

11261
7
2e)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EL CANDIDATO A VACUNA *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63, QUE
EXPRESA LA PROTEINA PRINCIPAL DEL PROMASTIGOTE (GP63) DE
Leishmania mexicana, INDUCE RESPUESTA CELULAR PROTECTORA DE
TIPO Th1.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

-INMUNOLOGIA-

PRESENTA LA ALUMNA

SARA HUERTA YEPEZ

ASESOR: DR. CESAR R. GONZALEZ BONILLA

MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. César Raúl González Bonilla.

CONTENIDO.

RESUMEN	4
I. ANTECEDENTES	5
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
III. OBJETIVOS	12
IV. HIPOTESIS	12
V. MATERIAL Y METODOS.	13
VI. RESULTADOS	18
VII. DISCUSION	21
VIII.REFERENCIAS.	29

RESUMEN

Se evaluó la respuesta inmune que induce el candidato a vacuna *Salmonella typhi* CVD908ΩGP63. Esta es una cepa atenuada dependiente de aminoácidos aromáticos que tiene integrado en el cromosoma, en el *locus arcC*, el gene que codifica para la forma madura de la proteína principal del promastigote (GP63) de *Leishmania mexicana*. Se demostró que esta cepa administrada por vía oral en ratones es capaz de inducir inmunidad protectora, la cual se asocia a la inducción de linfocitos T CD4⁺ Th1. Debido a que no se pudo demostrar la producción de anticuerpos contra GP63 y los esplenocitos provenientes de ratones inmunes se activan *in vitro* en presencia de promastigotes fijados con formalina, produciendo IL-2 e IFN γ , en contraste con ratones infectados con *Leishmania mexicana*, los cuales producen IL-4 e IL-10.

Por otro lado se demostró que la inmunización con *Salmonella typhi*-GP63 induce la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr utilizando como célula blanco al mastocitoma murino P815 transfectado con el gene que codifica para la GP63 de *Leishmania mexicana*. Esta observación es relevante pues prueba que antígenos particulados, generalmente procesados por la vía exógena, son capaces de alcanzar moléculas del MHC de clase I.

I. ANTECEDENTES

Generalidades sobre la Leishmaniasis.

Las leishmaniasis son enfermedades causadas por parásitos pertenecientes al género *Leishmania*. Son zoonosis de distribución cosmopolita que se presentan en forma endémica, preferentemente en países subdesarrollados de las zonas tropicales y subtropicales (1). Las leishmaniasis tienen un impacto directo sobre la salud y productividad de la población, afectan su economía y deterioran sus condiciones de vida. La población rural es la más afectada; se cree que medio millón de personas en nuestro país viven en áreas con riesgo de adquirir la enfermedad.

El parásito es transmitido por varias especies de insectos del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo. En México el principal agente etiológico es *Leishmania mexicana mexicana* (2). Las formas clínicas causadas por esta subespecie son: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicheros, la cual se caracteriza por una ulceración pequeña y única, indolora que tiende a curar de manera espontánea en un período de seis meses a dos años excepto cuando se localiza en orejas, donde es crónica y mutilante. Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), que se inicia por un nódulo que no se úlcera y se disemina por vía linfática, dando múltiples nódulos. Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia, que se presenta por metástasis del organismo a partir de una lesión primaria establecida anteriormente, presenta lesiones muy destructivas de mucosas nasal y orofaríngea, que no curan espontáneamente y resisten la quimioterapia (3). Otra forma clínica es la leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar, que es causada por *L. donovani* y *L. chagasi*, afecta principalmente a niños. En esta variedad, el parásito se disemina al hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos (4).

Ciclo biológico del parásito.

Leishmania es un parásito protozoario que presenta dos estadios en su ciclo biológico, el amastigote que tiene forma redonda u oval, es aflagelado, intracelular y sólo se observa en los tejidos de los vertebrados parasitados; y el promastigote, que se encuentra en el vector, es extracelular, carece de membrana ondulante y es flagelado. Ambas formas se reproducen por fisión binaria (4). Cuando un mosquito infectado pica al hombre, le inoecula promastigotes, estos quedan en el tejido y son atrapados por las células del sistema fagocítico mononuclear, dentro de estas células se transforman en amastigotes, se multiplican y rompen a las células que los contienen, quedan libres e invaden otras células, donde se reproducen nuevamente. Cuando el mosquito pica a un individuo infectado, al succionar sangre y líquido intersticial, transporta células del sistema fagocítico mononuclear circulantes que en

su interior tienen amastigotes. En el intestino del mosquito se rompen las células quedando libres los amastigotes, los cuales se transforman en promastigotes, se reproducen por fisión binaria, algunos de estos migran hacia la porción anterior del aparato digestivo y se localizan en la proboscide. Cuando el mosquito pica al hombre le inocular promastigotes volviendo a infectar células del sistema fagocítico mononuclear, cerrándose así el ciclo biológico (5).

Inmunidad contra *Leishmania*.

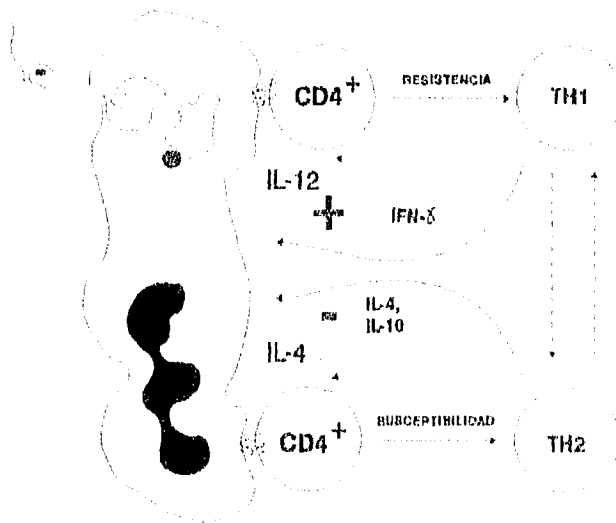
La infección por leishmania estimula tanto respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T, como respuesta inmune humoral, mediada por linfocitos B. La respuesta inmune celular es la principal responsable del control de la infección, pues existe una fuerte correlación entre la producción de IFN γ e IL-2 con la resistencia. La resistencia a la enfermedad en los humanos muestra una clara asociación con la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) positiva y la capacidad de los linfocitos T de sangre periférica para generar IFN γ cuando son estimulados *in vitro* con antígenos del parásito (6). En el caso de pacientes con una historia clínica de LCL que se han curado, la respuesta de células T a antígenos de *Leishmania* (*L. major*) se asocia a producción de grandes cantidades de IFN γ y poca o ninguna producción de IL-4 (7)

En niños con infección por *L. chagasi* la infección subclínica se caracteriza por una respuesta celular a antígenos de *Leishmania*, en la cual hay producción de IFN γ , mientras que los pacientes que presentan enfermedad progresiva tienen una débil respuesta de IFN γ . La resolución y curación de LV causada por *L. donovani*, también presenta correlación con la inmunidad mediada por células, producción de IFN γ y activación de macrófagos. Cuando la enfermedad progresa se asocia a deficiente respuesta inmune mediada por células, marcada hipergamaglobulinemia, causada por activación de células B, y altos niveles de IL-4. En estos pacientes las pruebas cutáneas de DTH son negativas y sus linfocitos no producen IFN γ *in vitro* al ser estimulados con antígenos de *Leishmania* (8).

La infección experimental del ratón constituye el mejor modelo para estudiar a la leishmaniasis ya que la enfermedad murina muestra gran similitud con las formas clínicas que presentan los humanos, incluyendo un amplio rango de susceptibilidad y capacidad para curar en diferentes cepas de ratones. La susceptibilidad a la infección por *Leishmania* en el ratón está controlada genéticamente por el locus *Lsh* (*Ity* o *Bcg*) el cual se localiza en el cromosoma 1. El gene de resistencia a *Mycobacterium* denominado *Bcg* (que se propone equivalente al *Lsh* y al *Ity*), ya fue clonado y secuenciado, este codifica para una proteína integral de membrana exclusiva de macrófagos denominada Nrampl (proteína de macrófagos asociada a

la resistencia natural) la cual posee 10 dominios transmembranales, dos sitios de glicosilación, dos de fosforilación, un sitio de unión a ATP, que resulta ser similar a una permeasa de nitrato de *Aspergillus nidulans*, *CnA*, lo que sugiere que puede estar involucrada en el transporte de intermediarios del NO del citosol hacia los fagolisosomas; donde el ambiente ácido convertiría a los nitratos en óxido nítrico de alta capacidad bactericida. Las cepas de ratón sensibles, *Lsh^{-/-}*, posiblemente posean defectos en Nramp lo que resulta en una disminución en su capacidad para eliminar al parásito (9).

En las cepas de ratones susceptibles (BALB/c) a la infección por leishmania los macrófagos no se activan eficientemente y probablemente no producen cantidades suficientes de IL-12, impidiendo la diferenciación de linfocitos CD4⁺ hacia el linaje Th1. Estas cepas susceptibles desarrollan una respuesta de linfocitos CD4⁺ Th2, la cual interfiere con la acción de las citocinas derivadas de células Th1 principalmente a través de la producción de IL-4. En contraste, el control de la infección en ratones resistentes, como C57BL/6, se asocia con el desarrollo de respuesta de linfocitos CD4⁺ Th1 que, mediante la producción de IFN γ , es capaz de promover la activación de macrófagos. El papel de otras células en el control de la infección no ha sido bien establecido, aunque las células citotóxicas deben tener alguna función, ésta es secundaria, pues los ratones "knock out", deficientes de β 2-microglobulina y por tanto de inmunidad mediada por células citotóxicas, no presentan un incremento en la susceptibilidad a la infección por el parásito (10,11)



Inmunidad contra la proteína principal del promastigote (GP63), de *Leishmania mexicana*.

