

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE 2
ESCUELA DE QUIMICA 24
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**Expresión de epitopos de Plasmodium falciparum
en la superficie de Escherichia coli**

T E S I S
P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ERIKA BAYARDO MANZO

DIRECTOR: Q.F.B. JOSE ANTONIO GARCIA MACIAS

MEXICO, 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.

Este proyecto se realizó en los laboratorios de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. César R. González Bonilla, M.en C. Sara Huerta Yépez y del Q.F.B. José Antonio García Macías.

CON PROFUNDO Y ESPECIAL AGRADECIMIENTO :

Dr. César R. González Bonilla por su, asesoría, apoyo, consejos y amistad que dió como resultado éste proyecto, pero sobre todo por permitir desarrollarme profesionalmente en su laboratorio.

Dr. Armando Isibasi A. Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica por brindarme la oportunidad de colaborar con ustedes en un proyecto más de investigación, por su confianza y buenos deseos de siempre.

M. en C. Sara Huerta Yépez amiga, compañera y maestra gracias por tu apoyo en la parte experimental, tu cariño y consejos dieron lugar a este libro.

Dr. Vianney Ortiz Navarrete y Dr. Jorge
Paniagua Solís gracias por su paciencia.

Director Q.F.B José Antonio Garcia Macias
y asesores de tesis con cuya revisión he
podido concluir este trabajo.

A amigos y compañeros del laboratorio gracias
por brindarme su alegría y tiempo que llevó al
inicio y fin de éste proyecto : Dra. Marcela,
M. en C. Mario Vega, Lorena González, Dr.
Manuel Carrera, M. en C. Roberto Zenteno,
M. en C. Araceli Machuca, M. en C. Rebeca
Álvarez, Lupita, Roberto, Fernando, Martha,
Araceli, Olivia, Alberto e Ivette.

Cada uno de ustedes tiene un lugar muy especial en mi corazón.
Siempre los recordaré...

DEDICO ESTE TRABAJO:

A ti Dios por estar presente en cada día
de mi vida permitiéndome salir adelante.

A mis padres Arturo Bayardo Pavía y Ma. Guadalupe
Manzo de Bayardo a quienes debo la persona que soy,
de quienes aprendí importantes valores como el amor
a mí misma y a mis semejantes que gracias a su
esfuerzo, comprensión, atención, cuidado y
amor he podido completar mi formación
dándoles como regalo mi superación
como persona. Los quiero mucho.
Gracias

A mi hermano Arturo gracias por tu cariño.
Las caídas forman parte de la vida y son
lecciones de las cuales debes aprender a
levantarte, a veces cuesta, pero sin darte
cuenta te estas regalando la oportunidad
de crecer, madurar y perdonar. Recuerda
que el lazo que nos une es por siempre.
Te quiero.

A mis abuelos a los que llenaría de orgullo este día
los tengo presentes en mi corazón.

Abuelas, tíos, tías, primos sobrinos y madrina
gracias por compartir este momento. Aprender
no es un medio hacia un fin; es un fin en si mismo.

A mi segunda familia Carlos Frutos Espejo, Ana María
Rubio de Frutos, Carlos, Luanna, Javier, Leonor y Luis
con mucho cariño. Compruebo que al llegar a la meta
propuesta llena de satisfacción y alegría pero lo que
realmente importa en todo esto es que se valore
hasta el más mínimo detalle de lo que se
obtuvo en el camino

A mis amigas de carrera Ceci, Lore y Margarita
De quienes aprendí el verdadero significado
de la amistad no tengo palabras con que
agradecer su cariño les deseo
lo mejor de la vida.

A mis amigas del Instituto Miguel Angel Gela
y Ihalí por nuestra larga y sincera amistad.

A mis amigos Ricardo, Alejandro, Sandra, Delia,
Edna, Marco, Queto, Luis, Javier, Anna, Kattis,
Yuri, Memo, Pamela, Cecilia, Ana Lin, Margarita y
a todos aquellos que no mencioné gracias por
compartir tristezas, enojos, alegrías, todo
forma parte de la divertida y compleja
vida del ser humano.

