

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"CONSTRUCCIÓN DE UN CANDIDATO A VACUNA USANDO *Salmonella typhi* COMO  
ACARREADOR"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA LA ALUMNA

Q.F.B ARACELI ELVIRA SANTIAGO MACHUCA

MÉXICO, D.F.

1997

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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

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. Armado Isibasi Araujo y cotutoría del Dr. César Raúl González Bonilla.

## **CONTENIDO**

**Resumen**

**Introducción**

**Planteamiento del problema**

**Hipótesis**

**Objetivos**

**Material y métodos**

**Resultados**

**Discusión**

**Figuras**

**Referencias**

## ABREVIATURAS

<b>PCR</b>	Reacción de la polimerasa en cadena
<b>GP63</b>	Glicoproteína principal del promastigote
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>LMC</b>	Leishmaniasis mucocutánea
<b>LCD</b>	leishmaniasis cutánea diseminada
<b>LCL</b>	leishmaniasis cutánea localizada
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintasa inducible
<b>DTH</b>	hipersensibilidad de tipo retardada
<b>IFN</b>	Interferon gama
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TNFB</b>	Factor de necrosis tumoral beta
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de granulocitos y macrófagos
<b>PHA</b>	aglutinina de cacahuete
<b>GPI</b>	glucosil fosfatidil inositol
<b>CSP</b>	Proteína circunsporozítica de <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-3</b>	Interleucina 3
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>UMAB</b>	Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, USA.
<b>UIMI</b>	Unidad de Investigación Médica en Inmunología

## RESUMEN.

Los sistemas de integración cromosómica para la producción de proteínas recombinantes en bacterias tienen la desventaja del bajo nivel de transcripción. Para resolver este problema se diseñó un sistema de complementación utilizando una RNA polimerasa y el gene de nuestro interés bajo el control del promotor de esta polimerasa. Se desarrolló un sistema de expresión en *Escherichia coli* de la glicoproteína principal del promastigote (GP63) de *Leishmania mexicana*, dependiente de la T7 RNA polimerasa y del promotor T7. La T7 RNA polimerasa se obtuvo por PCR a partir de *Escherichia coli* BL21DE3 y se insertó en el plásmido pUC19. Posteriormente se subclonó en pGORBY. Se sintetizaron oligonucleótidos que codifican para el promotor T7 y se insertaron en el plásmido pJRD184. La forma madura de GP63 se obtuvo a partir del plásmido pUC19-GP63 y se insertó en el plásmido pJRD184-pT7. Con los plásmidos pACYC184-T7pol y pJRD184-pT7GP63 se transformó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . La producción de mRNA de GP63 se determinó mediante "Northern blot" y la producción de la proteína recombinante mediante "Western blot". Se transformó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con dos plásmidos compatibles que contienen, por un lado la T7 RNA polimerasa y por otro lado a la GP63 bajo el control de pT7. Se comprobó que el sistema es funcional pues se produce RNA mensajero y que se traduce la GP63, lo que se demostró mediante "Northern blot" y ELISA. Sin embargo, se notó que existe gran degradación de RNA mensajero, para solucionar este problema se está trabajando en un sistema de integración de los plásmidos en el cromosoma de *Salmonella typhi* CVD908.

## INTRODUCCIÓN.

### GENERALIDADES SOBRE LEISHMANIASIS.

Se da el nombre de leishmaniasis a la zoonosis causada por el parásito *Leishmania*. Después del paludismo, esta parasitosis es el principal problema de salud pública por protozoarios en el mundo.(1) En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó la prevalencia global de esta parasitosis en 12 millones de casos y una población en riesgo del orden de 350 millones de personas (2). La incidencia parasitaria anual para la leishmaniasis cutánea es de 1 a 1.5 millones de casos, y la de la leishmaniasis visceral (L.V) de 500.000 casos nuevos por año. En México hasta 1991, se habían reportado cinco casos de L.V, todos localizados en el suroeste del país, entre 1992-93 se reportaron siete casos. En 1993 se registraron 170 casos de leishmaniasis mucocutánea localizada (LMC) en Nayarit. En Tabasco se reportaron 625 casos entre 1987-1993, en los que estaban incluidos 18 casos de leishmaniasis cutánea diseminada (LCD). Sin embargo, existen casos de leishmaniasis que no son notificados, por lo que las estadísticas oficiales tienen poco valor para determinar el número real de enfermos. En la actualidad no se tiene una estimación precisa sobre el número de personas en riesgo de contraer la enfermedad y sobre el número de casos nuevos que podrían ocurrir en México (2).

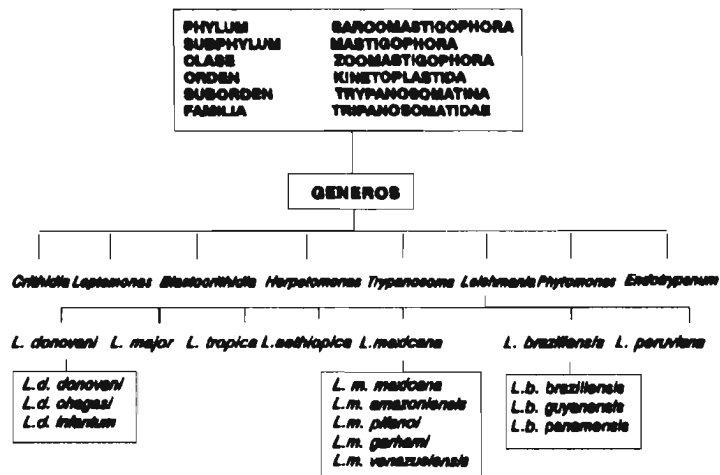
### TAXONOMÍA DEL PARÁSITO

Para la clasificación de *Leishmania* se cuenta con métodos bioquímicos como el análisis electroforético de isoenzimas (3), técnicas de biología molecular, como PCR, para amplificar genes de la leishmania. También se han empleado técnicas como la serotipificación, que reconocen diferentes estructuras antigénicas en el parásito (4). A continuación se presenta en un diagrama la clasificación taxonómica del género de *Leishmania*.



TAXONOMIA DE LAS ESPECIES CONOCIDAS DE *Leishmania* QUE AFECTAN AL SER HUMANO

**PROTOZOA**



**MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.**

El mecanismo de infección implica la participación de un reservorio primario para cada especie de *Leishmania*. En México se ha demostrado que es un mosquito hematófago del género *Lutzomyia*, el cual tiene cuatro especies asociadas con la transmisión de *Leishmania*: *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia diabolica*, *Lutzomyia cruciata*. De estas especies, las más importantes son *Lutzomyia longipalpis*, que se encuentra distribuida en el norte de México y *Lutzomyia olmeca olmeca*, que es responsable de la transmisión de *Leishmania mexicana*. El huésped primario infecta a otros mamíferos convirtiéndolos en huéspedes secundarios; lo cuales, a pesar de ser infectados, generalmente no manifiestan la enfermedad. Como ejemplo de éstos tenemos a los roedores arbóreos llamados, *Carinis familiaris* en Oaxaca y *Nassua narica* en Chiapas (5). El ser humano se encuentra al final de la cadena de transmisión.

## CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania*

El ciclo biológico de *Leishmania* comprende dos estadios: el **promastigote**, que es fusiforme con un diámetro de aproximadamente 12 a 20  $\mu\text{m}$ , tiene un núcleo central y un flagelo anteronuclear, que nace de un cuerpo basal situado delante del cinetoplasto y sale del cuerpo por el polo anterior. Este parásito carece de membrana ondulante. Se han descrito dos tipos de promastigotes en el intestino medio del mosquito, uno de ellos es una leptomonada delgada (6) con una longitud menor a 12  $\mu\text{m}$ , que se encuentra libre ó unida por interdigitaciones del epitelio del intestino medio. El otro tipo de promastigote es una corta y amplia haptomonada, que tiene una longitud corporal menor a 12  $\mu\text{m}$  y que se encuentra unida al recubrimiento cuticular de la válvula esofágica del mosquito por medio de hemidesmosomas en el flagelo (7). La segunda forma presente es el **amastigote**, que tiene forma redonda u oval de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro con un núcleo excéntrico y un cinetoplasto. Es aflagelado, intracelular y sólo se observa en las células reticuloendoteliales de bazo, hígado y nódulos linfáticos.

Cuando un mosquito infectado pica al hombre, le inyecta promastigotes, estos quedan en el tejido y son atrapados por las células del sistema fagocítico mononuclear, dentro de estas células se transforman en amastigotes y se multiplican, para posteriormente romper la célula que los contiene e invadir otras células. En este momento el hombre se convierte en portador y al ser picado por el mosquito, éste ingiere sangre con el amastigote (8), el cual es liberado en el intestino del mosquito donde se transforma en promastigote y se reproduce por fisión binaria, migra hacia la porción anterior del aparato digestivo y se localiza en la probóscide. Cuando el mosquito pica al hombre se repite el ciclo biológico del parásito.

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA LEISHMANIASIS.

La **leishmaniasis cutánea localizada (LCL)**, o úlcera de los chicheros, es la forma más frecuente y se caracteriza por la presencia de lesiones en la piel que pueden tardar meses o años en sanar y que pueden dejar cicatrices permanentes, altamente desfigurantes. Sin embargo, la enfermedad natural habitualmente confiere protección contra infecciones subsecuentes por especies relacionadas (9,4). En el caso de LCL del nuevo mundo, la lesión presenta gran cantidad de células epiteliales y se ve favorecida la formación de granulomas rodeados por una infiltración linfática (10). En el viejo mundo las especies que causan la LCL más frecuentemente son; *L.*

*tropica*, *L. major*, *L.aethiopica*; en tanto que en el nuevo mundo son *L. mexicana*, *L. brasiliensis*.

La **leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)**, se inicia con un nódulo no ulcerado en el sitio de la picadura del mosquito, a partir del cual el parásito se disemina por vía linfática, causando una afección generalizada grave. *L. aethiopica* y *L. amazonensis* son frecuentemente responsables de LCD. Sin embargo, esta enfermedad puede también ser causada por *L. mexicana* *pifanoi*. La enfermedad se caracteriza por el ensanchamiento de la piel en forma de placas, pápulas ó nódulos múltiples especialmente sobre la cara y la superficie exterior de los miembros. Histológicamente, la lesión de LCD contiene abundantes parásitos en ausencia de infiltración linfocitaria (11).

La **leishmaniasis mucocutánea (LMC)** o espundia, que se caracteriza por lesiones metastásicas mutilantes en las mucosas nasal y orofaríngea, que se presentan meses después de una lesión cutánea, no curan espontáneamente y son muy resistentes a la quimioterapia. La leishmaniasis se presenta inicialmente como una lesión cutánea que posteriormente se disemina, caracterizándose por la aparición de nuevos focos de infección, extendiéndose hacia la cavidad oronasal y faríngea, el abultamiento de la nariz y los labios causa la característica nariz de tapir, dando lugar a una enfermedad crónica con una mutilación severa y muerte como resultado de bronconeumonía o desnutrición. Los casos severos de LMC se encuentran frecuentemente asociados con un incremento de células T específicas en el sitio de la lesión mucosa y un aumento en la respuesta de células T tanto *in vivo* como *in vitro* (12).

La **leishmaniasis visceral (LV)** o kala-azar es la forma clínica más grave, pues tiene una alta letalidad. En esta variedad, el parásito se disemina al hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. En Europa y Asia esta forma clínica es causada por *Leishmania donovani* (13). La LV se manifiesta inicialmente por la presencia de una lesión cutánea, a partir de la cual los parásitos migran a las vísceras. Entre los síntomas característicos, es posible citar fiebre, malestar, pérdida de peso, anorexia, tos y diarrea. Los signos clínicos más frecuentes incluyen anemia, desgaste físico, oscurecimiento de la piel, esplenomegalia, hepatomegalia, en algunos casos adenopatía, hipergamaglobulinemia (principalmente producción de policlonal de IgG), citopenias sanguíneas y pérdida de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH), así como de la reactividad *in vitro* de los linfocitos T a antígenos de *Leishmania* (14,15).

## RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA LEISHMANIASIS.

### ENTRADA DEL PARÁSITO AL HUÉSPED

La generación de la respuesta inmune comienza por la entrada del parásito a través de la piel y su fagocitosis. Se han descrito dos posibles vías de fagocitosis: por un lado existe un mecanismo opsonización, pues el parásito se recubre de moléculas C3b del complemento, permitiendo la unión al receptor CR1 (16); por otro lado, GP63 interacciona con el receptor de C3b (17), C3R presente en la superficie del macrófago (18). A pesar de la gran capacidad del macrófago para eliminar microorganismos, los amastigotes se adaptan y reproducen dentro del fagolisosoma, pues el parásito inactiva las enzimas lisosomales (19) y ocasiona un cambio de pH intralisosomal (20), inhibiendo la producción de metabolitos tóxicos.

### PAPEL FUNCIONAL DEL MACRÓFAGO

El parásito evade rápidamente la acción de los anticuerpos y el complemento al alcanzar un habitat intracelular; por tanto, la eliminación de *Leishmania* depende del grado de activación del macrófago, al ponerse en marcha el llamado estallido respiratorio, se producen metabolitos tóxicos dentro de los fagolisosomas, entre los cuales destaca la participación del peróxido de hidrógeno (21,22), otro metabolito tóxico es el óxido nítrico (23). Mediante estos mecanismos la mayoría de los promastigotes mueren durante la fase infectiva; sin embargo, las formas más infectivas que presentan la aglutinina de cacahuete (PNA) son resistentes al efecto tóxico del peróxido de hidrógeno. Además, el promastigote tiene en su superficie una proteína asociada a la lipofosfoglicana (proteína-11) que contiene N<sup>G</sup>monometil-L-arginina, el cual es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (24,25). Entre las interleucinas que producen los macrófagos activados, la IL-12 tiene especial importancia pues, entre otras actividades biológicas, determina la diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia la subpoblación Th1 mediante la producción de IFN- $\gamma$ , a su vez promueve la activación de macrófagos. 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 y codifica para la proteína Nramp1 (26). Se trata de una proteína transmembranal que interviene en el transporte de intermediarios del NO hacia los fagolisosomas (27). Esta proteína juega un papel muy importante en el control de la infección

temprana por el parásito, pues los ratones mutantes *Nramp1*<sup>-/-</sup> controlan la infección tardía, sugiriendo que *Nramp1* pertenece a mecanismos citotóxicos independientes a los que presentan los macrófagos activados (27). 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<sup>+</sup> hacia el linaje Th1. Estas cepas susceptibles desarrollan una respuesta de linfocitos CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Th1 que, mediante la producción de IFN- $\gamma$ , es capaz de promover la activación de macrófagos.

#### **PAPEL FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS T Y B.**

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- $\gamma$  e IL-2 con la resistencia. En los humanos existe una clara asociación con la respuesta de DTH positiva y la capacidad de los linfocitos T de sangre periférica para generar IFN- $\gamma$  cuando son estimulados *in vitro* con antígenos del parásito (28). 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- $\gamma$  y poca o ninguna producción de IL-4 (29).

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> pueden ser divididos en dos subpoblaciones, Th1 y Th2 (30). Las células Th1 producen IL-2, IL-3, IFN- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , siendo capaces de inducir la respuesta de hipersensibilidad tardía; mientras que las células Th2 secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-13, las cuales inducen la producción de anticuerpos (31,32). En la actualidad se considera que la evolución de la leishmaniasis hacia la curación o cronicidad se debe fundamentalmente a la función de las subpoblaciones de los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Así, los linfocitos Th1 son responsables del proceso curativo, mientras que los linfocitos Th2 lo son de la cronicidad o exacerbación de la enfermedad (33, 34). En el ratón, la respuesta de linfocitos CD4<sup>+</sup> Th2 que secretan IL-4 exagera la enfermedad por leishmania (35). El TNF- $\alpha$  (36) y el GM-CSF (37, 38)

activan a los macrófagos de manera que estos puedan matar a la leishmania *in vitro*. En las personas que enferman y curan de leishmaniasis visceral por *Leishmania donovani* se detecta inmunidad mediada por células con producción de IFN- $\alpha$  y activación de macrófagos. De manera semejante las personas infectadas con *Leishmania major*, con historia clínica de Leishmaniasis cutánea que se ha curado presentan respuesta de DTH positiva. En cambio, en los casos donde la enfermedad progresa prevalece hipergama globulinemia, ausencia de IFN- $\gamma$  y altos niveles de IL-4 e IL-10.