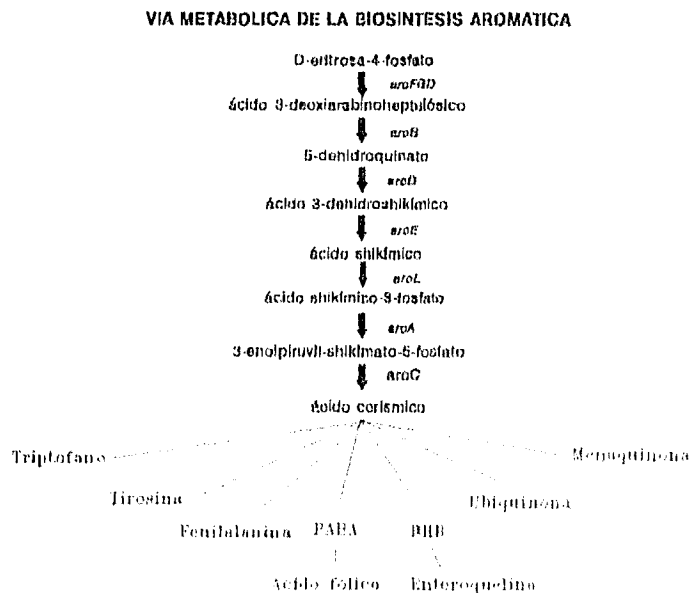
El parásito evade rápidamente la acción de los anticuerpos y el complemento al alcanzar un habitat intracelular. Se han relacionado dos importantes estructuras de leishmania con su patogenicidad, la lipofosfoglicana (LPG) y la proteína GP63 (12). La invasión de los promastigotes de *Leishmania* a macrófagos en ausencia de opsoninas séricas es mediada por GP63 y LPG que interactúan con los receptores CR3 y p150/95, en tanto que la fagocitosis mediada por complemento se ve favorecida por el hecho de que la forma metacíclica del parásito adhiere C3b sobre su superficie, permitiendo la unión al receptor CR1 (13). GP63 se expresa en grandes cantidades en la superficie del promastigote y es estable dentro del macrófago, lo cual sugiere que esta proteína actúa como factor de virulencia en la fase inicial de la infección. Debido a su actividad proteolítica es capaz de inactivar a las enzimas lisosomales. La GP63 de *L. major* y *L. donovani* es capaz de romper la molécula CD4 presente en linfocitos T (14). Por todo lo anterior GP63 es uno de los antígenos de *Leishmania* más estudiados. Se trata de una glicoproteína de membrana de 63 a 68 kDa, la cual es una endopeptidasa dependiente de zinc que tiene su mayor actividad a pH ácido y es inhibida por fenantrolina y metales pesados (15,16). Esta proteína se expresa como una proteasa de superficie que en el promastigote comprende cerca del 1% de la proteína celular y tiene una alta homología en todas las especies de *Leishmania* estudiadas. El cDNA de la GP63 de *Leishmania mexicana* se divide en tres clases: C1, C2 y C3; los genes de la isoforma C1 presentan una regulación selectiva en el estadio de amastigote y estos codifican para una proteína con un carboxilo terminal que carece de sitio de anclaje a la membrana (17). La glicoproteína se encuentra presente en los dos estadios del ciclo de vida del parásito, aunque en el amastigote su expresión es fundamentalmente citosólica (18,19,20). La GP63 es capaz de inducir respuesta inmune protectora, por lo cual es candidato a formar parte de una vacuna. En el modelo murino, se ha logrado inducir protección al administrar GP63 incluida en liposomas (21) y esta protección puede ser transferida a través de linfocitos T específicos a ratones susceptibles. Sin embargo, para lograr protección es necesaria la administración intravenosa o intraperitoneal de los liposomas y la proteína recombinante soluble ha dado resultados contradictorios (22). La inmunización de ratones con *Salmonella typhimurium* y BCG acarreando GP63 (23,24) induce inmunidad protectora dependiente de la activación de linfocitos CD4⁺ Th1. También ha sido posible proteger a ratones mediante la administración de DNA plasmídico conteniendo el gene que codifica para GP63 (25).

Salmonella como acarreador vivo de antígenos

Las cepas atenuadas de *Salmonella*, que acarrean determinantes antigénicos de otros organismos, son de gran interés como alternativa en el desarrollo de vacunas, pues la administración oral de *Salmonella* viva puede inducir respuesta inmune secretora, humoral y mediada por células contra *Salmonella* y contra los antígenos que acarrean y conferir protección en modelos animales. Para que estas cepas atenuadas de *Salmonella* puedan ser empleadas como acarreadores, se deben introducir genes foráneos que produzcan de manera estable la proteína recombinante, usualmente se utilizan plásmidos que confieren resistencia a antibióticos, facilitan su identificación y permiten la retención del plásmido por la bacteria. Sin embargo, aunque estos plásmidos se retienen de manera adecuada *in vitro*, son muy inestables *in vivo* cuando la bacteria se encuentra bajo la presión selectiva del antibiótico. Para resolver este problema se ha utilizado la integración del gene foráneo al cromosoma de la cepa acarreadora (26).

Salmonella typhi CVD908.

S. typhi CVD908 es una cepa derivada de *S. typhi* Ty2. En esta cepa se inactivaron por recombinación homóloga los genes *aroC* y *aroD* utilizando plásmidos suicidas. Estos genes codifican dos enzimas que intervienen en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y por tanto, es auxotrófica para estos compuestos (27).



La cepa es incapaz de replicarse en los tejidos de los mamíferos porque en ellos no encuentra los metabolitos necesarios para la vía biosintética de compuestos aromáticos. Esta cepa fue bien tolerada en voluntarios humanos sanos a dosis orales altas y estimuló respuesta inmune de tipo sistémica y de mucosas (26). *S. typhi* CVD908 ha sido utilizada como acarreador en varios sistemas experimentales. Una cepa que expresa gp120 de HIV-1 fue capaz de evocar anticuerpos contra el virus al ser administrada a ratones BALB/c (28). Se ha logrado que *S. typhi* CVD908 exprese de manera simultánea los factores de colonización CFA/I y CS3 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (29). *S. typhi* CVD908 fue empleada como acarreador de la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*. La administración oral de este candidato a vacuna en voluntarios humanos, dio como resultado una respuesta de anticuerpos a la CSP y, más importantemente, en algunos voluntarios se identificaron linfocitos T citotóxicos dirigidos contra la CSP. (30).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante la infección por *Leishmania*, el parásito alcanza rápidamente un habitat intracelular, escapando a la acción de los anticuerpos y del complemento. Invade fundamentalmente a las células del sistema fagocítico mononuclear inhibiendo los mecanismos oxidativos y no oxidativos del estallido respiratorio, permanece dentro de vesículas fagocíticas y no se ha reportado que los parásitos o sus productos ingresen al citosol de la célula infectada. Por tanto, el control de la infección depende de la inducción efectiva de los mecanismos de la inmunidad mediada por células, principalmente de la activación de los macrófagos, y no de la producción de anticuerpos. La dirección que sigue la respuesta inmune está determinada por las señales que dan las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T. Entre estas señales se encuentra la IL-4, que promueve la maduración de la rama efectora humoral. Si se produce IL-12, la respuesta se diferencia hacia la rama efectora celular. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ tienen un papel central en la regulación y polarización de la respuesta inmune. La maduración y diferenciación de los linfocitos B depende de los linfocitos T CD4⁺ Th2, que producen, entre otras interleucinas, IL-4 e IL-10; en tanto que los linfocitos T CD4⁺ Th1 producen IL-2 e IFN γ que promueven la activación de los macrófagos. Existen dos vías de procesamiento y presentación de antígenos proteicos. Los antígenos exógenos y los solubles son fagocitados, ingresan a la vía metabólica endosomal y los péptidos resultantes son presentados en la membrana celular en asociación a moléculas del MHC de clase II, por lo que son capaces de activar a células CD4⁺. Los antígenos sintetizados de manera endógena se procesan en el citosol, se transportan al retículo endoplásmico y se presentan en la membrana celular asociados a moléculas de clase I activando a células CD8⁺. Sin embargo, se ha demostrado que algunos péptidos generados en la vía endosomal, son regurgitados y son capaces de unirse a moléculas de clase I funcionalmente vacías en la superficie de las células presentadoras de antígeno y, por tanto, inducir la activación de linfocitos T CD8⁺. Por tanto, una vacuna efectiva contra la leishmaniasis deberá inducir una respuesta de tipo Th1, que caracterizada por la producción de IL-2 y IFN γ , active a los macrófagos para que a su vez puedan combatir eficientemente al parásito. Por otro lado, los fagocitos ya infectados, e imposibilitados para iniciar los procesos de estallido respiratorio, deben ser eliminados por linfocitos T CD8⁺. Consecuentemente, en el modelo murino, el candidato a vacuna *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63 deberá inducir linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ Th1 específicos contra GP63 de *Leishmania mexicana* como requisito para conferir protección contra la infección por *Leishmania mexicana*.