A un ser especial quien estuvo presente poco
tiempo pero de quien aprendí tanto, no sólo
conviviste en armonía y me hiciste feliz sino que
te aferraste hasta el último momento por la
vida tratando de evitar mi sufrimiento
Mimi todavía te extraño.

Ing. Jorge, I.Q. Betsabé, Q.F.B. Ma. de Jesús y todos
mis profesores de carrera de quienes recibí
conocimiento gracias por compartir su
experiencia y darnos cada día
lo mejor de ustedes.

A mi Universidad a la que no defraudaré en su propósito
de hacerme una mejor persona, humildad en todo
lo que me proponga e inquietud para
contribuir a un futuro mejor.

Con todo mi amor quiero dedicar este trabajo a una persona que forma parte de mi corazón y mi vida, de quien nunca recibí una queja y en cambio me dió apoyo, atención, amor y paciencia, alguien de quien estoy muy enamorada y orgullosa porque paso a paso va logrando lo que se propone. Mi logro es tuyo. Compañero por siempre.

Mauricio Frutos Rubio
Te amo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Generalidades.....	2
1.2. Aspectos clínicos.....	9
1.3. Ciclo biológico del parásito.....	9
1.4. Vacunas.....	15
1.5. Algunos impedimentos para vacunas contra malaria.....	16
1.6. Epitopos.....	17
1.7. Proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. MODELO EXPERIMENTAL.....	21
4. OBJETIVO.....	22
5. HIPÓTESIS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1. Cepas bacterianas.....	22
6.2. Plásmidos.....	22
6.3. Estrategia de clonación.....	24
6.3.1. Elaboración de fusión OmpC -NANP' s.....	24
6.3.2. Ingeniería Genética.....	28
A. Digestiones.....	30
B. Electroforesis en gel de agarosa.....	30
C. Purificación de proteína de fusión.....	30
D. Desfosforilación.....	31
E. Ligación.....	32
F. Transformación.....	32

6.4	Identificación de las colonias transformadas.....	32
6.4.1	<i>Colony Blot</i>	32
6.4.2	Obtención de DNA plasmídico.....	33
6.5	Verificación de la presencia del gen de la construcción OmpC - NANP's.....	34
6.5.1	<i>Southern Blot</i>	34
6.5.2	Extracción de RNA y detección de RNAm por <i>Northern Blot</i>	35
6.6	Búsqueda del marco de lectura en clonas positivas.....	35
6.7	Verificación de la expresión de la proteína de fusión OmpC - NANP's.....	36
6.7.1	Obtención y purificación de proteínas de membrana externa.....	36
6.7.2	Cuantificación de proteína.....	36
6.7.3	Electroforesis de proteínas de membrana externa en geles de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>).....	37
	A. Tinción con azul de Coomassie.....	37
	B. Tinción de plata.....	38
6.7.4	Inmunoelctrotransferencia (<i>Western Blot</i>).....	38
6.7.5	Ensayo de citofluorimetría indirecta (<i>FACS</i>).....	39
7.	RESULTADOS.....	40
7.1	Construcción de la proteína de fusión e ingeniería genética.....	40
7.2	Identificación de colonias positivas.....	48
7.3	Presencia y funcionalidad del gen de la construcción OmpC-NANP's.....	49
7.4	Marco de lectura en clonas positivas.....	54
7.5	Expresión de la proteína de fusión en la superficie de <i>Escherichia coli</i>	58
8.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	64
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Representación del Ciclo Biológico del Parásito.....	10
2. Estructura secundaria de la porina OmpC de <i>Salmonella typhi</i>	19
3. Mapa del plásmido pST 13-OmpC.....	23
4. Sustitución del asa 5 por parte del epitopo (NANP) ₃	25
5. Localización de los oligonucleótidos en el plásmido pST13.....	27
6. Producto de fusión en el plásmido pST13.....	29
7. Desfosforilación del DNA.....	31
8. Electroforesis en gel de agarosa de los subproductos A,B y producto de fusión.....	41
9. Mapa del producto de fusión.....	42
10. Electroforesis en gel de agarosa del mapa del producto de fusión.....	43
11. Vector e inserto digeridos con la enzima de restricción Kpn I.....	45
12. Electroforesis en gel de agarosa del vector e inserto.....	46
13. Electroforesis en gel de agarosa de purificación mediante la técnica de <i>Gene Clean</i> de vector e inserto.....	47
14. <i>Colony Blot</i>	49
15. Mapa del plásmido pST13 OmpC - NANP's.....	50
16. Electroforesis en gel de agarosa del mapa de la construcción OmpC - NANP's.....	51
17. Placa de <i>Southern Blot</i>	52
18. Placa de <i>Northern Blot</i>	53
19. Clona sin marco de lectura.....	55
20. Clona con marco de lectura.....	56
21. Electroforesis en gel de agarosa de clonas con marco de lectura y clonas sin marco de lectura.....	57
22. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie.....	60
23. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata.....	61
24. <i>Western Blot</i> de OmpC.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