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- $\gamma$ , mientras que los pacientes que presentan enfermedad progresiva tienen una débil respuesta de IFN- $\gamma$ . (39,28)

El papel de otras células en el control de la infección no ha sido bien establecido, aunque se ha reportado que el control de la diseminación del parásito está controlada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (40,41), su función debe ser secundaria, pues los ratones deficientes de  $\beta$ 2-microglobulina y por tanto de inmunidad mediada por células citotóxicas, no presentan un incremento en la susceptibilidad a la infección por el parásito (42,43)

#### VACUNAS CONTRA LA LEISHMANIASIS.

El control de la leishmaniasis depende de la eliminación de los vectores y reservorios, así como de la detección y tratamiento de enfermos. Sin embargo, existen razones tanto de orden técnico como social, que dificultan el adoptar medidas efectivas que rompan la cadena de transmisión en estos aspectos. Por tanto, se considera que una vacuna representa la única alternativa práctica de prevención en algunos sitios. En el oriente medio, los programas de vacunación contra la leishmaniasis, han consistido en la inoculación de cepas atenuadas de *Leishmania* en lugares del cuerpo no visibles, para evitar que la infección natural deje cicatrices desfigurantes, sobre todo en la cara. Esta clase de inmunización, llamada leishmanización, es una infección controlada que, sin embargo, puede ser tan severa como la infección natural en algunos individuos. Se ha demostrado en las cepas de ratones CBA/ca y BALB/c protección completa al administrar el parásito *L. major* previamente irradiado (44,45). Sin embargo, en cobayos la vacunación con *L. enrietti* irradiada no genera respuesta inmunológica protectora (46). La atenuación química de *Leishmania* es una alternativa para desarrollar una vacuna (47) *L. major* atenuada por

acriflavina generó protección, si bien de corto plazo, en ratones (48). También se han probado promastigotes tratados con tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación); sin embargo, los promastigotes contienen estructuras ricas en carbohidratos que son capaces de inducir actividad supresora y, por lo tanto, pueden asociarse con ineficiencia del proceso inmunoproliferativo. Se han reportado varias vacunas experimentales que han logrado inducir protección, utilizando glicoconjugados que contienen un segmento lipídico de *L. major*. Su administración, en conjunto con *Corynebacterium parvum*, protegió completamente a la cepa C3H/HeJ y parcialmente a BALB/c contra la infección por *L. major*. La inyección de este material incluido en liposomas en asociación a BCG aumenta su eficiencia (49). La GP63 ha demostrado su utilidad en estudios de vacunación experimental cuando se administra incluida en liposomas y administrada por las vías intraperitoneal y subcutánea en ratones de las cepas BALB/c y CBA/ca (50). La inmunización de ratones con péptidos que corresponden a determinadas secuencias de GP63 (residuos 154-173, 146-171 y 171-467), pueden inducir activación de células Th1 que sintetizan IL-2 e IFN- $\gamma$  pero no IL-4 (51, 52). Se realizaron estudios clínicos en Brasil para evaluar una mezcla de cinco diferentes especies de *Leishmania* sometidas a ultrasonido (53). La mayoría de los voluntarios vacunados presentaron pruebas cutáneas positivas; sin embargo, no fue posible realizar un seguimiento posterior, ya que la enfermedad dejó de ser prevalente en el área de estudio, limitando así la continuidad del mismo (54).

#### **GLICOPROTEINA PRINCIPAL DEL PROMASTIGOTE (GP63).**

Uno de los antígenos de *Leishmania* más estudiados es la proteína GP63. Se trata de una glicoproteína de membrana de 63 a 68 kDa que se logró purificar de la superficie de promastigotes de *Leishmania major* mediante extracción con Tritón X-114 y cromatografía de intercambio iónico (59). Es una endopeptidasa dependiente de zinc que tiene su mayor actividad a pH ácido y es inhibida por fenantrolina y metales pesados (55,56). Esta proteína se expresa como una proteasa de superficie anfifílica que en el promastigote comprende cerca del 1% de la proteína celular. Esta proteína 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 (57). La glicoproteína se encuentra presente en los dos estadios del ciclo de vida del

parásito, aunque en el amastigote su expresión es fundamentalmente citosólica (58,59,60), interesadamente se ha mostrado sobreexpresión de estos genes en el estadio de amastigote (61). Se conoce la estructura primaria de GP63 en diversas especies de *Leishmania* y se sabe que existe gran homología entre ellas. Esta proteína 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 (50) 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 (62). La inmunización de ratones con *Salmonella typhimurium* y BCG acarreando GP63 (63,64,65) induce inmunidad protectora dependiente de la activación de linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1. También ha sido posible proteger a ratones mediante la administración de DNA plasmídico conteniendo el gene que codifica para GP63 (66).

Existen regiones de homología entre diferentes metaloproteínas, siendo la región de 161-173 y entre 304-308, los sitios de unión para el Zn con ligandos de histidil y ligandos de glutamil (67) tiene una masa molecular de 63 a 68 kDa, presenta actividad de proteasa, se encuentra en la superficie del parásito y esta el 1% de esta sobre la superficie del parásito (68). La GP63 se encuentra en ambos estadios del parásito, se ha identificado en *L. tropica*, *L. major*, *L. donovani*. Se expresan  $5 \times 10^3$  copias en cada promastigote y se encuentra unida a la membrana vía un glucosil fosfatidil inositol (GPI). La estructura primaria del péptido unido al GPI para la *L. major* es Asp-Gly-Gly-Asn-GPI. Ha sido clonado el gen de la GP63 y se ha logrado producir la proteína recombinante. Se han descrito propiedades biológicas de la GP63 posiblemente relacionadas con los mecanismos patológicos del parásito, como la capacidad de unirse al receptor de C3 en el macrófago (CD11b/18). Una vez dentro del macrófago, la actividad proteolítica de GP63 protege al parásito de la acción de las enzimas lisosomales, pues se ha demostrado que liposomas que contienen GP63 activa no son destruidos por los macrófagos (62). Entre los mecanismos de acción de la proteína se ha visto que inhibe la presentación de antígeno, ya que se ha demostrado que corta las moléculas CD4 (68), posteriormente de la incubación de linfocitos con esta proteína. Como la proteína se expresa en la superficie de los macrófagos puede inducir respuesta inmune citotóxica dependiente de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Se han identificado epitopos de células T en GP63 de *Leishmania major* (51,52) y se sabe que la respuesta inmune a esta proteína en el ratón se



encuentra controlada genéticamente (69, 70). En el modelo murino, se ha logrado inducir protección al administrar GP63 incluida en liposomas (62). Esta protección puede ser transferida además, a través de linfocitos T específicos a ratones susceptibles (62), por otro lado en el modelo murino, ha sido posible inducir protección, utilizando *Salmonella typhimurium aroA* como acarreador de GP63 de *Leishmania major* (64). Se han identificado péptidos sintéticos que corresponden a ciertas secuencias de aminoácidos de la proteína GP63 de *Leishmania*. Al menos uno de ellos, el péptido p183 que corresponde a una secuencia de residuos de la molécula GP63 de *L. major* es capaz de inducir exacerbación de la infección, este efecto se relaciona con la inducción de células Th2 (71).

#### **VECTORES ACARREADORES DE ANTIGENOS RECOMBINANTES.**

El uso de *Salmonella* como vector vivo tiene un potencial extraordinario en el campo de las vacunas. Entre las ventajas que representa su uso, se encuentra el hecho de que puede ser administrada por vía oral (72), lo cual es especialmente conveniente en los países subdesarrollados donde las condiciones de refrigeración, equipo, jeringas y personal entrenado suelen ser deficientes. Por otro lado, *Salmonella* estimula respuesta inmune local y sistémica, incluyendo la mediada por células contra los antígenos heterólogos que acarrea (73). Además, la utilización de *Salmonella* como vector de antígenos, ofrece la oportunidad de generar vacunas polivalentes pues es posible integrar distintos antígenos en diferentes *loci* del cromosoma. Se considera que *Salmonella typhi* es una sola "clona" sin gran variación antigénica y no contiene plásmidos de virulencia (74). Por esto, *Salmonella typhi* como acarreador de antígenos recombinantes, es una opción interesante para desarrollar una vacuna contra *Leishmaniasis*. Sin embargo, es necesario cumplir cuando menos con dos requisitos importantes. Por un lado, es indispensable la expresión estable de los antígenos recombinantes. Por otro, es necesaria una cepa de *Salmonella typhi* atenuada y segura. La expresión estable de los antígenos heterólogos se ha logrado al incorporarlos al cromosoma de la bacteria acarreadora. La cepa de *Salmonella typhi* CVD908, generada en el Centro Para el Desarrollo de Vacunas, Universidad de Maryland at Baltimore (UMAB, Baltimore, Maryland, EUA), es dependiente de aminoácidos aromáticos, que contiene mutaciones definidas en los *loci aroC* y *aroD* (75), lo cual causa la dependencia nutricional de la bacteria por metabolitos que no se encuentran en los tejidos de los mamíferos, por lo que no son capaces de sobrevivir en ellos. En ensayos clínicos esta cepa ha demostrado ser

inmunogénica y segura (76). Esta cepa fue construida mediante métodos de ingeniería genética y se cuenta con los plásmidos que permiten la recombinación homóloga en su cromosoma. *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 (77). Se ha logrado que *Salmonella typhi* CVD908 exprese de manera simultánea los factores de colonización CFA/I y CS3 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (78). *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 importante, en algunos voluntarios se identificaron linfocitos T citotóxicos dirigidos contra la CSP. (79). *Salmonella typhi* CVD908 ha sido utilizada como acarreador de GP63 de *Leishmania mexicana*. El candidato a vacuna *Salmonella typhi* CVD908ΔMGP63 tiene integrado en el cromosoma, en el locus *aroC*, el gene que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*. Esta cepa administrada por vía oral o parenteral en ratones es capaz de inducir inmunidad protectora, la cual se asocia a la inducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1. Este tipo de respuesta se demostró porque no se producen anticuerpos contra GP63 y los esplenocitos provenientes de ratones inmunes se activan *in vivo* en presencia de promastigotes fijados con formalina, produciendo IL-2 e IFN $\gamma$ , 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<sup>+</sup> citotóxicos, mediante ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr 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 demuestra que antígenos particulados, generalmente procesados por la vía exógena, son capaces de alcanzar moléculas del MHC de clase I.

#### SISTEMA DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES T7

El promotor T7 consta de una región continua que contiene el sitio de reconocimiento de la RNA polimerasa y el sitio de iniciación muy cercanos, a diferencia de otros promotores bacterianos, lo cual hace que el promotor sea muy pequeño, de aproximadamente 24 pb. La diferencia de tamaño del promotor T7 con los de *Escherichia coli*, hace que la T7 RNA polimerasa sea cinco veces más pequeña que las polimerasas de *Escherichia coli* (80).

La T7 RNA polimerasa es el producto de un gene del virus T7, tiene un peso molecular de 107,000, y se ha visto involucrada en la activación de genes tardíos. Es una enzima muy activa, que enlarga cadenas cinco veces más rápido que polimerasas de *Escherichia coli* (81). Este sistema de expresión de antígenos recombinantes se puede emplear en bacterias ya que la T7 RNA polimerasa es altamente selectiva y no reconoce promotores de la bacteria acarreadora. Sin embargo, si el producto del gen que esta bajo el control del promotor T7 es tóxico, es difícil evitar la lisis bacteriana, ya que existen bajos niveles de la T7 RNA polimerasa que se transcriben aun sin ser inducidos. La transcripción de la T7 RNA polimerasa es tan activa, que desplaza la transcripción de las otras RNA polimerasas.

Las cepas bacterianas recomendadas para trabajar con el sistema T7 son derivadas de *Escherichia coli* K12; como son *E. coli* HMS174 (F<sup>+</sup> OmpT r<sup>-</sup> K12 m<sup>+</sup> K12 Rif<sup>R</sup>) (82) y la cepa *E. coli* BL21 (F<sup>+</sup> OmpT rB<sup>+</sup>mB<sup>+</sup>) (83,84). La cepa de *E. coli* BL21 tiene la ventaja de presentar una deficiencia en *lon* proteasas, además de mostrar OmpT, que es una proteasa de membrana. *E. coli* HMS174 tiene la desventaja de no ser resistente a rifampicina, por lo que no es posible inhibir la transcripción de sus RNA polimerasas.

El bacteriófago DE3, es un derivado del fago  $\lambda$ , que tiene la región inmune del fago 21 y acarrea fragmentos de DNA que contienen el gen *lacI*, el promotor *lacUV5*, el gen *lacZ* y el gen para la T7 RNA polimerasa. La T7 RNA polimerasa está insertada dentro del gen *int* del bacteriófago DE3, por lo tanto este gen es inactivado. Cuando se infecta *E. coli* con el fago DE3 se requiere ayuda para la integración y salida de este gene dentro del cromosoma. El DE3 lisogénico está formado por el promotor *lacUV5*, bajo el cual está la T7 RNA polimerasa, por lo que es posible inducir la expresión de la T7 RNA polimerasa con IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto pyranosido). Por tanto, los plásmidos que contienen genes bajo el control del promotor T7, es posible lograr la expresión de éstos transformando en *E. coli* BL21(DE3); sin embargo, se han reportado inestabilidad de plásmidos en esta bacteria. La cepa *E. coli* BL21 es *recA*<sup>+</sup> y por tanto presenta baja eficiencia en la transformación (85).

## JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Las vacunas elaboradas a partir de bacterias que funcionan como "vectores vivos" son una alternativa muy interesante para la administración de antígenos proteicos. No obstante, existen todavía problemas técnicos que dificultan su desarrollo. Generalmente, los plásmidos son inestables en las bacterias, por lo que es necesario utilizar sistemas de integración cromosómica. Sin embargo, al integrar en el cromosoma el gene de interés, el nivel de transcripción disminuye notablemente, lo que afecta la inmunogenicidad de la proteína recombinante que acarrea la cepa bacteriana. En el la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UMI) hemos desarrollado cepas de *Salmonella typhi* atenuada que contienen integrado en su cromosoma genes heterólogos bajo el promotor *Tac*. Se eligió *Salmonella typhi* como acarreador porque induce respuesta inmune local y sistémica, es de fácil administración y es estable a temperatura ambiente. La cepa utilizada es *Salmonella typhi* CVD908, una mutante auxotrófica  $\Delta aroC \Delta aroD$ , que ha demostrado ser inmunogénica y segura en voluntarios humanos y por lo tanto, buen candidato para ser utilizada como vector. La infección por *Leishmania mexicana* en ratón es un buen modelo para evaluar este tipo de vacunas, pues se ha caracterizado que la respuesta protectora depende de la inducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1. Construimos la cepa *Salmonella typhi* CVD908 $\Omega$ MGP63, que expresa de manera estable una forma citosólica truncada de la proteína recombinante GP63 de *Leishmania mexicana* e induce respuesta inmune protectora de tipo Th1 contra el parásito, pues se produce IL-2 e IFN- $\gamma$  y no se detectan anticuerpos contra GP63 ni IL-4 o IL-10, y se inducen linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos contra la GP63 de *Leishmania mexicana*. No obstante, en el sistema de integración cromosómica la producción de la proteína recombinante disminuye notablemente, pues la bacteria acarreadora tiene una sola copia del gene heterólogo. Existen varias alternativas para incrementar la expresión de la proteína recombinante. Sin embargo, en este trabajo proponemos incrementar la producción de la proteína recombinante transcomplementando el gene que codifica para la GP63 bajo el promotor T7 mediante la RNA polimerasa T7. La ventaja que tiene este sistema es que, de funcionar adecuadamente, puede integrarse en el cromosoma haciéndolo más estable.