III. OBJETIVOS.

Objetivo general.

✓ Evaluar la respuesta inmune celular que induce la cepa atenuada de *Salmonella typhi* CVD908 que expresa GP63 de *Leishmania mexicana*.

Objetivos específicos.

✓ Investigar la presencia de linfocitos CD8⁺ en los ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63.

✓ Determinar el perfil de interleucinas que induce la inmunización de ratones con *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63.

IV. HIPOTESIS.

Considerando que *Salmonella typhi*, por el LPS que contiene, induce la producción de IL-12 la cual contribuye a la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia la subpoblación Th1, la cepa *Salmonella typhi* CVD908 que lleve integrado en su cromosoma el gene que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*, inducirá respuesta inmunológica de la rama efectora celular hacia la proteína recombinante, caracterizada por la producción de IL-2 e IFN γ , así como expansión de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. La inmunización de ratones con esta cepa deberá inducir protección al reto con *Leishmania mexicana*.

V. MATERIAL Y METODOS.

Cepas bacterianas.

Salmonella typhi CVD908. Donada por el CVD (26)

Salmonella typhi CVD908ΩMGP63. Construida en la UIMI en colaboración con el CVD (31)

Líneas celulares.

P815 (ATCC TIB 64) (mastocitoma de ratón), la cual se cultivó a partir de un tumor de ratón DBA/2 (H-2^d); se utilizó como una línea celular "blanco" para ensayos de citotoxicidad en células T.

P815CΩMGP63 construida en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (32). Esta línea celular murina que contiene el gene que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*, ya que fue transfectada con el plásmido pFM92.1-GP63 expresa de manera constitutiva dicha proteína.

Parásitos.

Leishmania mexicana mexicana MHOM/MX/88/HRCJS (33) donada por la Dra. Amalia Monroy, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México. Fue mantenida en medio RPMI (GIBCO) adicionado con glutamina, piruvato, suero fetal bovino 10% (GIBCO), β-mercaptoetanol y acidificado con HCl.

Animales de laboratorio.

Ratones BALB/c. Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Ratones FI(BALB/cXC57Bl/6), donados por el Dr. Luis Favila del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México (ENCB).

Obtención de extracto crudo de *Leishmania mexicana*.

El extracto crudo de *Leishmania* se obtuvo modificando el método de Bouvier (15) para la purificación de GP63. Un cultivo de *Leishmania mexicana* en fase logarítmica se cosechó por centrifugación y se lavó dos veces con un amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 7.4. Los parásitos fueron sometidos a sonicación y las membranas se colectaron por ultracentrifugación a 60,000 rpm por 45 minutos. La pastilla conteniendo las membranas se solubilizó con Tritón X-114 (34) a 4°C, finalmente fue sometida a un gradiente de sacarosa. La composición del antígeno se verificó por SDS-PAGE.

Producción de GP63 recombinante.

a) Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA).

Las bacterias *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908 Ω MGP63 se cultivaron en medio Luria (GIBCO) a 37°C toda la noche con agitación constante. Cada cultivo se cosechó por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min y se lavó dos veces con PBS. La pastilla bacteriana se resuspendió en PBS y se ajustó a 1×10^9 bacterias/ml y se procedió a romper empleando una prensa French. Después de romper la bacteria se eliminaron restos de bacteria por centrifugación. Se recuperó el sobrenadante y se determinó cantidad de proteína por el método de Lowry (35) y se ajustó a 1 mg/ml. El Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA) se realizó de acuerdo al método de Engvall (36). El sobrenadante obtenido después de lisar la bacteria fue empleado como antígeno para sensibilizar placas de microtitulación de 96 pozos. El antígeno se ajustó a diferentes concentraciones (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.312 μ g por pozo) con una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6. Las placas se incubaron 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó 4 veces con PBS-tween 20 al 0.1% y se adicionó a los pozos solución de bloqueo (PBS-leche al 5%) y se incubó 2 h a 37°C, se lavó 4 veces con PBS-tween. El suero de conejo se agregó por duplicado a cinco diluciones (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200) y se incubó 2 hrs a 37°C; después de 4 lavados con PBS-tween se agregó el suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (SIGMA) y se incubó durante 2 h a 37°C. Al término del tiempo de incubación, se lavó 8 veces con PBS-tween y después se agregó el sustrato ortofenilendiamina-H₂O₂ en solución de citratos pH 5.6, se incubó 10 min a temperatura ambiente en oscuridad, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5 N y se leyó la D.O. a 492 nm.

b) Inmunoelctrotransferencia.

Se crecieron las cepas *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908 Ω MGP63 en medio Luria toda la noche a 37°C con agitación constante. Se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm por 10 min. Se resuspendieron en medio nuevo y se continuó el crecimiento durante 30 min mas. Después del tiempo, se cosecharon y lavaron 2 veces con tris-HCl 0.01M pH 7.5. La pastilla se resuspendió en tris-HCl. Se leyó la D.O. a 540 nm para determinar el número de bacterias. Se tomaron 1×10^8 bacterias y se les adicionó el volumen necesario de amortiguador de corrimiento para llevar a un volumen final de 100 μ l.

Se corrió una muestra de extracto crudo de *L. mexicana* como control positivo la cual se preparo pesando 5 mg del extracto y se disolvió en 1ml de Tris, de esta solución se tomaron 20 μ l y se llevaron a 100 μ l con amortiguador de corrimiento. Se hirvió 20 min y se centrifugó 5 min. La electroforésis se realizó de acuerdo al

método descrito por Laemmli (37). Se preparó un gel de acrilamida al 11.5 %. Se corrieron 30 µl de las muestras preparadas de bacteria y extracto crudo de *L. mexicana*. Se hizo la transferencia a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin (38). El papel se bloqueó con PBS-leche 5%, 2 hr a 37°C. Se adicionó el suero de conejo en una dilución 1:1000 y se incubó 1 hr a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS y se adicionó el suero contra anticuerpos de conejo en una dilución 1:1000 en PBS, se incubó 1 hr a 37°C. Se lavó 8 veces con PBS y se reveló adicionando el substrato 4-cloro-alfa-naftol-H₂O₂ en PBS.

Esquemas de inmunización.

Se inmunizaron dos grupos de diez ratones, de aproximadamente 2 meses de edad, con las cepas *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΩMGP63 resuspendida en PBS. Diez minutos antes de administrar la bacteria se les administraron 100µl de bicarbonato de sodio y posteriormente se les dio 1X10⁸ bacterias en 100µl por vía oral, los días cero, siete y treinta y cinco.

Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación se realizaron de acuerdo al método descrito con anterioridad (39). Brevemente, se cultivaron 2 x 10⁶ células linfoides de bazo en pozos de placas de microcultivo de 96 pozos y fondo plano (NUNC) y se cultivaron en presencia de 2 x 10⁵ promatigotes de *L. mexicana* fijados con formaldehído. Como controles se incluyeron linfocitos cultivados con 50 µg/ml de Proteínas de membrana externa (OMPs) de *S. typhi* o 10 µg/ml de LPS. Después de tres días de cultivo a 37 °C y 5% CO₂, se adicionó 1 µCi de ³H-Timidina (Amersham, Int. Berkshire, England) y se extendió la incubación por 18 hrs. Las células se cosecharon en papel de fibra de vidrio y la incorporación del material radiactivo se evaluó en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 5801, Beckman, Ins. Stanford CA, USA). Los resultados se encuentran expresados en c.p.m.

Producción de IL-2.

Se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Bottombly (40)

Se obtuvieron las células de bazo de los ratones BALB/e inmunizados con la cepa *S. typhi* CVD908ΩMGP63, se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a 1x10⁶ células/100 µl en medio RPMI. En una placa de microcultivo se colocaron 100µl/pozo de células y se les adicionó 100µl de antígeno. Como antígeno se empleó extracto crudo de *L. mexicana* 100 µg/ml. La placa se incubó 24 hrs a 37°C, 5% CO₂. Se recuperaron 100 µl del sobrenadante para medir la producción de IL-2 por su capacidad de promover el crecimiento de la línea celular CTLL-2, que es dependiente de IL-2. En una placa de microcultivo se colocaron 1x10⁴ células CTLL-2/100 µl de medio RPMI por pozo y se pusieron en contacto con los sobrenadantes obtenidos. Se incubó 12 hrs a 37°C. Se adicionó 1 µCi de ³H-

Timidina/ pozo y se incubó 18 hrs. Se cosecharon las células y se midió la cantidad de timidina incorporada en un contador de centelleo líquido.

Detección de interleucinas mediante RT-PCR.

Se detectó RNA mensajero de IL-2, IL-10, IL-4 e IFN γ de acuerdo al método descrito con anterioridad (41). Brevemente, se obtuvieron células linfoides de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908 o *S. typhi* CVD908 Ω MGP63, o infectados con *L. mexicana* y se cultivaron 3×10^6 células/ml en frascos de cultivo de 50 ml (NUNC) por 2 días con 100 μ g/ml de un extracto crudo de *L. mexicana*. Las células viables se purificaron mediante un gradiente de Ficoll (SIGMA) y se lavaron dos veces con PBS estéril. Se extrajo RNA de 10^6 células utilizando un "kit" comercial (Trizol, GIBCO). Para sintetizar cDNA, aproximadamente 1 μ g de RNA se retrotranscribió utilizando M-MuLV transcriptasa (Lakeside) de acuerdo a las recomendaciones del productor utilizando una mezcla de hexámeros. Se amplificaron exónes conocidos para cada interleucina de acuerdo a las secuencias publicadas (42,43,44,45). Como control positivo se incluyeron "primers" de la 3-fosfatodeshidrogenasa (GAP) (41). Diez μ l de cada amplificación se sometió a electroforesis en agarosa al 2% (J.T. Baker) y los productos se analizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Ensayos de citotoxicidad.