1. Candidatos a vacuna.....	5
2. Curva estándar empleada en la cuantificación de proteínas de membrana externa por el método de Lowry.....	59
3. Expresión de proteína OmpC - NANP's en la superficie de <i>E.coli</i> UH302 transformada.....	63

PRINCIPALES ABREVIATURAS

BHI	Infusión cerebro corazón.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CIP	Fosfatasa intestinal de ternero
CSP	Proteína circumsporozóitica.
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico.
dNTP's	Desoxinucleótidos
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
HEPES	N-2 hidroxietilpiperazina-N'-ácido etanolsulfónico.
Kb	Kilobases.
kDa	Kilodaltones
NANP	Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina
Omp	Proteína de membrana externa
pb	Pares de bases.
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RNA	Acido ribonucleico.
RNA^m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
SSI	Solución salina isotónica.
SSC	Cloruro de sodio en citrato de sodio pH 7.0
TAE	Tris-Acetato / EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilén diamino.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

El Paludismo continua siendo un problema de salud pública. La infección natural por *Plasmodium* induce respuesta estadios específica, que protege parcialmente a la reinfección. Una vacuna efectiva deberá proteger contra las formas exoeritrocítica, intrahepáticas y sexuales del parásito. Desafortunadamente se ha comprobado que la vacuna elaborada a partir de péptidos sintéticos que contiene antígenos del esporozoito y del merozoito, que durante algún tiempo fue la alternativa más prometedora, confiere protección muy limitada y por tanto, todavía no existe una vacuna cuya aceptación sea universal. La proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum* es uno de los antígenos más estudiados que pudiera formar parte de una vacuna contra el paludismo. Se logró expresar el epitopo de *Plasmodium falciparum* (NANP)₃ en la superficie de *Escherichia coli* para que sea más accesible a los linfocitos B y genere una respuesta de anticuerpos más eficiente.

A partir de la estructura cristalográfica de OmpF de *Escherichia coli*, se predijo la estructura secundaria de OmpC, identificando las asas expuestas al medio. Partiendo del plásmido pST13 se amplificaron dos regiones de OmpC flanqueando a la secuencia que codifica para el asa cinco la cual fue sustituida por la secuencia que codifica para el epitopo (NANP)₃ de *Plasmodium falciparum* en una segunda amplificación. El gen quimérico se reinsertó en el plásmido pST13. Se transformó *Escherichia coli* UH302 con el plásmido pST13 mencionado anteriormente y por medio de citofluorometría (FACS) se comprobó la producción de la proteína quimérica en la superficie.

Considerando que se cuenta con una proteína quimérica funcional, en futuros trabajos se deberá evaluar su inmunogenicidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El paludismo continúa siendo un problema de salud pública en amplias zonas de los países tropicales, a pesar de los esfuerzos que se han desarrollado durante décadas para lograr su erradicación. Se calcula que tres quintas partes de la población mundial viven en áreas palúdicas⁶³. En México, se estima que las áreas palúdicas corresponden a cerca de la mitad del territorio nacional y que aproximadamente el 10% se debe considerar como de alto riesgo¹³. El grupo más afectado es el de 5 a 14 años y los estados donde se presentó la mayor incidencia fueron Oaxaca, Sinaloa, Michoacán^{9, 43} y Chiapas.