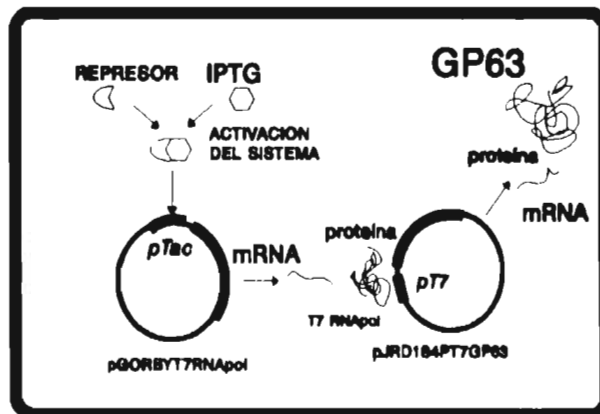
## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que la expresión de la proteína GP63 de *Leishmania mexicana* es ineficiente cuando el gene se encuentra integrado en el cromosoma de *Salmonella typhi*, es necesario diseñar un sistema que incremente la producción de proteína y con ello aumente su inmunogenicidad.

## HIPOTESIS.

La expresión de proteínas recombinantes disminuye notablemente cuando se utilizan sistemas de integración cromosómica. Utilizando un método de transcomplementación con una RNA polimerasa y el gene de interés bajo el control del promotor de esta polimerasa, se aumentará la transcripción y traducción de la proteína recombinante, incrementando con esto la inmunogenicidad.

## SISTEMA DE COMPLEMENTACION



### **OBJETIVO GENERAL.**

Obtener un sistema de expresión de la proteína GP63 de *Leishmania mexicana* en *Escherichia coli*, mediante transcomplementación del gene que codifica para la GP63 bajo el promotor T7 con la T7 RNA polimerasa.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Insertar el promotor T7 en un plásmido.
- Insertar el gene que codifica para GP63, bajo el control del promotor T7.
- Evaluar la expresión de la proteína GP63 bajo el control del promotor T7
- Amplificar mediante PCR el gene que codifica para la T7 RNA polimerasa.
- Evaluar la funcionalidad de la T7 RNA polimerasa
- Evaluar la expresión de la proteína GP63 en el sistema de complementación transformando *Escherichia coli* con dos plásmidos compatibles.
- Evaluar la respuesta humoral de ratones inmunizados con la bacteria *Escherichia coli* SY327, la cual contiene el sistema de complementación en plásmidos.
- Evaluar la presencia de linfocitos T dirigidos contra la GP63 en los ratones inmunizados con el sistema de complementación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Parásitos

*Leishmania mexicana mexicana* MHOM/MX/88/HRCJS (86) 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),  $\beta$ -mercaptoetanol y acidificado con HCl.

### Cepas bacterianas.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (GIBCO, BRL.)

*Salmonella typhi* CVD908. Mutante  $\Delta aroC \Delta aroD$  donada por el Dr. Myron Levine, Center for Vaccine Development, Universidad de Maryland, Baltimore, USA)(72)

*Salmonella typhi* CVD908 $\Omega$ MGP63. Contiene integrado en el *locus* el gene que codifica para la GP63 de *Leishmania mexicana*. Construida en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (87)

*Escherichia coli* BL21(DE3) (donada por el CVD, Universidad de Maryland, Baltimore, USA)

*Escherichia coli* SY327  $\lambda$ pir(88) (donada por el CVD, Universidad de Maryland, Baltimore, USA)

### Plásmidos

pUC19 (GIBCO,BRL.) Amp<sup>r</sup>

pUC19-GP63 (Construido en la UIMI, IMSS).

pJRD184. (Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>) (89)

pJRD184 $\Delta$ E. Se reporta en esta tesis.

pJRD184 $\Delta$ EPT7. Se reporta en esta tesis

pJRD184 $\Delta$ EPT7GP63. Se reporta en esta tesis.

pUC19-T7RNAPol. Se reporta en esta tesis.

pACYC184 (90)

pACYC184-T7pol. Se reporta en esta tesis.

pGORBY (Donado por el Dr. Myron Levine, CVD, Universidad de Maryland, Baltimore, USA) (73).Cml'

pGORBY-T7RNApol. Se reporta en esta tesis.

#### **Cultivo e inducción de cepas bacterianas.**

Se creció la bacteria en 5 ml de medio Luria-Bertani a 37°C, en presencia de ampicilina, de esta semilla se tomaron 200 µl y se inocularon en 10 ml de medio y después de 1 hr se indujo con 0.4 mM de IPTG por 3 hrs. Posteriormente, se centrifugó la bacteria, se lavó y resuspendió en solución salina isotónica (SSI).

#### **Ingeniería Genética.**

La manipulación de DNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook, Fritsch y Maniatis (91).

#### **Purificación de DNA plasmídico en pequeña escala.**

Se crecieron 3 ml de las cepas bacterianas por 24 hrs a 37°C en presencia de antibiótico (dependiendo del marcador de resistencia que les confirió el plásmido transformado en ellas: 100µg/ml de ampicilina o 20µg/ml de cloramfenicol, SIGMA). Se centrifugaron y se lavaron con SSI. El sedimento bacteriano se resuspendió en 200 µl de TELT (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 62.5 mM, LiCl 2.5 M y Tritón X-100 al 0.4% ). Se calentó a 100°C durante 90 seg. Al finalizar la lisis se colocó la mezcla de reacción en hielo durante 5 min, se centrifugó 8 min a 14,000 rpm. El sobrenadante de la reacción de lisis bacteriana se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el DNA plasmídico con 100 µl de isopropanol, las muestras se centrifugaron 5 min, el precipitado se lavó con etanol al 70%, se centrifugó y se resuspendió en 50 µl de agua inyectable.

#### **Purificación de DNA plasmídico en gran escala**

Se inocularon 5 ml de un cultivo bacteriano que se realizó durante toda la noche a 37°C y 200 rpm, en 400 ml de medio Luria-Bertani (L.B) suplementado con antibiótico. Se continuó durante 8 hrs a 200 rpm y 37°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm por 10 min



y se lavaron con SSI dos veces. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1.5 ml de glucosa 50mM, Tris-HCl 25 mM pH 7.6, EDTA 10 mM, después se adicionaron 6 ml de una solución de 10 mg/ml de lisozima disuelta en TE pH8 ( Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1mM pH 8) y 15 ml de una solución de SDS al 1% y NaOH 0.2 M, se mezclaron y se incubaron 10 min en hielo. La mezcla de reacción se centrifugó 10 min a 5,000 rpm, el sobrenadante se filtró a través de gasa estéril y se le adicionó 15 ml de isopropanol, después se incubó en hielo durante 5 min, La suspensión se centrifugó durante 5 min a 5,000 rpm, el sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en 2 ml de TE y se adicionaron 2 ml de LiCl seguido de una incubación en hielo durante 30 min. El tubo se centrifugó y el sobrenadante transfirió a un tubo con 10 ml (2.5 volúmenes) de etanol absoluto, se incubó 1 hora a -20°C y se centrifugó 10 min a 5,000 rpm. El sedimento se resuspendió en 500 µl de agua inyectable y se le adicionaron 100 µl de una solución de 10 µg/ml de RNAsa (SIGMA), seguida de una incubación a 37 °C durante 60 min. Se le adicionó un volumen (600 µl) de una solución de cloroformo-álcool isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm, la fase acuosa se separó para ser sometida dos veces más al mismo tratamiento. Después se adicionó 1/10 (50µl) de acetato de sodio 3M pH 7.0, se distribuyó en tres tubos Eppendorf y se les adicionó etanol hasta llenar el tubo. Las muestras se colocaron a -70°C durante toda la noche, después se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. El sedimento se lavó con 750 µl de etanol al 70%, y se concentró durante 5 min en una centrifuga con vacío (Heto). El DNA de cada tubo fue resuspendido en 200 µl de agua inyectable y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm.

#### **Digestión de DNA.**

Aproximadamente 100 ng de DNA plasmídico fueron depositados en tubos Eppendorf. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 50 µl durante dos hrs, adicionando 5 U de la enzima de restricción, 5 µl de amortiguador y 45 µl de agua estéril inyectable.

#### **Electroforesis.**

Las electroforesis se realizaron en agarosa (Ultra pure, GIBCO, BRL) al 1 %, en una cámara horizontal (Horizon 5-8, BRL), con 50 ng de DNA a 75 V (15V/cm<sup>3</sup>), durante 45 min utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 1X. La agarosa contenía 1 µg de bromuro de etidio, al

terminar el corrimiento el gel se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta para ser fotografiado.

#### **Purificación de fragmentos de DNA por GeneClean<sup>®</sup>.**

Se realizó de acuerdo al método descrito por Wilson (92). Se corrió un gel preparativo de agarosa al 1%, donde se colocó aproximadamente 200 ng de DNA, previamente digerido, con la enzima de interés, se corrió en una cámara horizontal (Horizon 5-8, BRL), con 50 ng de DNA a 75 V (15V/cm<sup>3</sup>), durante 45 min utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 1X, la banda correspondiente al fragmento de interés fue cortado de los geles de agarosa y depositado en tubos Eppendorf para su purificación mediante GeneClean<sup>®</sup>. Se agregaron 800 µl (3 volúmenes) de NaI 6 M, se incubaron a 56 °C hasta que la agarosa se disolvió, se le agregaron 5 µl de perlas de vidrio, se incubó en hielo durante 30 min (agitando el tubo frecuentemente), enseguida se centrifugó 1 min 6,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, las perlas de vidrio se lavaron tres veces con "New-Wash" (NaCl 50 mM, y etanol al 50% ), se resuspendieron después en 50 µl de agua estéril, se dejaron 20 min a 56 °C, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se separó en un tubo limpio. Las perlas se resuspendieron en 20 µl de agua inyectable y se incubaron 20 min más a 56 °C, se recuperó el sobrenadante y se verificó la presencia de DNA corriendo 2 µl de éste en un gel de agarosa al 1%.

#### **Ligación.**

En un tubo Eppendorf se mezclaron 50 ng del plásmido digerido más 100 ng del inserto, purificados por GeneClean<sup>®</sup>, a la mezcla se le agregaron 2 µl de amortiguador para enzima T<sub>4</sub> ligasa (GIBCO, BRL) y 1 µl de dicha enzima. Se llevó a un volumen total de 20 µl con agua estéril y se incubó a 16 °C toda la noche.

#### **Transformación bacteriana.**

Para preparar las células competentes una colonia de la bacteria correspondiente, se cultivó toda la noche a 37° C, 200 rpm, en 10 ml de medio Luria, de esta semilla se tomó 1 ml y se colocó en 200 ml de medio, se incubó bajo las mismas condiciones hasta que la densidad óptica a 600

nm fue de 0.6, entonces se agregaron 600 ml de medio y se mantuvo bajo las mismas condiciones por 15 minutos. El medio conteniendo la bacteria se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, el sedimento bacteriano se resuspendió en 250 ml de 0.1 M de CaCl<sub>2</sub> por 2 hrs, posteriormente se centrifugó y la pastilla bacteriana se resuspendió en 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y glicerol al 10% a 0°, se hicieron alícuotas de 100 µl en tubos Eppendorf estériles. Las alícuotas se mezclaron con la respectiva mezcla de ligación problema y las restantes se guardaron a -70°C. Las bacterias competentes se incubaron 30 min con la mezcla de ligación, posteriormente se les dio un choque térmico de 42°C durante 60 seg. Las bacterias fueron incubadas 5 min en hielo, a esta mezcla se le añadió 1 ml de medio SOC (bacto-triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5 mM, glucosa 20mM, pH 7.0) y se incubó 30 min a 37° C, 200 rpm; 100 µl de la suspensión bacteriana se sembraron en cajas con medio Luria conteniendo el antibiótico correspondiente (ampicilina, tetraciclina o cloranfenicol).

#### **Identificación de las colonias transformadas.**

Las colonias transformantes se seleccionaron por su crecimiento en BHI conteniendo el antibiótico de interés. Las colonias resistentes se sembraron en placas de medio Luria, de donde se aislaron y transfirieron a papel de nitrocelulosa para rastrear el gene insertado mediante hibridación ("colony blot"), las colonias positivas se sembraron en 3 ml de medio y se incubaron a 37 °C, en agitación orbital 200 rpm, toda la noche. Posteriormente se cosecharon y lavaron 1 vez con SSI. Posteriormente, se realizó una extracción de DNA plasmidico y se verificó su identidad con enzimas de restricción.

#### **Obtención del gen de la T7 RNA polimerasa**

A partir de la secuencia publicada (93) se obtuvo el gene que codifica para la T7 RNA polimerasa mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (94), empleando DNA cromosómico de *Escherichia coli* BL21(DE3). Los oligonucleótidos iniciadores o "primers" empleados fueron, para el extremo 5' la secuencia **CgggggATCCAggTACgA TTTACTAACTggAAgAggCACT** en la cual se incluyó un sitio BamHI; para el extremo 3', la secuencia **CgggggATCCTT ACgCgAACgCgAAgTCCgACTCTAAgAT**, en el cual se incluyó un sitio BamHI. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador (Robocycler, Stratagene), bajo

las siguientes condiciones:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
DNA cromosomal de <i>Escherichia coli</i> BL21DE3	0.1 µg
"iniciadores"	50 µg
mezcla de desoxinucleótidos	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.3 mM
Taq DNA polimerasa	1 U
Buffer de reacción 10X	10 µl
Agua inyectable c.b.p.	100 µl

Número de ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	4	55	2	72	3
29	95	2	55	2	72	3
1	95	2	55	2	72	5

#### Extracción de DNA genómico.

Se realizó a partir de  $1 \times 10^9$  bacterias cosechadas y lavadas dos veces con SSI. Se resuspendieron en 5 ml de amortiguador lisis (Tris 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS al 1%), se les adicionó 200 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 56°C, toda la noche. Posteriormente, se les adicionó 50 µl de RNAasa (1 mg/ml) incubando 2 hrs a 37°C con agitación. Después se adicionó a la mezcla un volumen de fenol pH 7.2 y se agitó durante 20 min lentamente y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm, transfiriendo la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionó 1 volumen de fenol/cloroformo (24:23) se agitó nuevamente durante 20 min y se centrifugó, se recuperó la fase acuosa pasándose a un tubo nuevo al que se le agregó 1 volumen de cloroformo, agitando 20 min y se centrifugó como ya se indicó. Posteriormente, se adicionaron 2 volúmenes

de etanol absoluto frío, se agitó vigorosamente hasta obtener un agregado de DNA, se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm y se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 500  $\mu$ l de agua estéril.

#### **Cuantificación de DNA**

El DNA se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 nm. Las muestras se diluyeron 1:100 en agua inyectable. Las concentraciones de DNA se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. de DNA} = 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dil} \times \text{D.O a 260 nm}$$

#### **Hibridación de DNA.**

El DNA genómico bacteriano se digirió toda la noche con la enzima de restricción de interés. Posteriormente, se realizó el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% a 25 V en una cámara Horizon (BRL) por aproximadamente 12 hrs en amortiguador de corrimiento TBE 0.5X (la agarosa contenía 0.5  $\mu$ g de bromuro de etidio). Después el gel se sumergió en amortiguador desnaturizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1 M) durante 30 min, se lavó con agua desionizada y se sumergió en amortiguador neutralizante (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 3 M pH= 7.4), por 30 min. El DNA se transfirió a papel de nitrocelulosa. La sonda empleada en la hibridación se preparó de acuerdo al método de "Random Primer". Aproximadamente 10  $\mu$ g de DNA, se desnaturizó por ebullición durante 10 min y se transfirió a hielo por 5 min, posteriormente se adicionaron 3  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos (sin CTP), 2  $\mu$ l de amortiguador para la polimerasa Klenow, 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -CTP marcada con  $^{32}\text{P}$ , 1  $\mu$ l de dicha enzima y se llevó a 20  $\mu$ l de reacción con agua estéril. Se incubó 2 hrs a 37°C. Después de lo anterior la sonda marcada se purificó mediante una columna de Sephadex G-50 (Sigma). La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X , DENHARDT al 10%, SDS al 20%), con la sonda radioactiva (previamente desnaturizada), se incubó toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana 8 veces durante 30 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso ante una película (Kodak) durante 24 hrs.

