiláctico de la histona H1, purificada del parásito u obtenida de forma recombinante en modelos experimentales de LC en el ratón (Solioz *et al.*, 1999) y en primates infectados con *L. major* junto a extractos proteicos de la glándula salivar del vector transmisor, modelo de infección que resulta más parecido a la infección natural (Masina *et al.*, 2003).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos PHB2006-0006-PC del Ministerio de Educación y Ciencia, A/016407/08 de la AECID, 207RT0308 from CYTED y ISCIII-RETIC RD06/0021/0008-FEDER y FIS/PI080101 de Ministerio de Ciencia e Innovación y por un Proyecto Institucional de la Fundación Ramón Areces. Aldina Barral, Camila Oliveira y Manoel Barral-Netto son investigadores de CNPq.

Referencias

- Alzate JF. *et al.* *Leishmania (Viannia) panamensis*: cloning of the histone H1 genes by representational difference analysis. *Exp Par* 112: 126-129, 2006.
- Aslund L. *et al.* A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 65:317-330, 1994.
- Belli S. *et al.* *Leishmania major*: histone H1 gene expression from the sw3 locus. *Exp Parasitol*, 91:151-160, 1999.
- Bender K, Betschart B, Hecker H. Histone-DNA interactions in the chromatin of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol Res* 78:495-500, 1992.
- Bender K. *et al.* Biochemical properties of histone-like proteins of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Trop* 50:169-183, 1991.
- Carmelo E. *et al.* The sera from individuals suffering from cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* present antibodies against parasitic conserved proteins, but not their human counterparts. *Parasite* 13:231-236, 2006.
- Carrion J, Folgueira C, Alonso C. Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. *Vaccine* 26:2537-2544, 2008.
- Carrion J. *et al.* Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Microbes Inf* 9:735-743, 2007.
- Chenik M. *et al.* Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. *Vaccine* 24: 2521-2529, 2006.
- De Carvalho LP. *et al.* Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5:7-12, 2003.
- Ersfeld K. *et al.* A fluorescence in situ hybridisation study of the regulation of histone mRNA levels during the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Par* 81: 201-209, 1996.

12. Espinoza I. *et al.* Histone H1 and core histones in *Leishmania* and *Crithidia*: comparison with *Trypanosoma*. *Exp Cell Res* 224:1-7, 1996.
13. Fasel NJ. *et al.* Identification of a histone H1-like gene expressed in *Leishmania major*. *Mol Biochem Par* 62:321-323, 1993.
14. Galanti N. *et al.* Histone genes in trypanosomatids. *Par Today* 14:64-70, 1998.
15. Garcia-Salcedo JA, Gijon P, Pays E. Regulated transcription of the histone H2B genes of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 264:717-723, 1999.
16. Genske JE. *et al.* Structure and regulation of histone H2B mRNAs from *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol* 11:240-249, 1991.
17. Ginel PJ, Camacho S, Lucena R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. *Res Vet Sci* 85:510-514, 2008.
18. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 18:927-974, 2000.
19. Haralambous C, Smirilis D, Soteriadou K. Evidence of the presence of cis-regulating elements in the 3' UTRs of histone genes and of protein(s) interacting with this element. Third World Congress on Leishmaniasis, Sicily, Italy, 2005.
20. Hentschel CC, Birinstel ML. The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25:301-313, 1981.
21. Ihora S. *et al.* Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 22:3865-3876, 2004.
22. Luger K. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260, 1997.
23. Lukes J, Maslov DA. Unexpectedly high variability of the histone H4 gene in *Leishmania*. *Par Res* 86:259-261, 2000.
24. Maalej IA. *et al.* Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68:312-320, 2003.
25. Malik HS, Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10:882-891, 2003.
26. Marzluff WF, Duronio RJ. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr Opin Cell Biol* 14:692-699, 2002.
27. Masina, S., M, M.G, Demotz, S.O. and Fasel, N.J. (2003) Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *J Inf Dis* 188: 1250-1257.
28. Maxson R. *et al.* Expression and organization of histone genes. *Annu Rev Genet* 17: 239-277, 1983.
29. Melby PC. *et al.* Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* 68:5595-5602, 2000.
30. Miles SA. *et al.* A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201:747-754, 2005.
31. Molano I, Alonso MG, Miron C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG, Alonso C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 92:1-13, 2003.
32. Montoya Y. *et al.* Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91:674-676, 1997.
33. Nieto CG. *et al.* Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67:117-130, 1999.
34. Osley MA. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem* 60:827-861, 1991.
35. Padilla C. *et al.* Genes coding structural proteins in the *Leishmania braziliensis* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:S49-54, 2002.
36. Papageorgiou FT, Soteriadou KP. Expression of a novel *Leishmania* gene encoding a histone H1-like protein in *Leishmania major* modulates parasite infectivity *in vitro*. *Infect Immun* 70:6976-6986, 2002.
37. Passos S. *et al.* Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:1164-1167, 2005.
38. Probst P. *et al.* Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol* 166:498-505, 2001.
39. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 16:246-250, 2000a).
40. Requena JM. *et al.* Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76:269-281, 2000b.
41. Rhee EG. *et al.* Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 195:1565-1573, 2002.
42. Sabaj V. *et al.* Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem* 80:617-624, 2001.
43. Smirilis D. *et al.* *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity *in vivo*. *Mol Microbiol* 60:1457-1473, 2006.
44. Solari AJ. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell* 19:65-84, 1995.
45. Solioz N. *et al.* The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 18:850-859, 1999.
46. Soto M. *et al.* Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* 379: 617-625, 2004.
47. Soto M. *et al.* Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol* 90:439-447, 1997.
48. Soto M. *et al.* Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control. *Biochem J* 346:99-105, 2000.
49. Soto M. *et al.* *Leishmania infantum* possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. *Parasitology* 127:95-105, 2003.
50. Soto M. *et al.* Organization, transcription and regulation of the *Leishmania infantum* histone H3 genes. *Biochem J* 318: 813-819, 1996a.
51. Soto M. *et al.* Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36:58-63, 1998.
52. Soto M. *et al.* Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett*, 48:209-214, 1995.
53. Soto M. *et al.* Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 106:454-461, 1996b.
54. Soto M. *et al.* Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 115: 342-349, 1999.
55. Thatcher TH, Gorovsky MA. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22:174-179, 1994.
56. Wells DE. Compilation analysis of histones and histone genes. *Nucleic Acids Res* 14: r119-r149, 1986.
57. Wincker P. *et al.* The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24:1688-1694, 1996.
58. Zhao J, Hyman L, Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445, 1999.