La malaria en humanos es causada por cuatro especies de parásitos del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Aunque el *P. vivax* es responsable de la mayoría de las infecciones de malaria en el mundo, la forma más severa de malaria es causada por *P. falciparum*. La severidad de la enfermedad depende grandemente del estado inmunológico de la persona infectada⁶³.

La infección natural por *Plasmodium* induce una respuesta inmune protectora débil. Los individuos residentes en áreas endémicas que sufren infecciones repetidas presentan manifestaciones clínicas que son más frecuentes en los primeros años de vida, después de años de infecciones y al llegar a la edad adulta alcanzan una inmunidad protectora parcial estado que se caracteriza por la ausencia de manifestaciones clínicas de la parasitosis; esta inmunidad antiparasitaria que se conoce como premunición, es de corta duración y desaparece cuando el individuo deja de exponerse al agente infeccioso^{7, 61, 124}.

Por otro lado, la inmunidad que induce la infección por *Plasmodium* es específica de especie, pues la resistencia adquirida contra *P. falciparum* no protege en infecciones con *P. vivax*⁷. También existe inmunidad protectora específica del estadio parasitario, pues se ha demostrado que una respuesta protectora contra esporozoitos, no es efectiva contra la infección por formas sanguíneas y viceversa^{7, 20, 69}.

El ciclo biológico del protozooario es tan complejo que dificulta el desarrollo de una vacuna ideal ya que ésta deberá inducir una respuesta inmune capaz de controlar la infección por el esporozoito durante el corto período que el parásito permanece en el torrente sanguíneo, proteger contra los merozoitos extracelulares, liberados a partir de los hepatocitos o eritrocitos infectados y por último ser efectiva contra las formas sexuales. En consecuencia, una vacuna óptima tendría que ser polivalente, incluyendo antígenos de las diferentes fases del ciclo biológico del parásito^{61, 63}

Las vacunas contra las formas preeritrocíticas del parásito han sido ampliamente estudiadas; primero se observó que la inmunización de ratones con esporozoitos de *P. berghei* atenuados con rayos X, los protegía contra el reto con esporozoitos no atenuados^{73, 115}. Posteriormente, se realizaron experimentos similares en monos utilizando *P. knowlesi*³⁶ y en voluntarios humanos con esporozoitos de *P. falciparum* y *P. vivax*, sin embargo, la protección que se logró en humanos fue de corta duración y específica de especie¹⁹.

La inmunidad mediada por linfocitos T cooperadores y citotóxicos también es importante pues los humanos generan células citotóxicas contra antígenos parasitarios⁶⁴, y la administración de linfocitos inmunes a ratones normales los protege de la infección inducida con esporozoitos en ausencia de anticuerpos⁹³. El desarrollo de parásitos en cultivos de células del hígado puede inhibirse con interferón gamma^{28, 97}.

El óxido nítrico se presenta al llegar al pico de la parasitemia que se detecta como nitrato en la sangre y contribuye a la respuesta inmune protectora contra la infección⁸⁹. Se ha visto que el óxido nítrico tiene también un papel muy importante en el control de infecciones con *Plasmodium*, debido a que inhibe el desarrollo de los estados exoeritrocíticos de *P. berghei* y *P. yoelli* *in vitro* (Géneros de *Plasmodium* que infecta a ratones)⁸⁹. Se ha descrito que la liberación del óxido nítrico va relacionado a la unión de la citocina TNF (Factor de Necrosis Tumoral) con su receptor presente en los neutrófilos y ayuda a suprimir estados asexuales eritrocíticos de *P. falciparum* *in vitro* pero no se ha descrito el mismo efecto *in vivo*.⁵⁰