#### **Detección de DNA por la técnica de "Southern blot"**

La hibridación de DNA genómico con una sonda de DNA plasmídico se realizó de acuerdo al método descrito por Southern (95). Se digirieron 10 µg de DNA cromosomal, toda la noche con la enzima de restricción de interés y se corrió un gel de agarosa al 0.7 % conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml) en 0.5 X de TBE (Tris-HCl pH 8.0, Ac. Borico, EDTA). El gel se colocó en solución desnaturante de DNA por 45 minutos ( NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 N), con agitación constante. Se lavó el gel con agua desionizada y luego se neutralizó, con solución de lavado (Tris 1M pH 7.4, NaCl 1.5 M) por 30 minutos, a temperatura ambiente, se repitió la operación por 15 minutos. Se transfirió el DNA a una membrana de nylon por capilaridad empleando como buffer de transferencia una solución de 10X SSC. Se lavó el papel con una solución 6X de SSC. La membrana de nylon con el DNA fue homeada por 2 hr a 80 °C. La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X , DENHARDT 10%, SDS 20%), y la sonda radioactiva (previamente desnaturizada) incubando toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana 8 veces durante 30 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0,5 X), y se expuso en una película (Kodak) durante 24 hrs.

#### **Extracción de RNA.**

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de medio Luria y se dejó crecer toda la noche. se centrifugó y la pastilla bacteriana se lavó con solución salina, se resuspendió en SSI y se ajustó espectrofotométricamente a  $1 \times 10^9$  en 100 µl de TE estéril, se adicionó 1 ml Trizol (Gibco BRL), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionó 0.2 ml de cloroformo por ml de Trizol. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugó a 12,000 x g por 15 min, se separó la fase acuosa, se mezcló con un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo. Se centrifugó y separó la fase acuosa, la cual se precipitó con 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol, se incubó por 10 minutos en frío y centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4°C. El RNA total precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% frío, se resuspendió en agua estéril libre de RNAsa y se midió la concentración en el espectrofotómetro a 260 nm.

#### **Detección de mRNA, por "Northern blot".**

El RNA total purificado por la técnica de Trizol, se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 nm, y se corrieron en un gel de agarosa al 1% (1 gr de agarosa, buffer de corrimiento 1X, formaldehído 2.2 M) 50 µg de RNA total, se realizó corrimiento previo de 5 min a 5 v/cm. Se corren las muestras hasta 3/4 del gel total. Se transfiere la muestra por difusión capilar a una membrana de nylon y se incuba a 68°C con una sonda marcada radiactiva. La sonda empleada en la hibridación se preparó de acuerdo al método de "Random Primer". Aproximadamente 10 µg de DNA, se desnaturalizó por ebullición durante 10 min y se transfirió a hielo por 5 min, posteriormente se adicionaron 3 µl de mezcla de nucleótidos (sin CTP), 2 µl de amortiguador para la polimerasa Klenow, 5 µl de α-CTP marcada con <sup>32</sup>P, 1 µl de dicha enzima y se llevó a 20 µl de reacción con agua estéril. Se incubó 2 hrs a 37°C. Después de lo anterior la sonda marcada se purificó mediante una columna de Sephadex G-50 (Sigma). La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X, DENHARDT al 10%, SDS al 20%), con la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada), se incubó toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana 8 veces durante 30 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso ante una película (Kodak) durante 24 hrs.

#### **TÉCNICAS DIVERSAS**

##### **Expresión de la glicoproteína GP63.**

La expresión de GP63 recombinante se verificó por inmunopunto. Aproximadamente  $1 \times 10^9$  bacterias transformadas con el gene que codifica para GP63 fueron centrifugadas y la pastilla se disolvió en 500 µl de PBS, se sonicó y centrifugó. La muestra se transfirió a membranas de nitrocelulosa mediante un aparato de vacío. El papel se bloqueó con PBS-gelatina al 2 % durante 2 hrs a 37°C y se incubó 2 hrs con el suero hiperinmune de conejo contra el extracto de proteínas de *Leishmania*, seguido de una incubación de 2 hrs con un anticuerpo de cabra conjugado a peroxidasa (Sigma). Se reveló la reacción inmunológica con α-4-Cloro Naftol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma), realizándose lavados entre las incubaciones con PBS-Tween 20 al 0.01 % a 37°C.

### **Cuantificación de proteínas**

Se realizó por el método descrito de Lowry (96) empleando albúmina sérica bovina (Sigma Co) como estándar.

### **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

La electroforesis se realizó según la técnica descrita por Laemmli (97). Los geles se corrieron en cámaras verticales (LKB Instruments), en presencia de SDS, en condiciones reductoras y un sistema de amortiguador discontinuo. El gel introductor contenía una concentración final de 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8. El gel separador tenía una concentración de 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en Tris-HCl 0.35 M a pH 8.8. Las bacterias se ajustaron espectrofotométricamente a  $1 \times 10^9$ /ml y la cantidad de proteína se midió por el método de Lowry. Las muestras se resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 8.8, SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%), las muestras se hirvieron por 10 minutos y se corrieron a 30 mA por 6 hrs a temperatura ambiente. El amortiguador de corrimiento contenía Tris 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%.

### **Inmunoelectrotransferencia ("Western blot").**

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin (98). El papel se bloqueó con PBS-leche 5% por 2 horas. Posteriormente se incubó con el suero hiperinmune de conejo dirigido contra un extracto crudo de proteínas de *Leishmania* por 2 hrs, seguido de esto se incubó con anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma). La reacción inmunológica se reveló con  $\alpha$  4-Cloro Naftol- $H_2O_2$ . Entre las incubaciones se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.01%. Todo lo anterior se realizó a una temperatura de 37°C.



#### **Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).**

Se realizó de acuerdo al método de Engvall (99). Se recubrieron placas para microtitulación con 5 µg y 10 µg de un extracto protéico de *Leishmania mexicana*, para lo cual se resuspendió en buffer de carbonatos pH 9.5, y se incubó por 2 hrs a 37 °C, y posteriormente se dejaron toda la noche a 4 °C. Para bloquear se adicionaron 100 µl/pozo de una solución de PBS-Leche al 5%, por 1 hr. Se le adicionó el 1er. anticuerpo diluido 1:500 en PBS-leche 5%. Se incubó la placa a 37 °C por 2 hrs, y se adicionó el segundo anticuerpo diluido 1:1000, se incubó 2 hrs. Se adicionó como sustrato O-fenilendiamina de un stock de 6mg/12ml, para preparar la mezcla se empleó buffer de citratos de pH 5.6. Se paró la reacción a los 10 minutos de incubación adicionando 50 µl por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se midió la absorbancia a 492 nm. Entre cada paso se realizaron 4 lavados con una mezcla de PBS-Tween 20 al 0.1%

#### **Obtención de suero hiperinmune de conejo contra proteínas de *Leishmania mexicana*.**

Se obtuvo suero hiperinmune de conejo contra proteínas de *Leishmania mexicana*. Se utilizó un conejo de la cepa Nueva Zelanda el cual fue inmunizado por vía interescapulovertebral con un extracto crudo de *Leishmania mexicana*. Se le administró una dosis cada semana de 1 mg/ml en 500 µl de SS mezclados con 500 µl de adyuvante completo de Freund (SIGMA) durante 12 semanas. El conejo se sangró el día cero para obtener el suero control, el día veinte y treinta. La titulación de anticuerpos se realizó en la semana 12 mediante ELISA. Las placas se sensibilizaron con 10 µg/ml de antígeno en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 1 hr a 37°C. La placa se bloqueó con PBS-SFB al 5% por 2 hr a 37°C. El suero de conejo se agregó por duplicado en cinco diluciones (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700 y 1:8100) y se incubó por 2 hr a 37°C. Finalmente la placa se incubó con un suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (SIGMA) durante 1 hr a 37°C. Posteriormente se agregó el sustrato OPD-peróxido de hidrógeno, se estabilizó el color con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó la D.O. a 490 nm. Entre las incubaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01%. Para utilizar este suero hiperinmune en la evaluación de la producción de GP63 por *Salmonella typhi* CVD908, se adsorbió con *Escherichia coli*, para lo cual se incubó el suero con 1 x 10<sup>9</sup> bacterias/ml por 2 horas y se eliminó la pastilla bacteriana por centrifugación.

#### **Obtención del antígeno de *Leishmania mexicana*.**

Se obtuvo antígeno crudo de *Leishmania* modificando el método de Bouvier (55). Un cultivo de *Leishmania mexicana* en fase logarítmica se cosechó por centrifugación y se lavó dos veces en un amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 7.4. Los parásitos fueron sometidos a sonicación y las membranas fueron colectadas por ultracentrifugación a 60,000 rpm por 45 minutos. La pastilla conteniendo las membranas, se solubilizó con Tritón X-114 a 4°C (100), y finalmente, fue sometida a un gradiente de sacarosa. La composición del antígeno crudo se verificó por SDS-PAGE.

#### **Estimulación *in vitro* de linfocitos.**

Grupos de 5 ratones BALB/c se inmunizaron con *Escherichia coli* SY327 transformada con los plásmidos pGORBYT7 RNA polimerasa y pJRD184PT7GP63. Los ratones recibieron 100 ul de una dosis de  $1 \times 10^6$  bacterias/ml. Los ratones recibieron 4 inmunizaciones y siete días después de la última dosis se preparó una suspensión de esplenocitos por medio de disgregación del bazo en tela de organza. Los eritrocitos se eliminaron mediante el empleo de un amortiguador de lisis (0.15 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0 mM de  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH= 7.4) durante 3 minutos. Los esplenocitos se lavaron con solución de HANKS (Gibco), y se ajustaron a  $3 \times 10^6/10$  ml de RPMI complementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina y piruvato de sodio, 100 ul de las células se colocaron en placas de cultivo, con 50  $\mu\text{g/ml}$  y 25  $\mu\text{g/ml}$  de un extracto crudo de proteínas de *Leishmania mexicana*. Los cultivos se incubaron 3 días a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Dieciocho hrs antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina por pozo. Las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio y la incorporación del material radiactivo se cuantificó en un contador de Centelleo Líquido (Beckman).

## RESULTADOS

### OBTENCIÓN DE UN SUERO HIPERINMUNE CONTRA LA GP63.

Para evaluar la expresión de la GP63 en las diferentes construcciones, se inmunizó un conejo de la cepa Nueva Zelanda, de aproximadamente 3 Kg de peso, con un extracto de proteínas de *Leishmania mexicana* obtenidas mediante extracción con Triton X-114. En la **Figura No.1** se muestran los niveles de anticuerpos presentes al final del esquema de inmunización evaluados por ELISA, para lo cual se sensibilizaron placas de microtitulación con 10 µg/ml de proteínas de *leishmania mexicana*. El suero de conejo se evaluó por duplicado en cinco diluciones (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700 y 1:8100). En la **Figura No.1** se muestra el título de anticuerpos generados, donde se observa un aumento de 6 veces comparando con el control en la dilución 1:100. En la dilución 1:8100 en el anticuerpo hiperinmune se detecta un aumento de 10 veces comparado con el suero preinmune.

### OBTENCIÓN DEL GENE QUE CODIFICA PARA GP63 BAJO EL PROMOTOR T7.

#### a. Obtención del plásmido pJRD184EcoRI.

El plásmido pJRD184 (3.8 Kb) es un derivado de pBR322 que carece de promotores y contiene varios sitios de restricción únicos, entre ellos EcoRI, estos sitios son útiles para insertar fragmentos de DNA. Se digirió el plásmido con EcoRI, se trató con la DNA polimerasa Klenow, se autoligó y se rastreó la presencia de clonas carentes del sitio EcoRI. En la **Figura No.2** se muestra en el carril 3 y 4 digestiones de una clona carente del sitio EcoRI, con las enzimas EcoRV-EcoRI y KpnI-EcoRI respectivamente, donde al estar ausente el sitio EcoRI, se obtiene el plásmido linearizado solo por una enzima, que corresponde a un tamaño de 3.8 Kb. El plásmido resultante se denominó pJRD184ΔEcoRI.

#### b. Obtención del plásmido pJRD184ΔE-PT7

El plásmido que perdió el sitio EcoRI fue digerido con PstI-SaeI (posiciones 1.4 y 1.3 Kb) donde se insertó el promotor T7. El oligonucleótido sintético tiene la secuencia siguiente:

NOMBRE	BamHI	PROMOTOR T7	EcoRI	SacI
Iniciador 1	G	CTAATACGACTCACTATAGGGA	GAATTC	GAGCT
Iniciador 2	ACGTC	GATTATGCTGAGTGATATCCCT	CTTAAG	C

de tal manera que el plásmido resultante pJRD184ΔE-PT7 tiene un sitio EcoRI en la posición 1.4 Kb lo cual se presentan en la **Figura No. 2**. En el carril 8 se muestra la digestión de la clona con EcoRI, la regeneración de este sitio obteniéndose un fragmento de 3.8 Kb. Al digerir el plásmido pJRD184ΔE con PstI y SacI e insertar el promotor T7 se eliminó también un sitio KpnI, que se encontraba en la posición 1.3 Kb, lo cual se comprobó mediante digestión según se observa en la **Figura No.2**, en el carril 9 donde al estar ausente el sitio KpnI, no hay digestión.

#### c. Obtención del plásmido pJRD84ΔE-PT7GP63

En el sitio EcoRI del plásmido pJRD184ΔE-PT7 (posición 1.4 Kb), se insertó el gene de la forma madura de la GP63 (1.5 Kb), el cual fue obtenido a partir de pUC19-GP63 y purificado por GeneClean<sup>®</sup>. El plásmido resultante se denominó pJRD184ΔE-PT7GP63. En la **Figura No.3** se muestran dos clonas que contienen el gene de GP63 bajo el promotor T7. La orientación del gene se determinó mediante digestión con ClaI. Debido a que el gene de GP63 tiene un sitio ClaI en la posición 1.2 Kb los fragmentos generados los fragmentos generados son de 1.67 y 3.68 Kb según se muestra en la **Figura No.3**. Al digerir las clonas con EcoRI se genera un fragmento de 1.5 Kb y otro de 3.8 Kb, lo cual se muestra en los carriles 2 y 5. La enzima PstI se encuentra presente en la GP63 y en el plásmido pJRD184ΔE-PT7, por lo cual se generan 2 fragmentos que son de 0.2 y 5.2 Kb, lo cual se ilustra en los carriles 3 y 6, el fragmento de 0.2 Kb, no se observa, pero si las bandas que corresponden a 5.2 Kb.

#### d. Expresión de la GP63 recombinante de *Leishmania mexicana* bajo el promotor T7.

La expresión de la proteína GP63 recombinante se avaluó en *Escherichia coli* BL21DE3, la cual tiene integrado el gene de la T7 RNA polimerasa en su cromosoma. La expresión de GP63 recombinante se verificó por inmunopunto en diversas clonas transformadas para identificar las mejor productora. En la **Figura No. 4**, se muestra la presencia de proteína GP63 recombinante en

6 clonas productoras de la proteína, lo cual se compara con los cuadros 3 y 4 donde se colocó extracto crudo de proteínas de *Escherichia coli* BL21DE3, donde se ve la ausencia de la proteína recombinante. Para determinar el tamaño de proteína GP63 recombinante se realizó inmunoelectrotransferencia. A partir de una pastilla bacteriana de *Escherichia coli* BL21DE3/pJRD184T7GP63 inducida con IPTG de  $1 \times 10^9$  en 500  $\mu$ l, se tomaron 50  $\mu$ l (conteniendo  $1 \times 10^8$  bacterias) y se diluyeron en amortiguador de muestra. Los geles se corrieron en presencia de SDS, en condiciones reductoras y un sistema de amortiguador discontinuo. La **Figura No.5** muestra un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie. El patrón electrofético del extracto crudo de proteínas de *Escherichia coli* BL21DE3 transformada con el plásmido pJRD184 $\Delta$ E-PT7GP63 no parece diferir del observado en *Escherichia coli* BL21DE3. Sin embargo, al transferir las proteínas a papel de nitrocelulosa y revelar con el anticuerpo de conejo contra proteínas de *Leishmania mexicana* se observa una banda extra en las clonas transformadas con el plásmido que contiene el gene de la GP63, según se muestra en la **Figura No.5**. Las bandas que aparecen en las clonas no transformadas se deben a reactividad cruzada del anticuerpo de conejo que reconoce proteínas de *Escherichia coli*. También se verificó la presencia de mRNA para la GP63 mediante hibridación RNA-DNA o "Northern blot". Se purificó RNA a partir de *Escherichia coli* BL21DE3 transformada con pJRD184 $\Delta$ E-PT7GP63, se sometió a electroforesis en agarosa, se transfirió a papel de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda de DNA conteniendo el fragmento de la GP63 de 1.5 Kb obtenido por digestión de pUC19-GP63 con EcoRI y marcada con  $^{32}$ P. En la **Figura No.6** se muestra en el carril 1, el RNA total de *Escherichia coli* BL21DE3; carril 2, RNA total de *Escherichia coli* BL21DE3/pJRD184PT7GP63, inducidas con IPTG, lo cual como se puede ver indica la presencia de mRNA, en la clona que contiene el gene para la GP63. Sin embargo también se puede observar la degradación del mensajero debido posiblemente a la cantidad de este que se está produciendo por la inducción con el IPTG.