Se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de Wunderlich (46)

a) Preparación de células efectoras.

Se obtuvieron las células de bazo de los ratones BALB/c inmunizados como se describió previamente. Se pusieron 30 millones de dichas células en 10 ml de medio DMEM suplementado con glutamina, piruvato, β -mercaptoetanol y suero fetal bovino (SFB) al 20%, en presencia de extracto crudo de *L. mexicana* 100 μ g/ml durante cinco días. Después de esto, las células fueron cosechadas a 1,200 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 5 ml de medio RPMI y se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron para tener 3×10^6 células/ml.

b) Preparación de células blanco.

Las células P815 y P815-MGP63 de un cultivo en fase logarítmica se cosecharon a 1,200 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS, se contaron y ajustaron a 1×10^6 células en 200 μ l de medio suplementado con SFB al 20%, se adicionaron 200 μ l de ^{51}Cr , equivalente a 200 μ Ci. Se incubó a 37°C durante 2 hr. Transcurrido el tiempo se lavaron dos veces con PBS, se contaron y ajustaron a 3×10^4 células/ml en medio RPMI.

c) Ensayo de liberación de cromo.

En una placa de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo se colocaron 100 µl de las suspensiones de células blanco en medio RPMI. A estas células se les adicionaron las células efectoras a diferentes diluciones quedando relaciones célula blanco:célula efectora de 1:100, 1:50, 1:25, 1:12.5, 1:6.25. Como testigo de liberación espontánea de cromo se prepararon pozos con 100 µl de medio RPMI y 100 µl de células blanco; como testigo de liberación máxima de cromo se prepararon pozos con 100 µl de células blanco y 100 µl de SDS al 20%. Las muestras se analizaron por triplicado.

Una vez que se preparó la placa con las células efectoras y blanco ésta se incubó durante 4 hrs 30 min a 37 C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Transcurrido el tiempo se cosecharon las muestras y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma.

Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad específica de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{cpm problema} - \text{cpm liberación espontánea}}{\text{cpm liberación máxima} - \text{cpm liberación espontánea}} \times 100$$

Ensayos de protección.

Para estos ensayos se utilizaron tres grupos de diez ratones F1 (BALB/cx57Bl/6). Y se realizaron tres experimentos independientes. Dos grupos fueron inmunizados con 1x10⁸ bacterias de las cepas *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΩMGP63 en 100µl de PBS. Al tercer grupo se le administró 100µl de PBS. A los siete y treinta y cinco días después de la primera dosis se les administró otra dosis similar. Después de la última dosis se dejó pasar una semana para después retarlos por inoculación en el cojinete plantar de 1x10⁶ promastigotes de *L. mexicana* en 30 µl de RPMI (47). La lesión fue medida con un calibrador durante 12 semanas, las mediciones se hicieron de manera ciega, al término del período de observación se rompió el código y se analizaron los resultados. Los resultados están expresados en diferencias en mm de la pata infectada en relación a la pata contralateral.

VI. RESULTADOS.

Evaluación de la expresión de la GP63 recombinante.

S. typhi CVD908ΩMGP63 es una cepa atenuada, mutante *aroC* *aroD*, que contiene integrado en su cromosoma el gene que codifica para la forma madura de GP63 de *L. mexicana*. Esta cepa fue construida en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología mediante métodos de ingeniería genética.

La capacidad de este candidato a vacuna para producir la GP63 recombinante se evaluó mediante ELISA e inmunoelectrotransferencia ("western blot"). Para ello, se cultivaron las cepas de *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΩMGP63 en medio Luria. Posteriormente fueron cosechadas y las bacterias se rompieron utilizando una prensa Frech. Se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Lowry y con estas se sensibilizaron placas de microcultivo con diferentes concentraciones del lisado bacteriano. La presencia de GP63 se determinó utilizando a diferentes diluciones del suero hiperinmune de conejo contra el extracto crudo de *L. mexicana*, la reacción fue revelada con un segundo anticuerpo de cabra anticonejo conjugado a peroxidasa. En la Figura 1A se muestra que cepa de *S. typhi* CVD908ΩMGP63 produce la proteína recombinante, pues las D.O son más altas. Es importante mencionar que el suero hiperinmune de conejo se adsorbió con un extracto crudo de *E. coli* con el propósito de disminuir el fondo producido por los anticuerpos que el suero de conejo reconoce, de manera cruzada en *S. typhi*. En la Figura 1B se muestra el resultado de un experimento en donde se verificó el tamaño de la proteína recombinante mediante "western blot", para lo cual se utilizó extracto crudo de *L. mexicana* como control positivo y compararon *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΩMGP63. Se observa que los anticuerpos de conejo identifican una banda proteica en la cepa que tiene la GP63 recombinante. Es necesario resaltar que las proteínas de *L. mexicana* se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras, en tanto que las proteínas bacterianas se corrieron en condiciones no reductoras, esto se debió a la diferencia de peso molecular esperado (menor a 63 KDa), a diferencia de las proteínas del extracto crudo del parásito, ya que la proteína recombinante no se encuentra glicosilada. No fue posible observar a la proteína recombinante por "western blot" cuando las proteínas bacterianas se corrieron en condiciones reductoras, lo que sugiere que la GP63 recombinante se desnaturaliza con facilidad. Sin embargo, es claro que existe producción de dicha proteína en la *S. typhi* acarreadora, por lo que se prosigió a evaluar su inmunogenicidad.

Respuesta inmune humoral inducida por *S. typhi* CVD908ΩMGP63.

Grupos de cinco ratones BALB/c fueron inmunizados con *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΩMGP63, 1×10^6 CFU fueron administradas por vía intraperitoneal o por vía oral 1×10^8 . La respuesta de anticuerpos contra LPS, OMPs (proteínas de membrana externa) y GP63 de *S. typhi* fue determinada por ELISA. La Figura 2A, muestra la respuesta a LPS en un grupo de ratones. Resultados similares se obtuvieron con los ratones que fueron inmunizados por vía oral. Se observó una alta respuesta de IgG anti-LPS detectada a los 20 días después de la primera inmunización. Sin embargo, en cuatro experimentos independientes donde se inmunizaron 20 ratones tanto por vía oral como por vía intraperitoneal con *S. typhi* CVD908ΩMGP63, no se logró detectar la presencia de anticuerpos contra GP63, excepto en un ratón inmunizado por vía intraperitoneal, resultados que se muestran en la Figura 2B.

Respuesta de linfocitos contra GP63.

Se cultivaron células de bazo purificadas de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908 o *S. typhi* CVD908ΩMGP63 con antígeno de *L. mexicana* o con OMPs aisladas de *S. typhi* Ty2. Ambas cepas inducen prácticamente idéntica respuesta linfoproliferativa para OMPs de *S. typhi*. Sin embargo, solo las células de bazo de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908ΩMGP63 fueron claramente activadas en presencia de promastigotes de *L. mexicana* fijados, Figura 3A. Para evaluar la producción de IL-2 inducida por la *S. typhi* CVD908ΩMGP63, se incubaron células de bazo de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908 y CVD908ΩMGP63 con extracto crudo de *L. mexicana* por 48 horas, se recuperó el sobrenadante y se analizó su capacidad para promover el crecimiento de la línea celular CTLL-2, al cual es dependiente de IL-2. Este ensayo se realizó evaluando la capacidad de la línea celular CTLL-2 para incorporar la ^3H -Timidina. Como controles se incluyeron sobrenadantes de linfocitos estimulados con concanavalina A y de la línea celular C63, la cual es productora de IL-2. La Figura 3B muestra los resultados de estos ensayos. Se observa que las células de bazo provenientes de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908ΩMGP63 produjeron IL-2 en respuesta al estímulo antigénico *in vitro* con extracto crudos de *L. mexicana*.

Perfil de interleucinas producidas.

La presencia del mRNA de IL-2, IFN γ , IL-10 e IL-4, fue determinado por RT-PCR. Células de bazo de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908ΩMGP63 estimuladas *in vitro* con extracto crudo de *L. mexicana* durante 2 días, después del cultivo, las células fueron cosechadas y el RNA fue purificado, el cDNA se obtuvo utilizando una mezcla de hexameros, la secuencia específica de cada citocina fue amplificada por PCR, como control fue amplificado el mRNA de GAP. La Figura 4A demuestra mRNA de IL-2 e IFN γ después de 2 días de cultivo. No fue posible demostrar mRNA de IL-4 e IL-10. La Figura 4B muestra los resultados de la

producción de citocinas de células de bazo provenientes de ratones infectados con *L. mexicana* donde se demuestra mRNA de IL-2, IL-4 e IL-10, pero no de IL- γ , resultado esperado debido a que estos ratones son susceptibles a la infección por *L. mexicana*, pues montan una respuesta de células T preferentemente de tipo Th2.