La protección parece estar mediada por anticuerpos, dirigidos principalmente contra la **proteína circumsporozoítica (CSP)**, porque los anticuerpos contra esta proteína también inhiben actividades del parásito *in vitro*⁶⁸ y las infecciones naturales con ***Plasmodium*** en zonas endémicas inducen anticuerpos contra la CSP⁶⁹. La **CSP** es una proteína ácida de 40 a 60 kDa, específica de especie y de fase⁶³. Se ha logrado aislar el gen que codifica para la CSP en diversas especies de ***Plasmodium*** y se sabe que sólo hay una copia en el genoma del parásito^{27, 71}.

La estructura general de la proteína está muy conservada en todas las especies del parásito cuya región central, es especie específica y contiene secuencias de aminoácidos que se repiten. En ***Plasmodium falciparum*** la unidad de repetición en la región central es el péptido NANP (**Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina**).²⁴ Esta unidad de repetición es el blanco principal de la respuesta inmune humoral. Como se sabe que son necesarias tres de estas unidades de repetición para constituir un epitopo de células B, se ha intentado desarrollar vacunas que contengan péptidos sintéticos (NANP)₃ acoplados a toxoide tetánico o a otras moléculas acarreadoras. Estas vacunas, sin embargo, no han demostrado generar protección efectiva^{34, 64}. Por último, es importante señalar que también se han descrito epitopos de células T en la CSP^{51, 120}, los cuales pueden ser importantes en los mecanismos protectores contra el parásito.

Existen algunos inmunógenos prometedores como candidato a vacuna en los que se encuentran péptidos sintéticos de antígenos de la fase eritrocítica⁶³ que actualmente está siendo evaluada en ensayos de campo; otros que bloquean la transmisión del parásito²⁵ así como las vacunas dirigidas contra las fases hepatocíticas del parásito⁷¹.

(Tabla 1)

La utilización de **acarreadores vivos** que expresen antígenos parasitarios, representa una alternativa para desarrollar vacunas contra el paludismo. Entre las evidencias que apoyan esta opción destaca la inmunización de ratones con ***Salmonella typhimurium*** expresando CSP de ***P. falciparum*** donde se genera respuesta inmune celular, dependiente de linfocitos citotóxicos, en ausencia de producción de anticuerpos.⁶³

Tabla 1 : Candidatos a vacuna

CANDIDATOS A VACUNA	AÑO	CARACTERÍSTICAS GENERALES
Pfs 230 y Pfs 48/45	1983	Proteínas de la superficie del gameto de <i>P. falciparum</i> . No se ha obtenido la respuesta de anticuerpos necesaria para evitar el desarrollo del parásito en el vector. ⁸⁸
CSP	1984	Proteína circumsporozoítica localizada en la superficie de los esporozoitos. Individuos expuestos a la infección desarrollan respuesta inmune celular y humoral contra esta proteína. Está formada por repeticiones de NANP's y otros aminoácidos. ^{27, 28, 34, 51, 71, 120}
p18 y p32	1985	Proteína expresada principalmente por cigotes y oocinetos. Inmunización de animales con estas proteínas no dieron la protección humoral esperada. ¹⁷
PrSSP2 (TRAP)	1986	Proteína 2 de la superficie del esporozoito genera linfocitos T citotóxicos restringida a HLA B8. ^{17, 100}
NF54	1987	Es un gen de la proteína circumsporozoítica que es reconocida por linfocitos T humanos y está constituida por 40 repeticiones de NANP's y 4 de NVDP's. No se ha obtenido la protección celular esperada. ¹⁴
SPF66	1987	Está constituida por tres antígenos del estado asexual del <i>P. falciparum</i> en la sangre y éstos son Pf83, Pf35, Pf55 unidos por secuencias de NANP's. Se ha obtenido protección del 30 % pero no en forma consistente. ^{3, 5, 23, 55, 82, 84, 90, 107, 114, 123}
MSP-1	1987	Proteína de 42 kDa de la superficie de los merozoitos la cual produce inmunidad humoral protectora. Falló en la inducción de anticuerpos inhibidores del crecimiento del parásito. ^{15, 42, 104}
PfMSP-1 ₁₉	1987	Proteína de 19 kDa de la superficie de los merozoitos. No se ha podido concluir que este epitopo sea protectoro. ⁸⁹
CARP	1988	Epitopo lineal de la superficie de los merozoitos y es un blanco de linfocitos B y T. No se ha obtenido respuesta humoral, sólo celular en individuos recién expuestos a la infección