#### **OBTENCION DE LA T7 RNA POLIMERASA BAJO EL PROMOTOR *lac*.**

##### **a. Amplificación T7 RNA polimerasa.**

El gene que codifica para la T7 RNA polimerasa se obtuvo a partir de DNA genómico de *Escherichia coli* BL21DE3 mediante de PCR. Con los "iniciadores" empleados para la amplificación de la T7 RNA polimerasa se generaron sitios BamHI en ambos extremos. En la

**Figura No.7** se muestran los productos del PCR, que muestran un gene de 2.7 Kb, que corresponde al tamaño esperado.

#### **b. Clonación del gene de la T7 RNA polimerasa**

El gene de la T7 RNA polimerasa se insertó en el sitio BamHI de pUC19, para lo cual el producto de PCR y el plásmido pUC19 se digirieron con esta enzima. Las colonias resistentes ampicilina se rastrearon con una sonda de T7 RNA polimerasa (producto de PCR) marcada con <sup>32</sup>P. Se obtuvo el DNA plasmídico de las colonias positivas y se digirió con enzimas de restricción para identificar plásmidos conteniendo el inserto en la orientación correcta. En la **Figura No.8**, se muestra el mapa de restricción del plásmido resultante pUC19-T7pol. Considerando que pUC19 tiene un sitio NdeI en la posición 0.4 Kb y la T7 RNA polimerasa tiene un sitio en la posición 2.6 Kb. Los productos esperados cuando se digiere el plásmido con NdeI son de 0.4 y 5.0 Kb cuando el inserto se encuentra en la orientación más, lo cual se muestra en la **Figura No.8**, carril 4. El gene T7 RNAPol contiene un sitio HpaI, y un sitio único SmaI, que se localiza en el pUC19 por lo cual la clona al ser digerida con estas enzimas de manera independiente nos genera un fragmento que corresponde a 5.4 Kb lo cual se muestra en el carril 3 y 5 respectivamente. La digestión con PvuII, nos genera 2 fragmentos donde el fragmento de 3.0 kb corresponde al promotor lac y la T7 RNAPol, y el fragmento de 2.4 corresponde al resto del pUC19, lo cual se muestra en el carril 1, en el carril 2 se muestran dos bandas que se encuentran enzimadas, donde una corresponde al gene de la T7 RNA pol y la otra banda al pUC19.

#### **c. Expresión de mRNA de la T7 RNA polimerasa.**

La clona de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pUC19-T7pol, se creció en presencia de IPTG para inducir la expresión de la T7 RNA polimerasa, se extrajo el RNA total para rastrear el mRNA se empleó el gene de la T7 RNA polimerasa marcado con <sup>32</sup>P, el resultado se muestra en la **Figura No.9**. Donde como observamos al incrementar la cantidad del mRNA mensajero presente en el carril se ve más el efecto de la degradación del mRNA lo cual nos indica posiblemente una sobre expresión de esta proteína recombinante y con ello un incremento en la degradación de ésta. En la columna 1,2,3 y 4, se encuentra el RNA total que corresponde

Figura No.7 se muestran los productos del PCR, que muestran un gene de 2.7 Kb, que corresponde al tamaño esperado.

#### **b. Clonación del gene de la T7 RNA polimerasa**

El gene de la T7 RNA polimerasa se insertó en el sitio BamHI de pUC19, para lo cual el producto de PCR y el plásmido pUC19 se digirieron con esta enzima. Las colonias resistentes ampicilina se rastrearon con una sonda de T7 RNA polimerasa (producto de PCR) marcada con  $^{32}\text{P}$ . Se obtuvo el DNA plasmídico de las colonias positivas y se digirió con enzimas de restricción para identificar plásmidos conteniendo el inserto en la orientación correcta. En la Figura No.8, se muestra el mapa de restricción del plásmido resultante pUC19-T7pol. Considerando que pUC19 tiene un sitio NdeI en la posición 0.4 Kb y la T7 RNA polimerasa tiene un sitio en la posición 2.6 Kb. Los productos esperados cuando se digiere el plásmido con NdeI son de 0.4 y 5.0 Kb cuando el inserto se encuentra en la orientación más, lo cual se muestra en la Figura No.8, carril 4. El gene T7 RNAPol contiene un sitio HpaI, y un sitio único SmaI, que se localiza en el pUC19 por lo cual la clona al ser digerida con estas enzimas de manera independiente nos genera un fragmento que corresponde a 5.4 Kb lo cual se muestra en el carril 3 y 5 respectivamente. La digestión con PvuII, nos genera 2 fragmentos donde el fragmento de 3.0 kb corresponde al promotor lac y la T7 RNAPol, y el fragmento de 2.4 corresponde al resto del pUC19, lo cual se muestra en el carril 1, en el carril 2 se muestran dos bandas que se encuentran enzimadas, donde una corresponde al gene de la T7 RNA pol y la otra banda al pUC19.

#### **c. Expresión de mRNA de la T7 RNA polimerasa.**

La clona de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido pUC19-T7pol, se creció en presencia de IPTG para inducir la expresión de la T7 RNA polimerasa, se extrajo el RNA total para rastrear el mRNA se empleó el gene de la T7 RNA polimerasa marcado con  $^{32}\text{P}$ , el resultado se muestra en la Figura No.9. Donde como observamos al incrementar la cantidad del mRNA mensajero presente en el carril se ve más el efecto de la degradación del mRNA lo cual nos indica posiblemente una sobre expresión de esta proteína recombinante y con ello un incremento en la degradación de ésta. En la columna 1,2,3 y 4, se encuentra el RNA total que corresponde

alas colonias de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que no contienen el gene para la T7 RNA pol. donde no hay presencia de mRNA para esta polimerasa en ninguna de las 4 concentraciones.

#### **d. Subclonación de la T7 RNA polimerasa en el plásmido pGORBY.**

Con el propósito de tener el sistema de complementación T7 RNA polimerasa-promotor T7 en plásmidos compatibles, la T7 RNA polimerasa se subclonó en los plásmidos pACY184 y pGORBY. pACY184 tiene el origen de replicación del plásmido p15A y pUC19 el ColE1. El plásmido pGORBY es un derivado de pKTN701, cuyo origen de replicación R6K, es dependiente del factor  $\pi$ . Este plásmido se transforma en *Escherichia coli* SY327 $\lambda$ pir. pGORBY es un plásmido suicida que contiene el alelo  $\Delta$ aroC de *Salmonella typhi* y por lo tanto capaz de integrarse en el cromosoma de esta bacteria por recombinación homóloga. Este plásmido ha sido modificado, de tal manera que contiene el promotor *Tac* y el "polylinker" de pKK223-3 en medio del locus  $\Delta$ aroC. Por tanto, al ser compatible con pUC19, permite hacer experimentos de transcomplementación e integrar en el cromosoma.

El gene de la T7 RNA polimerasa se obtuvo a partir pUC19-T7 RNA pol y se subclonó en el sitio BamHI del plásmido pGORBY. En el plásmido resultante pGORBY-T7 RNA pol, se verificó la orientación del gene mediante digestión con la enzima KpnI, la **Figura No.10** presenta los fragmentos esperados. La funcionalidad de la T7 RNA polimerasa se evaluó mediante "Northern blot" (**Figura No.11**). Donde se muestra una disminución en la expresión del mRNA, y con ello una disminución en la degradación del mensajero, lo cual es posible explicar debido al origen de replicación, el cual para el pUC19 es de aproximadamente 700 copias por bacteria, mientras que para pGORBY es de 7 copias por bacteria aproximadamente. Al haber mayor expresión del mensajero para la polimerasa se aumenta la degradación de ésta (**Figura No.12**).

#### **e. Cotransformación del plásmido pJRD184PT7GP63 y pGORBY-T7pol**

Los plásmido pJRD184PT7GP63 y pGORBYT7pol fueron cootrasformados en *Escherichia coli* SY327 $\lambda$ pir. en las colonias resistentes a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol se verificó la expresión de la proteína GP6.3 por la técnica de ELISA. Las cepas bacterianas se crecieron en medio Luria-Bertani y  $1 \times 10^8$  bacterias se rompieron por sonicación. Con el extracto crudo bacteriano se sensibilizaron placas de microtitulación con 10  $\mu$ g/ml de proteína y se revelaron con



el suero de conejo contra proteínas de *Leishmania mexicana*. En la **Figura No.14** se compara la expresión de GP63 en diferentes cepas bacterianas. Puede observarse que en el sistema de complementación en plásmidos, la expresión de GP63 es mejor que en *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 que tiene integrado en el cromosoma el gene que codifica para GP63. Se verificó la presencia de ambos plásmidos con sondas marcadas <sup>32</sup>P, y se evaluó la expresión de mRNA de la GP63 por medio de "Northern blot" (**Figura No.13**). Lo cual nos indica la presencia del mensajero para la GP63 recombinante, además de detectar la presencia de la proteína.

#### **EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE COMPLEMENTACIÓN.**

Se inmunizaron ratones BALB/c i.p. con 100 ul de *Escherichia coli* SY327 transformada con pJRD184PT7GP63 y pGORBYT7pol, e inactivadas con acetona. Como controles se incluyeron ratones inmunizados oralmente con *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63, así como animales inmunizados con *Escherichia coli* BL21DE3 transformada con pJRD184PT7GP63. Siete días después se obtuvieron esplenocitos y se cultivaron en presencia de un extracto protéico de *Leishmania mexicana*. La activación de los linfocitos se evaluó mediante un ensayo de incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina. En la **Figura No.16** se compara la respuesta proliferativa, en CPM, que se obtuvo con las diferentes cepas bacterianas. Puede observarse que la mejor activación se presentó con la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3)-GP63. Por último, se determinaron anticuerpos contra GP63 en los ratones inmunizados con las cepas señaladas. En la **Figura No.15** se presentan las D.O. que se obtuvieron por el método de ELISA al día siete después del esquema de inmunización, donde se detectaron anticuerpos contra porinas de las cepas. La mejor respuesta de anticuerpos se presentó al inmunizar con la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3). No se detectaron anticuerpos dirigidos contra la GP63, pero si se generó respuesta proliferativa específicas para la GP63, demostrada en ensayos de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina.

## DISCUSION.

Muchas cepas de *Salmonella* se han construido para ser utilizadas como acarreadoras de antígenos. La idea es que estos "vectores vivos" produzcan una o varias proteínas recombinantes de algún microorganismo y que sean capaces de inducir protección contra éste. Se ha demostrado que la inmunización con estas "quimeras" es una manera eficiente y segura de generar respuesta inmune local (mucosas) y sistémica, tanto contra *Salmonella* como contra el antígeno heterólogo (71,101,102,103,104). La utilización de *Salmonella* como acarreador implica la introducción de genes "extraños" a la bacteria, generalmente insertados en plásmidos. Estos plásmidos habitualmente llevan genes de resistencia a antibióticos, que facilitan la identificación y manipulación de las clonas. La mayoría de los plásmidos utilizados son estables *in vitro*, cuando la bacteria se crece con el antibiótico y en ocasiones aún en ausencia de éste. Sin embargo, cuando falta la presión selectiva del antibiótico *in vivo* los plásmidos son inestables y se pierden rápidamente. De tal manera que, para tener una vacuna eficiente a partir de una bacteria acarreadora, es necesario contar con un sistema que permita la expresión estable de la proteína recombinante heteróloga; porque además, sería inaceptable que la aplicación de una vacuna requiriera también de la administración simultánea de un antibiótico. Se han diseñado varias estrategias para resolver el problema de la estabilidad de los plásmidos y eliminar la necesidad del uso de antibióticos. Algunos sistemas consisten en la construcción de mutantes en las que la ausencia del plásmido es letal para la bacteria, lo que lo hace estable tanto *in vitro* como *in vivo* (105), estas mutantes pueden inducir respuestas locales y sistémicas con una sola dosis (106). Otra alternativa consiste en la integración de los genes heterólogos en el cromosoma de la bacteria acarreadora (107) con lo que se logra la expresión estable de la proteína recombinante, a menos que se presenten mutaciones que causen la inactivación del gene heterólogo. Sin embargo, se ha demostrado que en el sistema de integración cromosómica la producción de la proteína recombinante disminuye entre 20 a 40 veces, cuando se compara con el método basado en plásmidos. La disminución en la producción de la proteína recombinante es un aspecto importante en la inmunogenicidad y eficiencia de este tipo de vacunas. Al comparar la respuesta inmune de dos cepas *Salmonella typhimurium* que accarreaban el gene que codifica para la toxina termolabil de *Escherichia coli* (LTB), una en un plásmido y la otra integrado al cromosoma, se encontró que la expresión de la proteína era 20 veces menor en el cointegrante. Al inmunizar ratones, el plásmido se perdió rápidamente *in vivo*, aun cuando los animales

recibieran antibiótico, a diferencia del gene integrado en el cromosoma que resultó estable. A pesar de ello, los animales que recibieron antibiótico presentaron la mejor respuesta de anticuerpos contra LTB, demostrando que durante la fase de inducción, la cantidad de antígeno disponible determina la magnitud de la respuesta inmune, aunque posteriormente la proteína recombinante no se produzca al perderse el plásmido (108). Esta constituye una gran desventaja para el sistema de integración cromosómica, pues en el mejor de los casos, se tiene que administrar una gran cantidad de bacteria para inducir respuesta inmune eficiente. Se han ideado diferentes recursos experimentales para solucionar estas dificultades. Algunos autores han diseñado genes quiméricos que codifican para proteínas de fusión que estabilizan la expresión de las proteínas recombinantes, como el dominio de unión a células eucarióticas de la toxina diftérica en un sistema de integración cromosómica (109) o el péptido señal y dos dominios de unión a IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (110), o bien, otra alternativa es la utilización de promotores fuertes que aumenten la expresión de la proteína recombinante (111).

La opción que se propone en este trabajo es la construcción de un sistema de amplificación transcripcional del gene heterólogo integrado en el cromosoma. Se eligió el promotor T7 porque es pequeño y muy eficiente. La T7 RNA polimerasa, que es el producto de un gene del fago T7, es cinco veces mas pequeña pero también mucha más activa que las polimerasas de *Escherichia coli*, a tal grado que puede desplazar la transcripción de las otras RNA polimerasas bacterianas. El sistema de complementación promotor T7-T7 RNA polimerasa ha sido utilizado ampliamente, incluso en células eucarióticas.

Se logró insertar en plásmidos el gene que codifica para la T7 RNA polimerasa y el gene que codifica para GP63 de *Leishmania mexicana* bajo el control de promotor T7. Fue posible transformar ambos plásmidos compatibles en *Escherichia coli* y se demostró que son funcionales, pues se transcomplementan produciendo la GP63 recombinante que induce respuesta proliferativa contra *Leishmania mexicana*. Este resultado es substancial para el desarrollo ulterior de vacunas en vectores bacterianos, pues permitirá la integración cromosómica del sistema de transcomplementación.