Respuesta inmune citotóxica inducida por la *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63.
La línea celular P815-MGP63 que expresa la forma madura de GP63 de *L. mexicana* fue usada como célula blanco de células citotóxicas. Células de bazo de ratones BALB/c inmunizados por vía oral con *S. typhi* CVD908, *S. typhi* CVD908 Ω MGP63 o infectados en el cojinete plantar con *L. mexicana*, y fueron restimulados *in vitro* por cinco días con extracto crudo de *L. mexicana* fueron utilizadas como células efectoras. La Figura 5, muestra que la inmunización con *S. typhi* CVD908 Ω MGP63, así como la infección con *L. mexicana* inducen respuesta inmune citotóxica contra el mastocitoma que expresa la GP63. En contraste, los linfocitos obtenidos de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908 no se estimularon *in vitro* con extracto crudo de *L. mexicana*.

Inducción de protección por *S. typhi* CVD908 Ω MGP63.

Para evaluar la capacidad de *S. typhi* CVD908 Ω MGP63 para inducir protección activa contra el reto con *L. mexicana*, grupos de 10 ratones F₁(BALB/c X C57Bl/6) fueron inmunizados por vía oral con *S. typhi* CVD908 o *S. typhi* CVD908 Ω MGP63, como se describió anteriormente. Tres semanas después de la primera inmunización, se inocularon con 1×10^6 promastigotes *L. mexicana* que se encontraban en fase metaeólica en el cojinete plantar. La infección se monitoreó durante 12 semanas, comparando la induración de la pata inoculada en relación a la pata contralateral. La Figura 6 muestra que después de este tiempo solo los ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908 Ω MGP63 fueron protegidos parcialmente contra el reto con *L. mexicana*. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes. Se presenta en la figura la media del diámetro de las diferencias entre la pata infectada en relación con la contralateral de todos los ratones en el grupo. El incremento del tamaño de la lesión se graficó contra tiempo, expresado en semanas desde el día del reto.

VII. DISCUSION

Resultados obtenidos en la UEMI, muestran que el candidato a vacuna *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 confiere protección a ratones contra el reto de promastigotes de *Leishmania mexicana*. La protección está asociada a dos mecanismos; la estimulación de inmunidad celular, que conduce a la activación de macrófagos, y la generación de citotoxicidad mediada por linfocitos T. La activación de los linfocitos T CD4⁺ se resolvió hacia la subpoblación Th1 porque no fue posible demostrar que los ratones producen anticuerpos contra *Leishmania mexicana* y si se demostró la presencia de IL-2 e IFN γ .

El empleo de *Salmonella typhi*, como acarreador de antígenos recombinantes, tiene un gran potencial en la protección contra aquellos patógenos, que como *Leishmania*, ganan rápidamente un habitat intracelular en los fagocitos profesionales mononucleares, donde generalmente viven por largos períodos de tiempo escapando de la acción de los anticuerpos y del complemento. En estos casos, es deseable una vacuna que genere linfocitos T capaces de reconocer y destruir al parásito dentro del macrófago, o bien induzca linfocitos T, que a su vez activen a los macrófagos. Por otro lado, *S. typhi* estimula una amplia gama de respuesta inmune entre ellas la mediada por células, incluyendo aquella dirigida contra los antígenos heterólogos que acarrea. Además utilizar esta bacteria como acarreador de antígenos, ofrece la oportunidad de generar vacunas polivalentes pues es posible integrar diferentes antígenos en otros *loci* del cromosoma (48).

El hecho de que se haya logrado inducir protección en ratones inmunizados con la bacteria acarreadora de GP63, sin que se pudiesen detectar anticuerpos, es consecuente con el conocimiento actual de la respuesta inmune contra *Leishmania*. Se han descrito dos subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, o cooperadores, con funciones mutuamente reguladoras y que producen diferentes linfocinas. Los linfocitos Th1, secretan preferentemente IL-2 e IFN γ , las cuales estimulan la inmunidad mediada por células (activación de macrófagos); en tanto que los linfocitos Th2, producen IL-4, IL-5 e IL-6, linfocinas que juegan un papel muy importante en la producción de anticuerpos (49). En el caso de la Leishmaniasis, se sabe que las líneas celulares que transfieren protección pertenecen a la subclase Th1, en tanto que las que exacerban la enfermedad son Th2 (6). Además, en los ratones susceptibles BALB/C responden a la infección con *Leishmania* preferentemente con linfocitos Th2, lo cual deriva en la progresión de la enfermedad. En tanto que los ratones resistentes C57Bl/6 presentan inmunidad protectora mediada por linfocitos CD4⁺ Th1. Por ello, resulta atractivo pensar que el candidato a vacuna *S. typhi* CVD908ΩMGP63 induce protección porque activa preferentemente una clase de respuesta inmune que lleva a la activación de

macrófagos, los que a su vez son capaces de controlar la infección intracelular por el parásito. En este trabajo se muestran suficientes evidencias experimentales que prueben esta hipótesis. Otros autores han demostrado que una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* acarreadora de GP63 induce protección en ratones mediante la estimulación preferente de linfocitos CD4⁺ Th1 (22). Sin embargo, aún debe aclararse si la inmunización con *S. typhi* CVD908ΩMGP63 induce la producción de IL-12 en la fase de inducción de la respuesta inmune y la producción de NO se incrementa.

Por otro lado en diversos modelos experimentales se ha tratado de generar células citotóxicas contra antígenos solubles. Los resultados demuestran que es difícil inducir este tipo de respuestas de manera reproducible y que son necesarias múltiples inmunizaciones con altas concentraciones de antígeno para obtener respuestas débiles. Además, no se conoce la duración o memoria en estos casos y no se sabe si tienen alguna relevancia *in vivo*. (50). Sin embargo, los antígenos proteicos solubles incluidos en liposomas sensibles a ácido, pueden entrar al citosol y ser procesados por la vía endógena y ser presentados en el contexto de moléculas de clase I (51).

La capacidad de bacterias para generar respuestas de CTL también es controversial. Mientras que algunos autores reportan evidencias de que ciertos antígenos recombinantes, expresados en bacterias pueden ser presentados en el contexto de moléculas de clase I y por tanto, generar CTL (52, 53). Otros no han logrado inducir este tipo de respuestas contra los antígenos acarreados por *Salmonella* (54) y otros más han demostrado que la inducción de CTL parece estar asociada con la cantidad de proteína recombinante que se produce y, en su caso, con la estabilidad de los plásmidos (55).

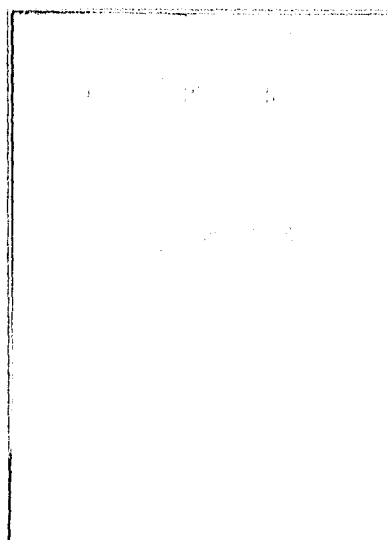
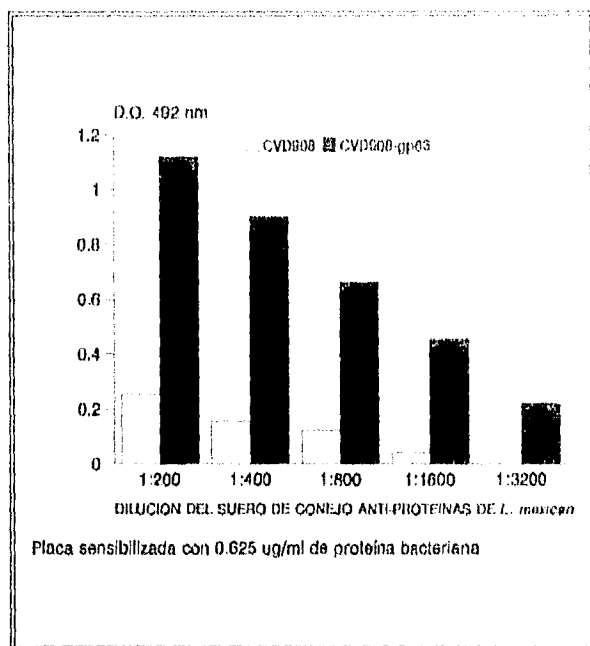
Varias son las posibles vías que pudiesen seguir los péptidos inmunogénicos provenientes de *Salmonella* para alcanzar a moléculas del MHC de clase I. La bacteria, o sus productos pudiesen escapar de los fagolisosomas y las proteínas ser procesadas en el citosol. Por otro lado, las proteínas pudiesen ser degradadas hasta péptidos en el fagolisosoma y posteriormente secretadas a la membrana celular donde se unirían a moléculas del MHC de clase I vacías o conteniendo péptidos de menor afinidad. Esta última hipótesis ha sido evaluada en la UIMI, y se ha observado que los macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* secretan al medio péptidos que pueden unirse a moléculas de clase I vacías (56).