1 INTRODUCCIÓN

NANP	1988	Es la región repetitiva de aminoácidos presentes en la proteína circumsporozoítica de <i>P.falciparum</i> contra la cual van dirigidos la mayoría de los anticuerpos que inhibirán la invasión de esporozoítos en cultivos de células hepatocíticas. Se ha utilizado el epitopo combinado con otros aminoácidos pero no se ha obtenido la protección adecuada. ^{24, 26, 64, 66}
MSP-2	1988	Antígeno de superficie de los merozoítos que produce anticuerpos específicos que inhiben la invasión a eritrocitos en el modelo murino. ^{87, 123}
AMA-1 (Pfs3)	1989	Antígeno de membrana apical del parásito de 82 kDa de la superficie de los merozoítos. Es capaz de conferir un grado significativo de protección si la proteína es preservada. ^{53, 66}
RAP 1 y RAP 2 (QF3)	1990	Proteína que forma parte de un organelo osmeofílico del merozoito. Da lugar a anticuerpos que inhiben parcialmente la invasión de eritrocitos <i>in vitro</i> . ¹⁰²
RESA	1991	Antígeno presente en los merozoítos y en el esqueleto de los eritrocitos una vez invadidos los pacientes presentan un alto título de anticuerpos contra este antígeno. Se requiere un estudio de adyuvantes para producción adecuada de anticuerpos. ^{117, 123}
PREB200	1992	Antígeno asociado a la membrana del trofozoito y eritrocito infectado. Produce respuesta de anticuerpos y células de memoria. Blanco importante para la opsonización <i>in vitro</i> . Se han inmunizado ratones pero no se ha obtenido la respuesta humoral esperada. ⁶⁴
R23	1992	Antígeno expresado en trofozoítos jóvenes y mantenidos en la esquizogonia. Da lugar a respuesta humoral pero no se obtuvo protección. ⁶⁴
RLF	1993	Antígeno recombinante de <i>P.falciparum</i> que contiene el carboxi y amino terminal de la proteína circumsporozoítica sin la repetición central de tetrapéptidos (NANP). Requiere de un adyuvante adecuado para obtener la respuesta de anticuerpos en el modelo murino.
CVD 908 - CSP	1994	Se utilizó <i>Salmonella typhi</i> como acarreador de la proteína circumsporozoítica dando respuesta citotóxica en humanos pero resultó de toxicidad para la bacteria por lo cual no se pudo producir en forma masiva. ^{20, 61}
NYVAC-CSP	1996	Se utiliza el virus de vaccinia recombinante para expresar la proteína circumsporozoítica dando respuesta de linfocitos T citotóxicos y formación de anticuerpos en ratones confiriendo protección. ⁵⁴

La cepa de *Salmonella typhi* CVD908 (aro⁻), que proviene de la cepa *Salmonella typhi* Ty2⁴⁰, es uno de los mejores candidatos para ser utilizado como acarreador vivo pues es altamente inmunogénica, atenuada y segura^{41, 106}.