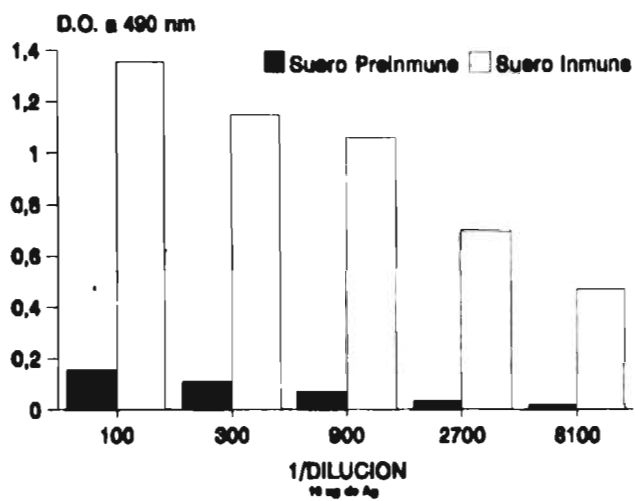
Es importante señalar que el mRNA de la GP63 parece ser inestable en el sistema de complementación, lo que se deduce por los resultados de "Northern blot". Aunque este es un aspecto que no se exploró detalladamente en este trabajo, el diseño del gene no incluyó un terminador que permitiría mayor estabilidad del mRNA. Por otro lado, no fue posible demostrar anticuerpos contra la GP63. Este hallazgo no es singular, pues otros autores han encontrado

respuesta inmune celular contra el antígeno recombinante, en ausencia de respuesta inmune humoral (64,66,112 ) Esto se debe a que, en circunstancias todavía no muy claras, *Salmonella* induce preferentemente una respuesta de tipo Th1. En nuestro laboratorio hemos demostrado que *Salmonella typhi* CVD908 conteniendo el gene que codifica para GP63 de *Leishmania mexicana* induce respuesta inmune Th1 protectora en ausencia de anticuerpos (113). Además, se ha observado que la inmunización con *Salmonella* induce células citotóxicas CD8<sup>+</sup> (114). Observaciones realizadas en la UIMI indican que los macrófagos captan antígenos protéicos, los degradan en los fagolisosomas y posteriormente los regurgitan al medio. De esta manera, los péptidos inmunogénicos son capaces de llenar moléculas de clase I funcionalmente vacías en la superficie de las APC (115).

Los factores que intervienen en la inmunogenicidad de los antígenos que se expresan en vectores recombinantes son múltiples y complejos. El destino de la respuesta inmune está determinado no solo por la antigenicidad intrínseca de los epitopos, sino por aspectos como la cantidad de proteína producida y localización de la misma. Las proteínas recombinantes pueden producirse en citosol, membrana, espacio periplásmico o flagelo y en cada caso la respuesta de humoral o celular puede ser de diferente magnitud. La virulencia y patogenicidad del vector es también importante. La cantidad de LPS es capaz de inducir señales estimuladoras. Por otro lado, se ha demostrado que la respuesta inmune a proteínas de membrana externa es más eficiente cuando se inmuniza con bacteria viva atenuada que cuando se vacuna con bacteria muerta (116). Por último, el microambiente en el que se produce la fase de inducción de la respuesta inmune es fundamental. Por ello frecuentemente la vía de administración de los antígenos determina el desarrollo ulterior de la respuesta inmune (117).

FIGURA No.1

TITULACION DE SUERO DE CONEJO CONTRA EXTRACTO CRUDO  
PROTEICO DE *Leishmania mexicana*

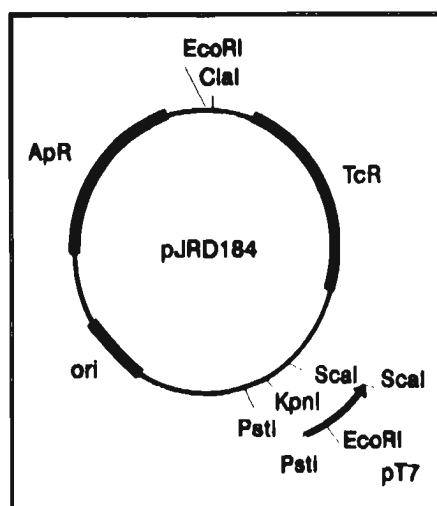


Se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pozos con 10 µg/ml de extracto crudo de *Leishmania mexicana*, se adicionó el suero de conejo por duplicado en diluciones 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700 y 1:8100. Se incubó con un suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Se utilizó como sustrato ortofenilendiamina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se arrestó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó la D.O. a 490nm.

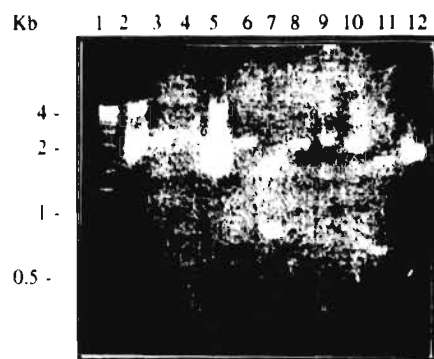
FIGURA No. 2.

ANALISIS DE RESTRICCION DEL PLASMIDO pJRD184pT7

A



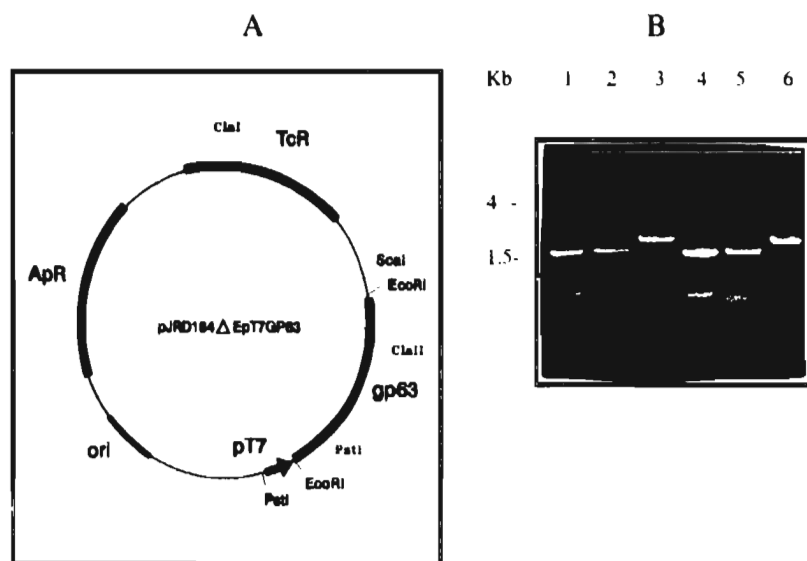
B



CARRIL	PLASMIDO	DIGESTION	FRAGMENTOS (Kb)
1	"Ladder" 1Kb.		
2	pJRD184ΔE	Sin digerir	
3	pJRD184ΔE	EcoRV-EcoRI	3.8
4	pJRD184ΔE	KpnI-EcoRI	3.8
5	pJRD184ΔEPT7.	Sin digerir	
6	pJRD184ΔEPT7.	PstI	3.8
7	pJRD184ΔEPT7.	EcoRV-EcoRI	1.1, 2.7
8	pJRD184ΔEPT7.	EcoRI	3.8
9	pJRD184ΔEPT7.	KpnI	SD
10	pJRD184ΔEPT7.	Scal	3.8
11	pJRD184ΔEPT7.	EcoRI-BamHI	1, 2.8
12	pJRD184	EcoRI-BamHI	0.5, 3.3

FIGURA No. 3.

ANALISIS DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pJRD184ΔEPT7GP63



CARRIL	PLASMIDO		DIGESTION	FRAGMENTOS (Kb)
1	pJRD184ΔEPT7GP63	Clona 1	ClaI	1.7, 3.7
2	pJRD184ΔEPT7GP63	Clona 1	EcoRI	1.5, 3.8
3	pJRD184ΔEPT7GP63	Clona 1	PstI	0.2, 5.2
4	pJRD184ΔEPT7GP63	Clona 2	ClaI	1.7, 3.7
5	pJRD184ΔEPT7GP63	Clona 2	EcoRI	1.5, 3.8
6	pJRD184ΔEPT7GP63	Clona 2	PstI	0.2, 5.2

FIGURA No. 4  
EXPRESION DE LA GP63 RECOMBINANTE DE *Leishmania mexicana* BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR T7

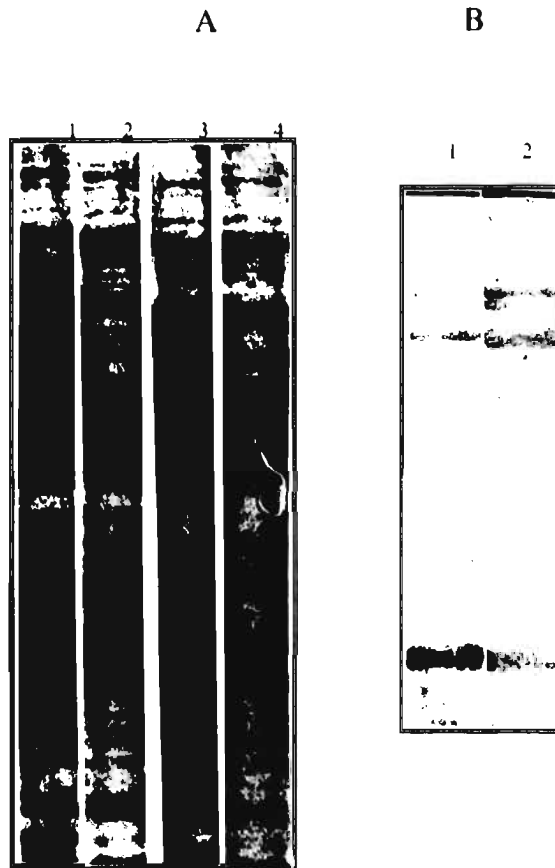


La expresión de GP63 recombinante se verificó por inmunopunto. Aproximadamente  $1 \times 10^9$  bacterias transformadas con el gene que codifica para GP63 transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se revelaron con el suero hiperimmune de conejo. 1) y 2) Extracto crudo de proteínas de *Leishmania mexicana*; 3) y 4) Proteínas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pJRD184-PT7GP63; 5) a 10) Clonas que contienen el plásmido pJRD184PT7GP63 en *Escherichia coli* BL21(DE3).



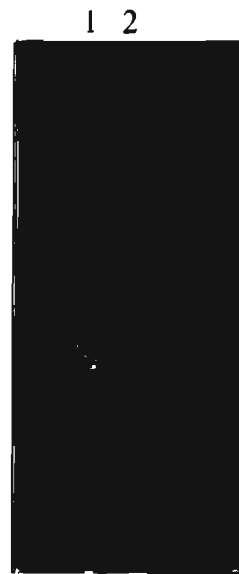
FIGURA No. 5.

EXPRESION DE GP63 RECOMBINANTE  
BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR T7



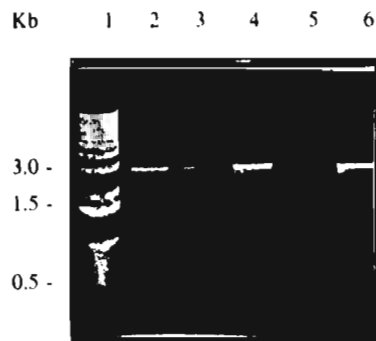
Se separaron proteínas totales de bacteria bajo condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se revelaron con el suero hiperinmune de conejo contra proteínas de *Leishmania mexicana*. Panel A. Carril 1, *Escherichia coli* DH5α; carril 2, *Escherichia coli* BL21(DE3); carril 3 y 4 *Escherichia coli* BL21(DE3)-GP63. Panel B. Carril 1, *Escherichia coli* BL21(DE3); carril 2, *Escherichia coli* BL21(DE3)-GP63.

FIGURA No. 6  
PRODUCCION DE RNA MENSAJERO DE GP63 BAJO EL  
CONTROL DEL PROMOTOR T7



Se indujo *Escherichia coli* BL21(DE3)-pJRD184PT7GP63 con IPTG. Se ajustó a  $1 \times 10^9$  bacterias/ml, se obtuvo el RNA total y 30  $\mu$ g se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, se transfirió la muestra a una membrana de nylon y se reveló con una sonda de GP63 marcada con  $^{32}$ P. Carril 1, RNA total de *Escherichia coli* BL21(DE3); carril 2, RNA total de *Escherichia coli* BL21(DE3)-pJRD184PT7GP63.

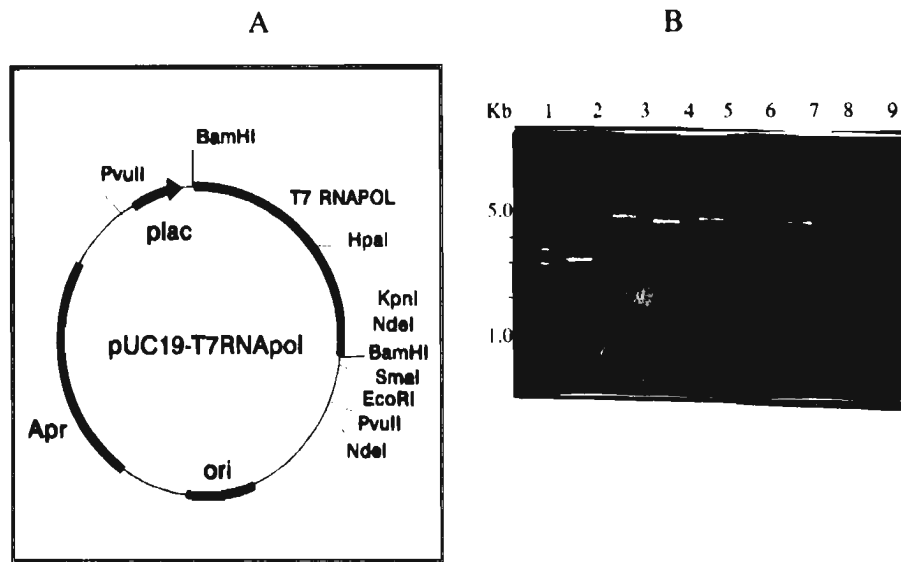
FIGURA No. 7  
 AMPLIFICACION DE LA T7 RNA POLIMERASA



Se obtuvo el gene que codifica para la T7 RNA polimerasa mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), empleando DNA cromosomal de *Escherichia coli* BL21(DE3). Los oligonucleótidos iniciadores o "primers" empleados fueron, para el extremo 5' la secuencia CgggggATCCAggTACgATTTACTAACTggAAgAggCACT en la cual se incluyó un sitio BamHI (sitios subrayados); para el extremo 3', la secuencia CgggggATCCTTACgCgAACgCgAAgTCCgACTCTAAGAT, en el cual se incluyó un sitio BamHI. Carril 1, marcadores de peso molecular de 1 Kb; Carriles 2 a 6, gene T7 RNA polimerasa amplificado por PCR.

FIGURA No. 8.