FIGURA 1

DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE GP63 RECOMBINANTE EN
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 POR ELISA E
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

A

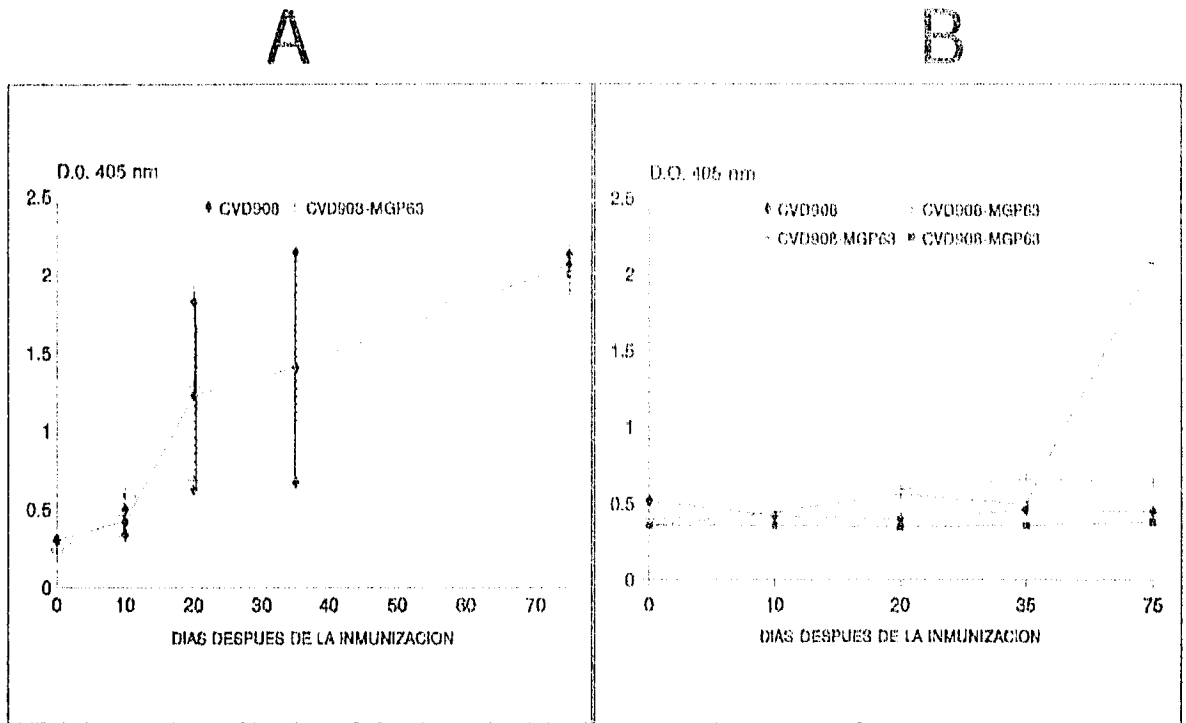
B



Panel A. Placas de microtitulación se sensibilizaron con extractos crudos de las cepas *S. typhi* CVD 908 y CVD908ΩMGP63. Se adicionó el suero de conejo por duplicado en diluciones 1:200 1:400 1:800 1:1600 y 1:3200. Se adicionó suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Se reveló con o-fenilendiamina-H₂O₂. Panel B. Se cultivaron las cepas en caldo Luria a 37°C toda la noche. Se corrieron 10⁸ bacterias y 0.1 mg de extracto crudo de *Leishmania mexicana* en un gel al 11.5 % de acrilamida. Se hizo la transferencia a papel de nitrocelulosa, el suero de conejo inmune se adicionó en una dilución 1:1000. Se adicionó el suero de cabra anti-IgG de conejo en una dilución 1:1000 y se reveló CON 4-cloro- α -naftol-H₂O₂ en PBS. Carril 1, *Salmonella typhi* CVD908; Carril 2, *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63; Carril 3, Proteínas de *Leishmania mexicana*.

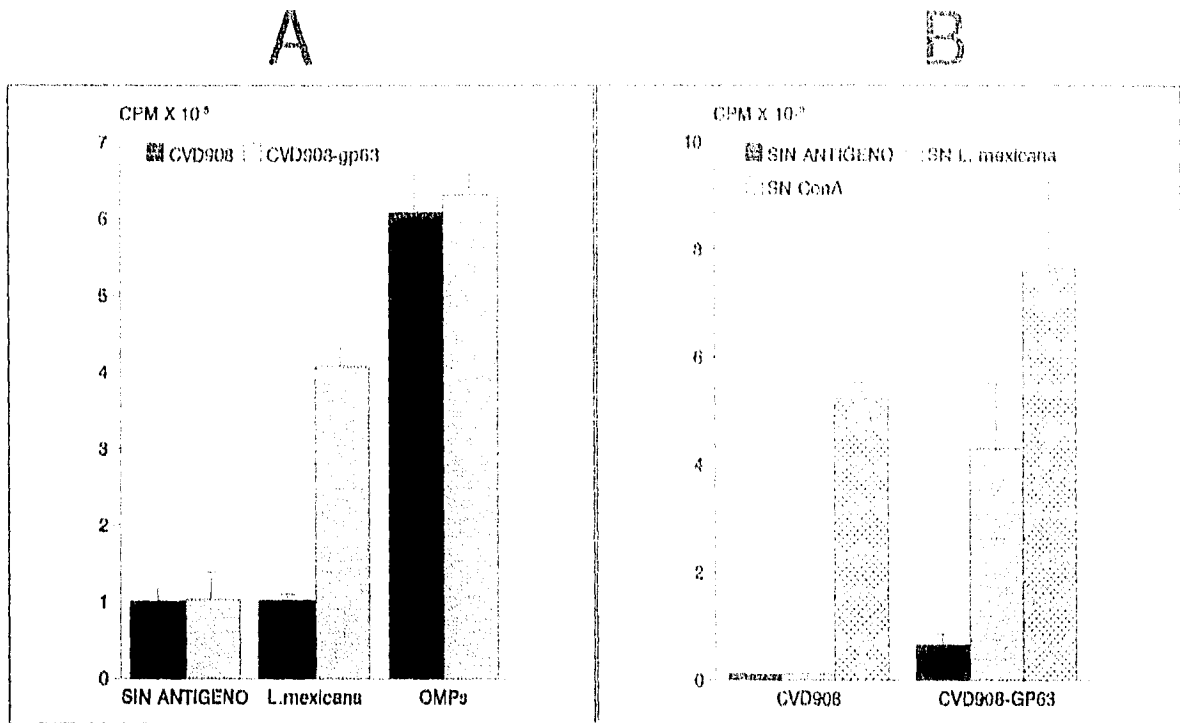
FIGURA 2

INDUCCION DE ANTICUERPOS EN RATONES INMUNIZADOS CON
Salmonella typhi CVD908 Y CVD908ΩMGP63



A. Grupos de cinco ratones fueron inmunizados con *Salmonella typhi* y *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 como se describió en materiales y métodos, los anticuerpos contra LPS de *Salmonella typhi* fueron determinados mediante ELISA , y es presentado el experimento donde se utilizó una dilución 1:100. B. Después de la inmunización oral con *Salmonella typhi* CVD908 o *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63, los anticuerpos contra GP63 recombinante fueron determinados mediante ELISA. En el experimento se muestra que solo un ratón presentó anticuerpos contra dicha proteína utilizando una dilución del suero 1:100.

FIGURA 3
 RESPUESTA PROLIFERATIVA CONTRA PROTEINAS DE
Leishmania mexicana INDUCIDA POR LA INMUNIZACION CON
Salmonella typhi CVD908 Ω MGP63