En el caso del paludismo, en colaboración con el Centro para Desarrollo de Vacunas (CVD) en la Universidad de Maryland en Baltimore se obtuvo un candidato a vacuna que contiene el gen que codifica para la CSP de *Plasmodium falciparum*, integrado en el locus aroC de *Salmonella typhi* CVD908. Experiencias anteriores en el CVD habían demostrado que *Salmonella typhi* era capaz de expresar niveles bajos de CSP recombinante. Sin embargo, el incremento en los niveles de producción de CSP recombinante resultaba en toxicidad para la bacteria. Por ello se decidió obtener una forma modificada de CSP que permanece en el citoplasma y que contiene intactas las secuencias que codifican para regiones inmunológicamente importantes³¹. Este gen truncado de CSP se integró en el cromosoma de *Salmonella typhi* CVD908 en el locus aroC, bajo el control del promotor tac. La cepa candidato a vacuna resultante no mostró cambios en su atenuación y fue capaz de expresar de manera estable a la CSP. En ensayos clínicos de fase 1 en humanos, la expresión fue estable y cuatro de diez voluntarios humanos desarrollaron anticuerpos y otro presentó células citotóxicas contra antígenos del parásito³¹. Es interesante hacer notar que ninguno de los voluntarios desarrolló anticuerpos contra la región central NANP que es el epitopo de células B dominante.

Otro acarreador vivo que se ha utilizado es el virus de la vaccinia al cual se incorporó la CSP y ha dado respuesta citotóxica y de anticuerpos en modelos murinos.⁵⁴

Manuel Elkin Patarroyo, (médico) inventó la primera vacuna contra malaria conocida como SPf66 el cual es un péptido sintético polimérico con secuencias de aminoácidos derivados de tres estados eritrocíticos de *P. falciparum*: Pf83 (parte de MSA-1), Pf35 y Pf55, los cuales se encuentran unidos por secuencias repetitivas de NANP presentes en la CSP¹⁰⁷. La vacuna ha sido aplicada a cientos de personas y su seguridad está siendo evaluada. Las primeras pruebas de eficacia han sido revisadas

La vacuna ha sido estudiada en varias zonas probando la eficacia en monos y ha sido aplicada a voluntarios de Venezuela, Ecuador, Gambia, Colombia y Tanzania.

La eficacia reportada en Colombia contra malaria clínica fue de 33.6% teniendo un nivel de protección similar.¹¹⁴ Se vacunaron diferentes grupos de edad en áreas donde el rango de transmisión fue bajo.

En Tanzania, donde la transmisión de la malaria es más intensa se vacunaron niños de 1 a 4 años de edad donde la protección reportada fue de 31%³ que en contraste con la prueba realizada en Gambia donde la vacuna fue aplicada a niños de 6 a 11 meses, SPf66 no protegió contra la infección de malaria ni contra la caída del volumen del paquete celular asociado a su transmisión.²³

La edad de los niños vacunados podría ser un factor importante debido a que los niños más jóvenes de Gambia posiblemente no presentan nivel de competencia inmunológica para responder a una infección a pesar de que desarrollaron respuesta humoral a SPf66. La mayoría de los niños de Gambia no habían tenido un ataque de malaria antes de la vacunación por el contrario los niños de Tanzania habían presentado una o más infecciones con lo cual se pudo haber desarrollado inmunidad.

Lo óptimo y quizá lo único efectivo en una vacuna es probablemente inducir respuesta a los diferentes estados del ciclo de vida, generando la respuesta inmune apropiada (anticuerpos, células CD4+ o CD8+) en cada caso. En teoría esto podría lograrse con construcciones de péptidos sintéticos, vacunas de DNA, proteínas recombinantes purificadas, o mediante la expresión viva en virus, hongos o bacterias. Se han expresado antígenos de forma exitosa en vaccinia y NYVAC Pf7 el cual está probándose en fase 1 y 2.⁷⁵

Actualmente se propone otra estrategia que es el uso de **proteínas acarreadoras de antígenos**. La contribución más importante de este trabajo fue el haber logrado la expresión del epitopo inmunodominante (NANP)₃ en la superficie de una *Escherichia coli* deficiente en porina OmpC por medio de su transformación con un

plásmido que contiene el epitopo (NANP)₃ integrado a la porina OmpC de *Salmonella typhi*.

1.2. ASPECTOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas de malaria son variadas. En áreas donde la malaria es común, individuos infectados pueden presentar síntomas similares a otras enfermedades lo cual hace difícil una correcta diagnosis. como es el caso de los niños quienes pueden presentar altos niveles de parásitos en la sangre pero con síntomas relativamente ligeros.