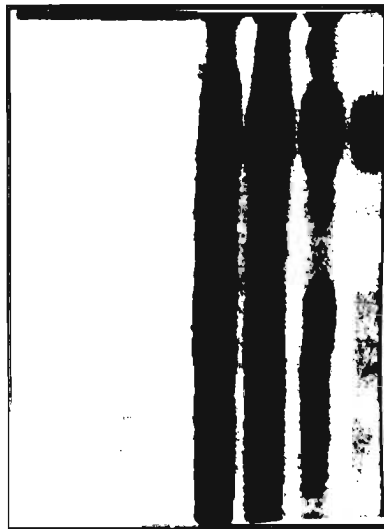
ANALISIS DE RESTRICCION DEL PLASMIDO pUC19-T7RNAPol



CARRIL	PLASMIDO	DIGESTION	FRAGMENTOS (Kb)
1	pUC19-T7RNAPol	PvuII	2.4, 3.0
2	pUC19-T7RNAPol	BamHI	2.7, 2.7
3	pUC19-T7RNAPol	HpaI	5.4
4	pUC19-T7RNAPol	NdeI	0.4, 5.0
5	pUC19-T7RNAPol	SmaI	5.4
6	pUC19-T7RNAPol	EcoRV	SD
7	pUC19-T7RNAPol	EcoRI	5.4
8	pUC19-T7RNAPol	KpnI	0.2, 5.2
9	pUC19-T7RNAPol	Sin digerir	SD

FIGURA No. 9  
PRODUCCION DE RNA MENSAJERO DE LA  
T7 RNA POLIMERASA

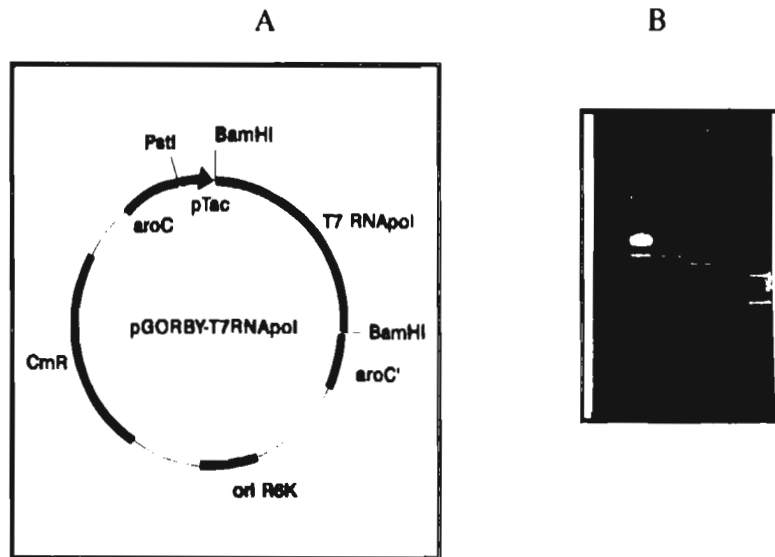
1 2 3 4 5 6 7 8



Se purificó RNA total apartir de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -pUC19T7RNAPol. Se corrieron en un gel de agarosa al 1%. El RNA total se transfirió a una membrana de nylon. Se hibridó con DNA de T7 RNA polimerasa marcada con  $^{32}\text{P}$ . Se expuso ante una película (Kodak) durante 24 hrs. Carriles 1, 2, 3 y 4, diluciones seriadas de RNA total de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ( 30, 15, 7.5 y 3.75  $\mu\text{g}$ ); Carriles 5, 6, 7 y 8, RNA total de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -pGORBYT7RNAPol. con las concentraciones ya mencionadas.

FIGURA No. 10.

ANALISIS DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pGORBY-T7RNApol



CARRIL	PLASMIDO	DIGESTION	FRAGMENTOS
1	"Ladder" 1Kb.		
2	pGORBY-T7RNApol	Sin digerir	S.D
3	pGORBY-T7RNApol	EcoRI	11.1
4	pGORBY-T7RNApol	KpnI	2.5, 7.0
5	pGORBY-T7RNApol	EcoRI-KpnI	2.5, 7.0
6	pGORBY-T7RNApol	BamHI	2.7, 2.7, 4.5

FIGURA No. 11  
PRODUCCION DE RNA MENSAJERO DE LA  
T7 RNA POLIMERASA



Se purificó RNA de *Escherichia coli* SY327-pGORBY-T7RNApol. se sometió a electroforesis en agarosa y se transfirió a membrana de nylon. Se reveló con una sonda de T7 RNA polimerasa marcada con  $^{32}\text{P}$ . Carril 1, RNA de *Escherichia coli* BL21(DE3); Carriles 2 a 5, RNA total de *Escherichia coli* SY327 pGORBY-T7RNApol; Carril 6, RNA total de *Escherichia coli* SY327.

FIGURA No. 12

ANALISIS DE LA T7 RNA POLIMERASA MEDIANTE SOUTHERNBLOT



Se obtuvo el DNA cromosómico a partir de  $1 \times 10^9$  bacterias y se digirió con EcoRI y EcoRV. Se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a papel de nylon. Se reveló con una sonda de T7 RNA polimerasa marcada con  $^{32}\text{P}$ . Carril 1 y 2, DNA cromosómico de *Escherichia coli* BL21(DE3) digerido con EcoRI; Carril 3, DNA de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  digerido con EcoRI; Carril 4, pUC19-T7RNApol digerido con EcoRI; Carriles 5 y 6, DNA de *Escherichia coli* BL21(DE3) digerido con EcoRV; Carril 7, DNA de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  digerido con EcoRV; Carril 8, pUC19-T7RNApol digerido con EcoRV.



FIGURA No. 13

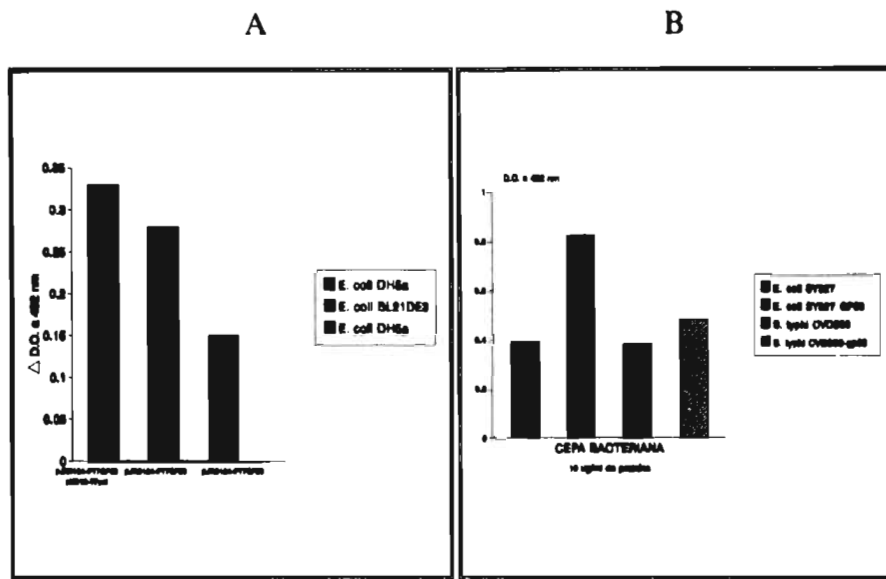
PRODUCCION DE RNA MENSAJERO DE LA GP63 EN EL SISTEMA DE  
COMPLEMENTACION PROMOTOR T7-T7 RNA POLIMERASA



El RNA total purificado se cuantificó, se sometió a electroforesis en agarosa y se transfirió a una membrana de nylon. Se reveló con una sonda del gene de GP63 marcada con  $^{32}\text{P}$ . Carril 1, RNA total de *Escherichia coli* BL21(DE3)-pJRD184PT7GP63; Carril 2, RNA total de *Escherichia coli* BL21(DE3); Carril 3, RNA total de *Escherichia coli* SY327; Carril 4, RNA total de *Escherichia coli* SY327 pGORBY-T7RNApol; Carril 5, RNA total de *Escherichia coli* SY327 pGORBY-T7RNApol y pJRD184PT7GP63.

FIGURA No. 14.

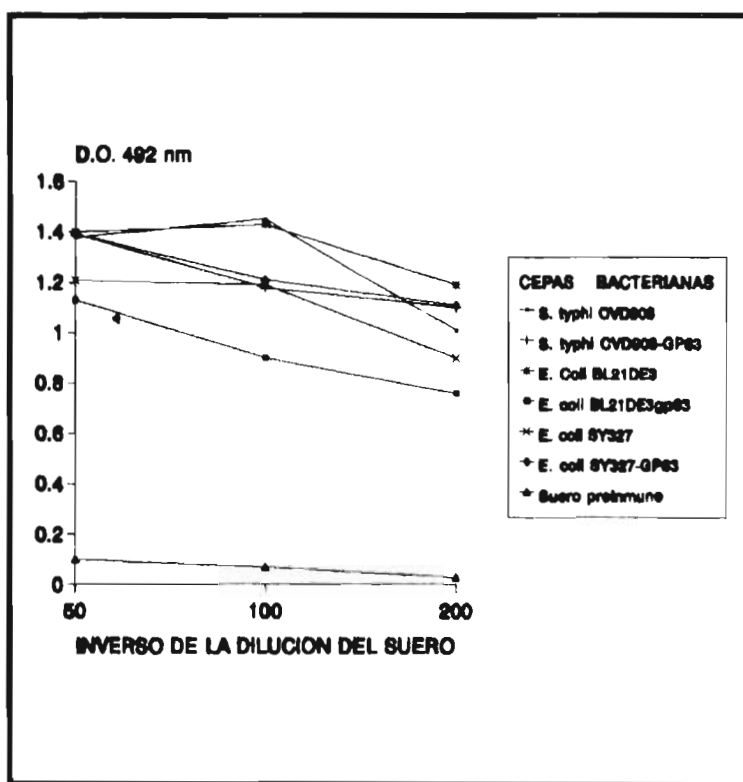
PRODUCCION DE GP63 RECOMBINANTE EN EL SISTEMA T7 RNA POLIMERASA Y GP63 BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR T7.



Se recubrieron placas de microtitulación con 10 µg de un extracto protéico de las cepas bacterianas transformadas con los plásmidos para el sistema de complementación. La GP63 se reveló con un suero de conejo contra proteínas de *Leishmania mexicana*. Panel A. Plásmidos no compatibles. Barra 1, *Escherichia coli* DH5α pJRD184PT7GP63, pUC19T7pol; Barra 2, *Escherichia coli* BL21DE3 pJRD184PT7GP63; Barra 3, *Escherichia coli* DH5α pJRD184PT7GP63. Panel B. Plásmidos compatibles. Barra 1, *Escherichia coli* SY327; Barra 2, *Escherichia coli* SY327 pJRD184PT7GP63, pGORBYT7pol; Barra 3, *Salmonella typhi* CVD908; Barra 4, *Salmonella typhi* CVD908GP63.

FIGURA No. 15

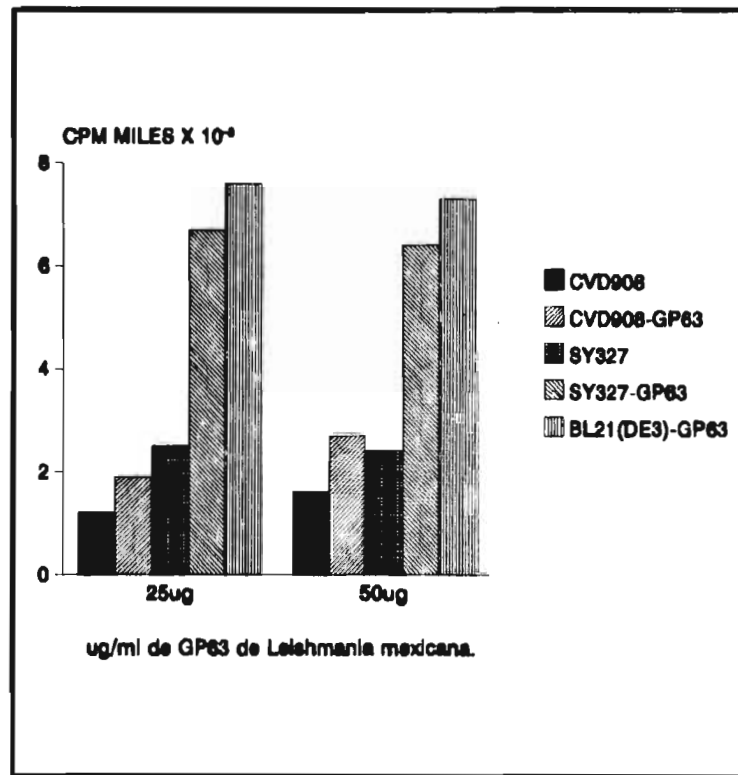
INDUCCION DE ANTICUERPOS CONTRA PORINAS DE *Salmonella typhi* EN RATONES  
INMUNIZADOS CON CEPAS BACTERIANAS QUE PRODUCEN GP63 DE *Leishmania mexicana*



Se recubrieron placas para microtitulación con 5 µg de porinas obtenidas a partir de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Se adicionó el 1er. anticuerpo correspondiente a la última sangría en el esquema de inmunización. Se adicionó el segundo anticuerpo diluido 1:1000 y como sustrato ortofenilendiamina. Se midió la absorbancia a 492 nm.

FIGURA No. 16

ACTIVACION DE ESPLENOCITOS INDUCIDA POR LA INMUNIZACION CON CEPAS BACTERIANAS QUE PRODUCEN GP63 RECOMBINANTE DE *Leishmania mexicana*



Se inmunizaron grupos de cinco ratones BALB/c con *Escherichia coli* SY327 transformada con los plásmidos pGORBY-T7RNApol y pJRD184PT7GP63. Se cultivaron esplenocitos en presencia de extracto proteico de *Leishmania mexicana* y la activacion se evaluó en un ensayo de incorporacion de <sup>3</sup>H-timidina.

## REFERENCIAS

1. The Leishmaniasis. WHO Tech. Rep. Ser. pp. 701. 1984.
2. SSA. I Conferencia Interamericana para la prevención y el control de las Leishmaniasis. pp 1-V. 1994.
3. Miles, M.A Biochemical identification of the leishmanias. PAHO Bull. 19:343-353, 1985.
4. Chance, M. L., Schnur, L. F., Thomas, S. C., and Peters, W. The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72:533-542,1978.
5. Laison, R., and Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The *Leishmaniasis* in biology and medicine, Vol 1, Peters, W, Killick-Kendrick (Eds). pp 1-120. Academic Press, London. 1987.
6. Romero-Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Médica Panamericana. México, 1993. pp 535-542.
7. Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., and Ashford, R.W. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. Proc. R. Soc. London. 187:409-419,1974.
8. Franke, E. D., Rowton, E. D., Perkins, P. V., and McGreevy, P. B. Detection and enumeration of *Leishmania* in sandflies using agar based media. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37:516-519, 1987.
9. Al-Gindan, Y., Omer, A.H.S., Al-Humaidan, Y.A., Peters, W., and Evans, D.A. A case of mucocutaneous Leishmaniasis in Saudi Arabia caused by *L. major* and its response to treatment. Clin. Exp. Dermatol. 8:185-188,1983.
10. Ridley, J.S., and Ridley, M.J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. J. Pathol. 141:83-96,1983.
11. Petersen, E.A., Neva, F., Oster, C.N., and Bogaert-Díaz, H. Specific inhibition of lymphocyte proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. New England. J. Med. 306:387-392,1982.
12. Castes, M., Agnelli, A., Verde, O., and Rondon, A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. 27:176-186,1983.
13. Rees, P.H., and Kaager, P.A. Visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. In: *The leishmaniasis. In Biology and Medicine*. Peters, W, Killick-Kendrick, R. (Eds). pp 583-616. Academic Press, London, 1987.
14. Mason-Bahr, P.E.C. Leishmaniasis. Int. Rev. Trop. Med. 4:123-140, 1971.
15. Haldar, J.P., Ghose, S., Saha, K.C., and Ghose, A.C. Cell-mediated immune response in indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. Infect. Immun. 42:702-707, 1983.