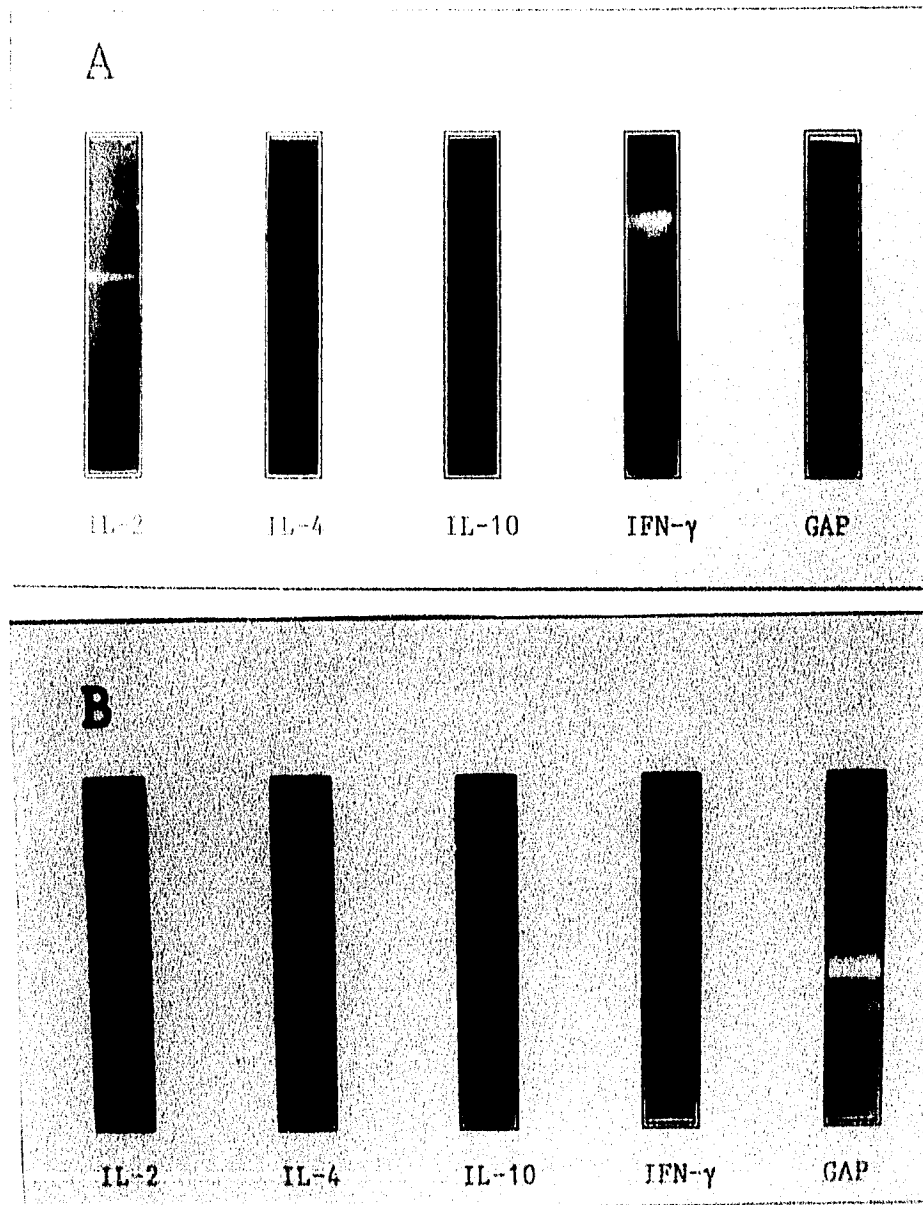


A. La inmunización con *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63 induce respuesta proliferativa específica. Se purificaron esplenocitos de cinco ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 o *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63 y se cultivaron en presencia de *Leishmania mexicana* fijada con formalina o OMPs de *Salmonella typhi*, que se purificaron de acuerdo al método descrito. Después de cinco días de cultivo se adicionó 1 μ Ci de ³H-timidina y la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido.

B. La inmunización con *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63 induce la liberación de IL-2. Se purificaron esplenocitos de cinco ratones inmunizados por vía oral con *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63 y se cultivaron en presencia de extracto protéico de *Leishmania mexicana*, después de dos días de cultivo los sobrenadantes se utilizaron para evaluar la proliferación de la línea celular CFTL-2 en un ensayo de incorporación de ³H-timidina.

FIGURA 1

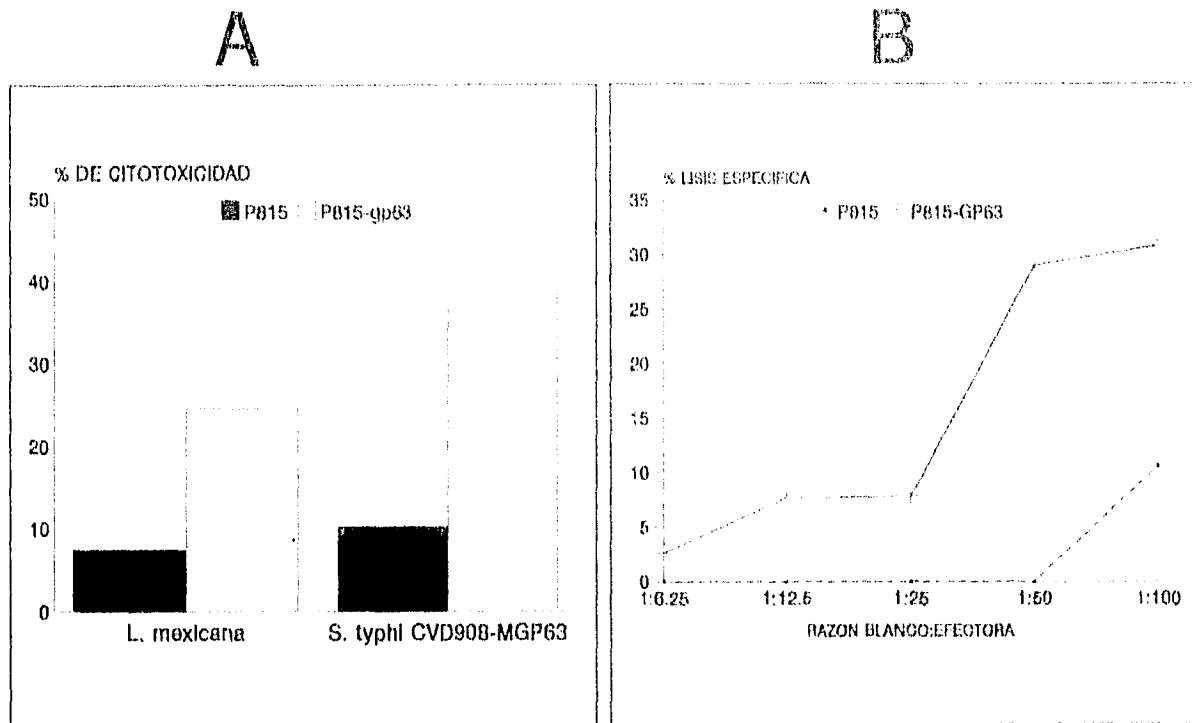
PERFIL DE INTERFERENCIAS INDUCIDAS POR LA INMUNIZACIÓN CON *Salmonella typhi* CVD908ΩGP63



A. Grupos de cinco ratones fueron inmunizados con *S.typhi* CVD908ΩGP63 o B. Infectados con *L. mexicana*. Como se describió en materiales y métodos, El RNA fue aislado de células de bazo después de 2 días de estimulación con antígeno de *L. mexicana* y el mRNA de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN γ fue amplificado por RT-PCR. Como control se amplificó mRNA de GAP.

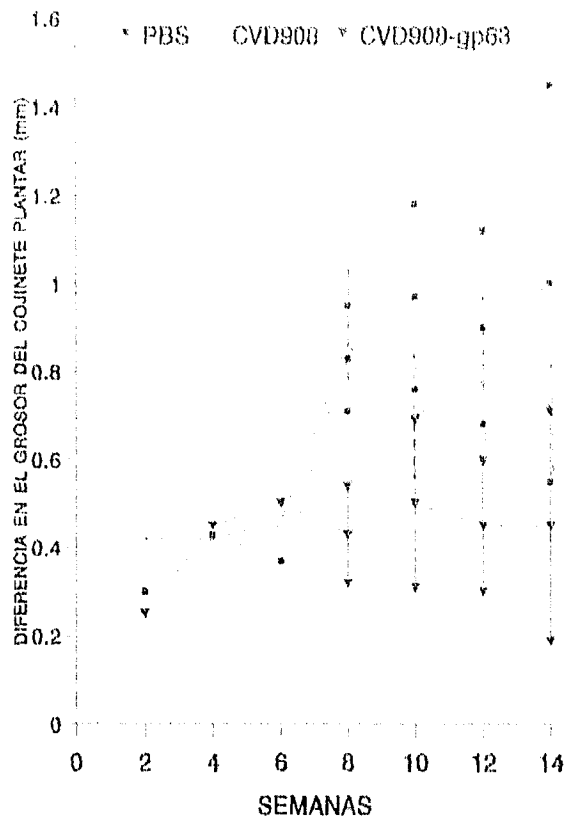
FIGURA 5

INDUCCION DE CELULAS CITOTOXICAS POR INFECCION CON
Leishmania mexicana O INMUNIZACION
CON *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63



A. Células de bazo provenientes de cinco ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908ΩMGP63 o infectados con *Leishmania mexicana* y restimulados *in vitro* con antígeno de *L. mexicana*, como se describió en materiales y métodos. Las células citotóxicas fueron probadas por su capacidad de inducir liberación de ^{51}Cr , usando como célula blanco el mastocitoma murino P815 transfectado con el gene que codifica para la GP63 de *L. mexicana*; se presenta el resultado obtenido con una razón blanco:efectora 1:100. B. La inducción de células citotóxicas en los ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908ΩMGP63 fue determinada por la liberación de ^{51}Cr descrito en materiales y métodos.

FIGURA 6
 PROTECCION INDUCIDA MEDIANTE INMUNIZACION
 CON *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63



Se inmunizaron tres grupos de diez ratones F1(BALB/cXC57B16) por vía oral. Se les administró 100 µl de bicarbonato de sodio. Después de 10 minutos se dió a un grupo 100µl de PBS, los otros dos grupos se recibieron 1×10^8 bacterias en 100 µl de PBS de las cepas *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63. Se dieron tres dosis a los días cero, siete y treinta y cinco. Una semana después de la última dosis se les inoculó en el cojinete plantar 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana* en 30 µl de RPMI. Se midió semanalmente la induración del cojinete plantar de los ratones durante cuatro meses. Los valores graficados representan la media el diámetro de la lesión por grupo.

VIII. REFERENCIAS.

1. The Leishmaniasis. WHO Tech. Rep. Ser. pp. 701, 1984.
2. Velasco, O. La magnitud de una infección endémica: Las leishmaniasis. En: La seroepidemiología en México. Vol. I. Pub Tec. No. 9. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud, México. pp.67-76, 1991.
3. Chang, K.P., Fong, D., and Bray, R.S. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: Leishmaniasis, Human parasitic diseases, Vol. I. Chang, K.P. and Bray, R.S., eds. Elsevier Science Publishers, USA, 30, 1985.
4. Oscar Velasco Castrejón. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos técnicos del INDRE. SSA México, 1994.
5. Romero-Cabello. R. Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Medica Panamericana. México. pp 535-542, 1993.
6. Reiner, S.L., and Locksley, R.M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4⁺ subsets in *Leishmaniasis*. J. Cell. Biochem. 53:323-328, 1993.
7. Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., and Sher, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. J. Exp. Med. 168:1675-1684, 1988.
8. Kurtzhals, J.A.L., Hey, A.S., Jardim, A., Kemp, M., Schaefer, K.U., Odera, E.O., Christensen, C.B.V., Githure, J.I., Olafson, W.R., Theander, T.G., and Kharazmi, A. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. II Absent or Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients. Clin. Exp. Immunol. 96: 416-421, 1994.
9. Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for *Bcg*. Cell 73:469-485, 1993.
10. Overath, P., and Harbecke, D. Course of *Leishmania* infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. Immunol. Lett. 37:13-17, 1993.
11. Wang, Z.E., Reiner, S.L., Hatam, F., Heinzl, F.P., Bouvier, J., Turk, C.W., and Locksley, R.M. Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. J. Immunol. 151:2077-2086, 1993.
12. Handman, E., and McConville, M. Vaccines against *Leishmania*. In: New generation vaccines. Woodrow, G.C., and Levine, M.M. eds. Marcel Dekker Inc. USA. pp. 545-564, 1990.

13. Russell, D.G., and Talamas-Rohana, P. Leishmania and the macrophage: A marriage of inconvenience. *Immunology Today* 10: 328-333, 1989.
14. Hey, A.S., Theander, T.G., Hviid, L., Hazrati, S.M., Kemp, M., and Kharazmi, A. The Major Surface Glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* Cleaves CD4 Molecules on Human T Cells. *J. Immunol.* 152:4542-4548, 1994.
15. Bouvier, J., Etges, R.J. and Bordier, C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the Major Surface Protein of *Leishmania* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 260: 15504-15509, 1985.
16. Ip, H.S., Orn, A., Russell, D.G., and Cross G.A.M. *Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40:163-172, 1990.
17. Medina-Acosta, E., Kares, R.E., and Russell, D.G. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57:31-45, 1993.
18. Bouvier, J.R., Etges, R.J., and Bordier, C. Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24:73-79, 1987.
19. Etges, R.J., Bouvier, J., and Hoffman, R. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:141-149, 1985.
20. Colomer-Gould, V., Quintao, L.G., Keithly, J., and Nogueira N. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. *J. Exp. Med.* 162:902-916, 1985.
21. Russell, D.G., and Alexander, J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.* 140:1274-1279, 1988.
22. Handman, E., Button, L.L. and McMaster, R.W. *Leishmania major*: Production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Experiment. Parasitol.* 70:427-435, 1990.
23. Yang, D.M., Fairweather, N., Button, L., McMaster, W.R., Kahl, L.P., and Liew, F.Y. Oral *Salmonella typhimurium* (Aro A) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induced Th1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J. Immunol.* 145:2281-2285, 1990.
24. Connell, N., Medina-Acosta, E., McMaster, W.R., Bloom, B.R., and Russell, D.G. Effective immunisation against cutaneous leishmaniasis with recombinant BCG expressing the *Leishmania* surface protease, gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 90:11-173, 1993.

25. Xu, D., and Liew, F.Y.. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 12:1534-1536, 1994.

26. Hone, D., Attridge, S., Bosch, L.V.D. and Hackett, J.A Chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strain. *Microb. Pathog.* 5:407-418, 1989.

27. Hone, D., Harris, A., Chatfield, S., Dougan G., and Levine, M.M. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9:810-816, 1991.

28. Fouts, T.R., Lewis, G.K., and Hone, D.M. Construction and characterization of a *Salmonella*-based HIV-1 vector vaccine. In: *Vaccines 93 Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS* Ginsberg, H.S., Brown, F., Chanock, R.M., and Lerner, R.A eds. CSHL press, USA. pp. 95-100, 1993.

29. Girón, J.A., Xu, J.G., González, C.R., Hone, D., Kaper, J.B., and Levine, M.M. Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by $\Delta aroC$, $\Delta aroD$ *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908. *Vaccine*. 13:939-946, 1995.

30. González, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C.O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Szein, M.B., Heppner, D.G., Fouts, T.R., Isibasi, A., and Levine M.M. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: Strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J. Infect. Dis.* 169:927-931, 1994.

31. González, C., Noriega, F., Fouts, T., Harris, A., Hone, D., and Levine, M.M. Construction and characterization of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Leishmania mexicana* GP63. Abs 946. 32nd Interscience Conference on antimicrobial Agents and Chemotherapy . ASM. Anaheim, Cal. USA. 1992.

32. Huerta-Yepe, S. Construcción de una línea celular murina productora de GP63 de *Leishmania mexicana mexicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 1994.

33. Monroy-Ostria, A., Fuentes-Fraga, I., García-Flores, C., and Favila-Castillo, L. Infection of Balb/c, C57Bl/6 mice and F1 hybrid CB6F1 mice with strains of *Leishmania mexicana* isolated from mexican patients with localized od diffuse cutaneous leishmaniasis. *Arch. Med. Res. (Mex)*. 25:401-406, 1994.

34. Ganong, B.R., and Delmore, J.P. Phase separation temperatures of mixtures of Triton X-114 and Triton X-45: Application to protein separation. *Anal. Biochem.* 193:35-37, 1991.

35. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., and Farr, A. L. Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
36. Engvall, E. and Perlmann, P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 8:874-879, 1971.
37. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685, 1970.
38. Towbin, H.T., Staehlin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels into nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354, 1979.
39. González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., García, J., Blanco, F., and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol and Immunol* 37:793-799, 1993.
40. Bottombly, K., Davis, L. S., and Lipsky, P.E. Measurement of human and murine interleukin 2 and 4. In: *Current Protocols in Immunology*. Colligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. eds. National Institutes of Health. Bethesda, MD. USA. 1: 6.3.1-6.3.12, 1994.
41. Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., Finkelman, F.D., and Murray, H.W. Th1 and Th2 Cell-associated cytokines in experimental visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62:1058-1063, 1994.
42. Kashima, N., Nishi-Takaota, C., Fujita, T., Taki, S., Yamada, G., Hamuro, J., and Taniguchi, T. Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature.* 313:402-404, 1985.
43. Sideras, P., Bergsedt, Lindquist, S., Severinson, E., Noma, Y., Naito, T., Azuma, C., Tanabe, T., Kinashi, T., Matsude, F., Yaoita, Y. and Honjo, T. IgG1 induction factor: A single molecular entity with multiple biological functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 213:227-236, 1987.
44. Degraeve, W.M., Simonds, G., Devos, R., Platinek, G., Remaut, E., Tevernier, J., and Fiers, W. Cloning and structure of a mouse interleukin-2 chromosomal gene. *Mol. Biol. Rep.* 11:57-61, 1986.
45. Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstein, M.L., Kahan T.A., and Mosmann, T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Bar virus gene BCRF1. *Science* 248:1230-1234, 1990.
46. Wunderlich, J., and Shearer, G. Assays for T cell function. Induction and Measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In: *Current Protocols in Immunology*. Colligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. eds. National Institutes of Health. Bethesda, MD. USA. 1: 3.11.1-3.11.15, 1994.

47. Giannini, M.S.H., Suppression of pathogenesis in cutaneous leishmaniasis by ultraviolet irradiation. *Infect. Immun.* 51:838-843, 1986.
48. Curtis R. Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In: *New Generation Vaccines*. Woodrow, G.C., Levine, M.M. eds. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp.161-188, 1990.
49. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R.L. Two types of murine helper clone: I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2318-2357, 1986.
50. Raychaudhuri, S., and Morrow, W. J. W. Can soluble antigens induce CD8⁺ cytotoxic T-cell responses? A paradox revisited. *Immunology Today.* 14:344-438, 1993.
51. Harding, C. V., Collins, D. S., Kanagawa, O., and Unanue, E. Liposome-encapsulated antigens engender lysosomal processing for class II MHC presentation and cytosolic processing for class I presentation. *J. Immunol.* 147:2860-2863,1991.
52. Flynn, J. L., Weiss, W. R., Norris, K. A., Seifert, H. S., Kumar, S., and So, M. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol. Microbiol.* 4:2111-2118,1990.
53. Aggarwal, A., Kumar, S., Jaffe, R., Hone, D., Gross, M., and Sadoff, J. Oral *Salmonella*: Malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 172:1083-1090,1990.
54. Brett, S. J., Rhodes, J., Liew, J. Y., and Tite, J. Comparison of antigen presentation of influenza a nucleoprotein expressed in attenuated *aroA*⁻ *Salmonella typhimurium* with that of live virus. *J. Immunol.* 150:2869-2884,1993.
55. Turner, S.J., Carbone, F. R., and Strunnell, R. A. *Salmonella typhimurium* Δ *aroA* Δ *aroD* mutants expressing a foreign recombinant protein induce specific major histocompatibility complex class I. restricted cytotoxic T lymphocytes in mice. *Infect. Immun.* 61:5374-5380,1993.
56. Ortíz-Navarrete, V., Ochoa, I., Martín, N., and Isibasi, A. Loading of empty class I molecules with peptides secreted by macrophages infected with *Salmonella*. Abstract: W43/14. Twelveth European Immunology Meeting. Barcelona, España.1994.