## REFERENCIAS

1. The Leishmaniasis. WHO Tech. Rep. Ser. pp. 701. 1984.
2. SSA. I Conferencia Interamericana para la prevención y el control de las Leishmaniasis. pp I-V. 1994.
3. Miles, M.A Biochemical identification of the leishmanias. PAHO Bull. 19:343-353, 1985.
4. Chance, M. L., Schnur, L. F., Thomas, S. C., and Peters, W. The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72:533-542,1978.
5. Laison, R., and Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The *Leishmaniasis* in biology and medicine, Vol I, Peters, W, Killick-Kendrick (Eds) pp 1-120. Academic Press, London. 1987.
6. Romero-Cabello. R. Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Médica Panamericana. México. 1993. pp 535-542.
7. Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., and Ashford, R.W. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. Proc. R. Soc. London. 187:409-419,1974.
8. Franke, E. D., Rowton, E. D., Perkins, P. V., and McGreevy, P. B. Detection and enumeration of *Leishmania* in sandflies using agar based media. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37:516-519, 1987.
9. Al-Gindan, Y., Omer, A.H.S., Al-Humaidan, Y.A., Peters, W., and Evans, D.A. A case of mucocutaneous Leishmaniasis in Saudi Arabia caused by *L. major* and its response to treatment. Clin. Exp. Dermatol. 8:185-188,1983.
10. Ridley, J.S., and Ridley, M.J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. J. Pathol. 141:83-96,1983.
11. Petersen, E.A., Neva, F., Oster, C.N., and Bogaert-Díaz, H. Specific inhibition of lymphocyte proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. New England. J. Med. 306:387-392,1982.
12. Castes, M., Agnelli, A., Verde, O., and Rondon, A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. 27:176-186,1983.
13. Rees, P.H., and Kaager, P.A. Visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. In: *The leishmaniasis. In Biology and Medicine*. Peters, W. Killick-Kendrick, R. (Eds). pp 583-616. Academic Press, London, 1987.
14. Mason-Bahr, P.E.C. Leishmaniasis. Int. Rev. Trop. Med. 4:123-140, 1971.
15. Haldar, J.P., Ghose, S., Saha, K.C., and Ghose, A.C. Cell-mediated immune response in indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. Infect. Immun. 42:702-707, 1983.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

16. Russell, D.G., and Talamas-Rohana, P. Leishmania and the macrophage: A marriage of inconvenience. *Immunology Today* 10:328-333,1989.
17. Russell, D. G., and Wilhelm, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* 136:2613-2620,1986.
18. Blackwell, J.M., Ezekowitz, R.A.B., Roberts, M.B., Chanon, J.Y., Sim, R.B., and Gordon, S. Macrophage and Lectin-Like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 162:324-331,1985.
19. Alexander, J., and Vickerman, K. Fusión of hosts cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Protozool.* 22:502-508,1975.
20. Coombs, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitol.* 84:149-155,1982.
21. Murray, H.W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.* 153: 1302-1315,1981.
22. Reiner, N.E., and Kazura, J. W. Oxidant-mediated damage of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infec. Immun.* 36:1023-1027,1982.
23. Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180:977-984, 1994.
24. Jardim, A. Funk, V., Caprioli, R.M., and Olafson, R.W. Isolation and characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem. J.* 305:307-313, 1995.
25. Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., and Liew, F.Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 25:745-750,1995.
26. 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.
27. Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiane, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., and Gros, P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.* 182:655-666, 1995.
28. 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.
29. Kemp, M., Hey, A. S., Kurtzhals, J. A. L., Christensen, C. B. V., Gaafar, A., Mustafa, M. D., Kordofani, A. A. Y., Ismail, A., Kharazmi, A. and Heander, T. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 410-415, 1994

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

16. Russell, D.G., and Talamas-Rohana, P. Leishmania and the macrophage: A marriage of inconvenience. *Immunology Today* 10:328-333,1989.
17. Russell, D. G., and Wilhelm, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* 136:2613-2620,1986.
18. Blackwell, J.M., Ezekowitz, R.A.B., Roberts, M.B., Chanon, J.Y., Sim, R.B., and Gordon, S. Macrophage and Lectin-Like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.* 162:324-331,1985.
19. Alexander, J., and Vickerman, K. Fusión of hosts cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Protozool.* 22:502-508,1975.
20. Coombs, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitol.* 84:149-155,1982.
21. Murray, H.W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.* 153: 1302-1315,1981.
22. Reiner, N.E., and Kazura, J. W. Oxidant-mediated damage of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infec. Immun.* 36:1023-1027,1982.
23. Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180:977-984, 1994.
24. Jardim, A. Funk, V., Caprioli, R.M., and Olafson, R.W. Isolation and characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem. J.* 305:307-313, 1995.
25. Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., and Liew, F.Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 25:745-750,1995.
26. 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.
27. Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiane, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., and Gros, P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.* 182:655-666, 1995.
28. Reiner, S.L., and Locksley, R.M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4<sup>+</sup> subsets in *Leishmaniasis*. *J. Cell. Biochem.* 53:323-328, 1993.
29. Kemp, M., Hey, A. S., Kurtzhals, J. A. L., Christensen, C. B. V., Gaafar, A., Mustafa, M. D., Kordofani, A. A. Y., Ismail, A., Kharazmi, A. and Heander, T. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 410-415, 1994



30. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L. Two types of murine helper T-cell clone. *J. Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
31. Bertagnolli, M. M. Immunology review. In: *Cytokines and T lymphocytes. Therapeutic manipulation of the immune system.* Bertagnolli, M. M. (Ed), pp 1-55, 1993.
32. Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* 46:111-147, 1989.
33. Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., and Sher, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 168:1675-1684, 1988.
34. Scott, P. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 68:369-372, 1989.
35. Chakkalath, H. R., and Titus, G.R. *Leishmania major*-Parasitized Macrophages Augment Th2-Type T Cell Activation. *J. Immun.* 153:4378-4388, 1994.
36. Liew, F. Y., Parkinson, S., Millot, R., Severn, A., and Carrier, M. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis I. TNF-alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology.* 69:570-573, 1990.
37. Badaró, R., Nascimento, C., Carvalho, J. S., Badaró, S., Russo, D., He, J. L., Reed, S. G., Johnson, W. D., and Jones, T. C. Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 170:413-418, 1994.
38. Greil, J. B., Bodenforfer, M., Rollinghoff, M., and Solbach, W. Application of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 18:1527-1533, 1988.
39. 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.
40. Hill, J. O., Awwad, M., and North, R. J. Elimination of CD4, suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8<sup>+</sup> T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J. Exp. Med.* 169:1819-1827, 1989.
41. Muller, I., Kropf, P., Louis, J. A., and Milon, G. Expansion of Gamma Interferon-Producing CD8<sup>+</sup> T Cells following Secondary Infection of Mice Immune to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 62:2575-2581, 1994.
42. Overath, P., and Harbecke, D. Course of *Leishmania* infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Immunol. Lett.* 37:13-17, 1993.

43. Wang, Z.E., Reiner, S.L., Hatam, F., Heinzel, 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.
44. Alexander, J., A radioattenuated *L. major* vaccine markedly increases resistance of CBA mice to subsequent infection with *L. m. mexicana*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76:646-649,1982.
45. Howard, J.G., Nicklin, S., Hale, C., and Liew, F.Y. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 129:2206-2212,1982.
46. Lemma, A., and Cole, L. *Leishmania enrietti*: Radiation effects and evaluation of radiattenuated organisms for vaccination. *Exp. Parasitol.* 35:161-169,1974.
47. Titus, R., Kinsey, P., Thoedos, C., and Louis, J. Induction of resistance to experimental cutaneous Leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice by immunization with chemically-mutagenised non-infective clones of *L. major*. *FASEB J.* 2:A887, 1988.
48. Marva, E., and Greenblatt, G.L. Vaccination of mice with chemically attenuated *Leishmania tropica*. *J. Protozool.* 26:49,1979.
49. Handman, E., and Mitchell, G.F. Immunization with *Leishmania* receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5910-5914,1985.
50. Russell, D., and Alexander, J. Effective immunization against cutaneous Leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.* 140:1274-1279,1988.
51. Jardim, A., Alexander, J., and Teh, H.S. Immunoprotective *Leishmania major* synthetic T-cell epitopes. *J. Exp. Med.* 172:645-648,1990.
52. Yang, D.M., Rogers, M.V., and Liew, F.Y. Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major glycoprotein (gp-63) from *Leishmania major*. *Immunol.* 72:3-9,1991.
53. Mayrink, W., Williams, P., Da Costa, C.A., Magalhaes, P.A., Melo, M.N., Dias, M., and Lima, O.A. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: Experience in the state of Spirito Santo, Brazil. *Am. Trop. Med. Parasitol.* 79:259-269,1985.
54. Greenblatt, C.L. Cutaneous leishmaniasis. The prospect for a Killed vaccine). *Immunol. Today.* 4:53-54,1988.
55. 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.
56. Ip, H.S., Om, 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.

57. Medina-Acosta, E., Kress, 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. Roberts, S.C., Swihart, K.G., Agey, M.W., Ramamoorthy, R., Wilson, M. E., and Donelson, J.E. Sequence diversity and organization of the msp gene family encoding gp63 of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:157-172, 1993.
62. Handman, E., Button, L.L. and McMaster, R.W. *Leishmania major*: Production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Exp. Parasitol.* 70:427-435, 1990.
63. 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.
64. 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.* 90:11473-11477, 1993.
65. Xu, D., McSorley, S.J., Chatfield, S.N., Dougan, G., and Liew, F.Y. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA<sup>-</sup> AroD<sup>-</sup>). *Immunology.* 85:1-7, 1995.
66. Xu, D., and Liew, F.Y., Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 12:1534-1536, 1994.
67. Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., and Chang, K.P. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. *J. Bio. Chem.* 13:7483-7489, 1989.
68. Hey, S. A., Theander, T.G., Hviid, L., Hazrati, M. S., 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.* 152:4542-4549, 1994.
69. Blackwell, J.M., and Ulezak, O.M. Immunoregulation of genetically controlled acquired responses to *Leishmania donovani* infection in mice: demonstration and characterization of suppressor T cells in non-cure mice. *Infect. Immun.* 44:97-102, 1984.

70. Blackwell, J. M., and Alexander, J. Different host genes recognize and control infection with taxonomically distinct *Leishmania* species. In: Proceeding of an International Symposium on Taxonomy and Physiology of *Leishmania*, Rioux, J. A. (Ed), pp211-219. Montepiller, France, 1986.
71. Liew, F.Y., Millot, R., and Schmidt, J.A. A repetitive peptide of *Leishmania* can activate T helper type 2 cells and enhance disease progression. *J. Exp. Med.* 172:1359-1365,1990.
72. Everest, P., Griffiths, P., and Dougan, G. Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. *Biologicals.* 23:119-124, 1995.
73. VanCott, J.L., Staats, H.F., Pascual, D.W., Roberts, M., Chatfield, S.N., Yamamoto, M., Coste, M., Carter, P.B., Kiyono, H., and McGhee, J.R. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. *J. Immunol.* 156:1504-1514, 1996.
74. Franco, A., González, C., Levine, O., Lagos, R., Hall, R., Hoffman, S., Moehtar, M., Gotuzzo, E., Levine, M., Hone, D.; and Morris, G. Further Consideration of the Clonal Nature of *Salmonella typhi*: Evaluation of Molecular and Clinical Characteristics of Strains from Indonesia and Peru. *J. Clin. Microbiol.* 30:2187-2190, 1992.
75. 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.
76. Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonsky, G.A., Guers, L., Edelman, R., and Levine, M. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine.* 10:443-446,1992.
77. 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.
78. 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.
79. González, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C.O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Sztein, 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.
80. Panayotatos, N., and Wells R. D. Recognition and initiation site for four late promoters of phage T7 is a 22-base pair DNA sequence *Nature.* 280:35-39,1979.
81. Campbell, J.L., Richardson, C.C., and Studier, F.W. Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 75:2276-2280,1978.

82. Campbell, J.L., Richardson, C.C., and Studier, W.F. Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 75: 2276-2280, 1978.

83. Studier, F., and Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA Polymerase to direct selective High-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189:113-130, 1986.

84. Grodberg, J., and Dunn, J.J. ompT Encodes the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease that Cleaves T7 RNA Polymerase during Purification. J. Bacteriol. 170:1245-1253, 1988.

85. Studier W., and Moffatt, B.A.. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. J. Mol. Biol. 189:113-130, 1986.

86. 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 or diffuse cutaneous leishmaniasis. Arch. Med. Res. (Mex). 25:401-406, 1994.

87. 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.

88. Miller, V.L., and Mekalanos, J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 170:2575-2583,1988.

89. Heusterpreute, M., Thi, V.H., Emerly, S., Toumis-Gamble, S., Kennedy, N., and Davison, J. Vectors with restriction site blanks: IV pJRD184, a 3793-bp plasmid vector having 43 unique cloning sites. Gene:299-304, 1985.

90. Rose, R.E. The nucleotide sequence of pACYC184. Nucleic Acids Res. 16:355 1988.

91. Sambrook, K.J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. pp. 1.42-1.46., 1989.

92. Wilson, V.G. A rapid method for removal of excess linkers. Biotechniques. 6:733,1988.

93. McGraw, N.J., Bailey, J.N., Cleaves, G.R., Dembinski, D.R., Grocke, C.R., Joliffe, L.K., MacWright, R.S., and McAllister, W.T. Sequence analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase. Nucleic Acids Res. 13:6663-6676. 1985.

94. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. Mullis, K.B. and Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491,1988.

95. Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-505,1975.
96. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275,1951.
97. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685,1970.
98. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354,1979.
99. Engvall, E. and Perlmann, P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 8:874-879, 1971.
100. 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.
101. Srinivasan, J., Tinge, S., Wright, R., Herr, J.C., and Curtis, R III. Oral immunization with attenuated *Salmonella* expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. *Biol. Reprod.* 53:462-471, 1995.
102. Simonet, M., Fortineau, N., Beretti, J.L., and Berche, P. Immunization with live  $\alpha$ roA recombinant *Salmonella typhimurium* producing invasins inhibits intestinal translocation of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 62:863-867, 1994.
103. Zhang, T., and Stanley, S.L. Oral immunization with attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* expressing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein induces an antiamebic immune response and protects gerbils from amebic liver abscess. *Infect. Immun.* 64:1526-1531, 1996.
104. Hopkins, S., Kräehenbuhl, J.P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., de Grandi, P., and Nardelli-Haeffliger, D. *Infect. Immun.* 63:3279-3286, 1995. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces immunity by four different routes of immunization. *Infect. Immun.* 63:3279-3286, 1995.
105. Nakayama, K., Kelly, S.K., and Curtis R. III. Construction of an Asd<sup>+</sup> expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnology.* 6:693-697,1988.
106. Karem, K.L., Chatfield, S., Kuklin, N., and Rouse, B.T. Differential induction of carrier-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of Balb/c mice. *Infect. Immun.* 63:5457-5463, 1995.
107. Hone, D.M., Attridge, S., Bosch, L.V.D., and Hackett, J.A. A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microb. Pathog.* 5:407-418,1989.

108. Cárdenas, L., and Clements, J.D. Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine*. 11:126-135, 1993.
109. Gomez-Duarte, O.G., Galen, J., Chatfield, S.N., Rappuoli, R., Eidels, L., and Levine, M.M. Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CDV908 vaccine strain. *Vaccine* 13:1596-1602, 1995.
110. Liljeqvist, S., Haddad, D., Berzins, K., Uhlen, M., and Stahl, S. A novel expression system for *Salmonella typhimurium* allowing high production levels, product secretion and efficient recovery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:356-359, 1996.
111. Fouts, T. R., Lewis, G.K., and Hone, D.M. Construction and characterization of a *Salmonella typhi*-based human immunodeficiency virus type 1 vector vaccine. *Vaccine*. 13:561-569, 1995.
112. Szein, M.B., Wasserman, S.S., Tacket, C.O., Edelman, R., Hone, D., Linberg, A.A. and Levine, M.M. Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* 170:1508-1517, 1994.
113. Huerta-Yépez S., Santiago-Machuca A., Carrera-Camargo M., Vega-Paredes M., Noriega F., Isibasi A., González-Bonilla C. An attenuated *Salmonella typhi* strain bearing the gp63 encoding gene of *Leishmania mexicana* induces protective TH1 immune response. Abs. T047. IV Latinamerican-XI Mexican Congress of Immunology. Marzo, 1996. Zacatecas, Zac. México.
114. Szein, M.B., Tanner, M. K., Polotsky, Y., Orenstein, J.M., and Levine, M.M. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J. Immunol.* 155:3987-3993, 1995.
115. Martín, N., Ochoa, A., Isibasi, A., and Ortiz-Navarrete, V. Processing and presentation of exogenous antigens by class I molecules. Abs. 4211. 9th International Congress of Immunology. pp709. 1995.
116. Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C., and Kumate, J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scan. J. Infectol.* 25:73-80, 1993.
117. Leclerc, C., Lo-Man, R., Fayolle, C., Charbit, A., Clement, J.M., Martineau, P., O'Callaghan, D., and Hofnung, M. Molecular and cellular parameters controlling the immunogenicity of foreign B- or T-cell epitopes expressed by recombinant vectors. *DEV. Biol. Stand.* 82:193-199, 1994.