La infección debido a *P. falciparum* es generalmente una emergencia médica en donde la ausencia de una pronta intervención puede llevar a un rápido deterioro del paciente llegando a menudo a la muerte. El 80% de las muertes resultan de malaria cerebral, un estado de inconciencia a veces relacionado a coma. La enfermedad puede presentar fallas renales, hipoglicemia, anemia severa, edema pulmonar y choque. En el caso de mujeres embarazadas es un riesgo entre el primer y tercer trimestre debido al desarrollo de anemia que puede llevar a la muerte⁶³.

1.3. CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO⁶³

El parásito es transmitido a humanos por las formas esporozoíticas presentes en la saliva de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Dependiendo del desarrollo del estadio así como de la especie, los parásitos de malaria pueden ser esféricos, elongados, en forma de anillo o en forma creciente y pueden alcanzar en tamaño de 1 a 20 micras en diámetro.

El ciclo de vida del parásito que causa la malaria es complejo (Figura 1). El proceso está dividido en doce pasos dentro de los cuales tres fases son en el mosquito y dos en el humano.

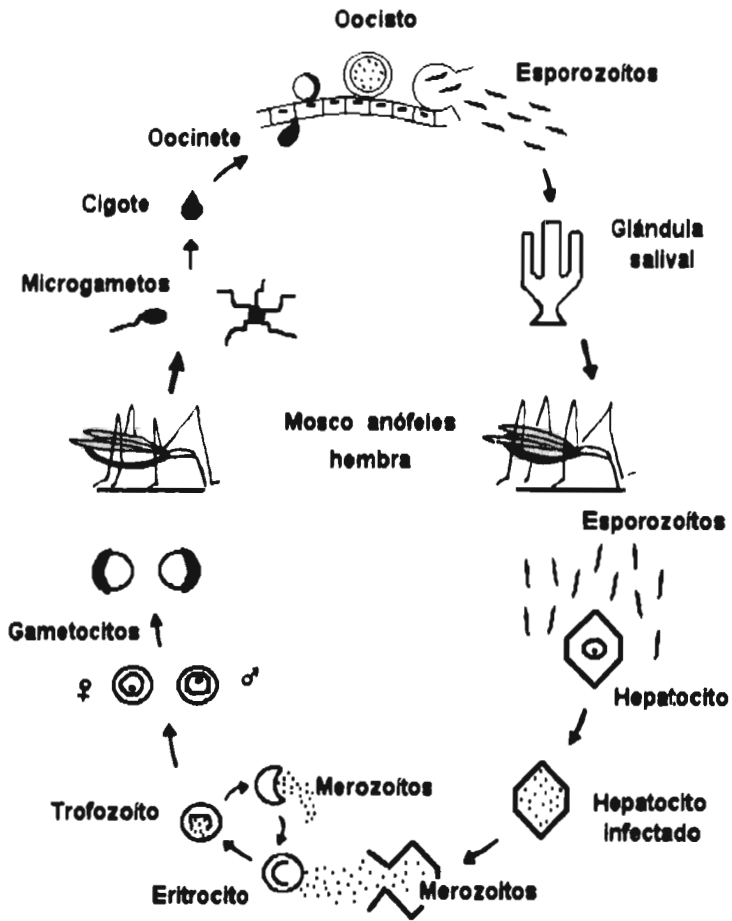


Figura 1 : Representación del Ciclo Biológico del Parásito basado en el libro Malaria Obstacles and Opportunities. ⁶³

Fase preeritrocítica o hepatocítica⁸³

El parásito es transmitido a humanos en forma de esporozoítos que se encuentran en la saliva de mosquitos hembra infectados. El mosquito es del género **Anopheles**. Después de entrar al humano (hospedero) los esporozoítos invaden hepatocitos, donde durante los siguientes 5-15 días llevan a cabo una reproducción asexual dando lugar 30,000 parásitos hijos llamados merozoítos los cuales son liberados del hígado e invaden eritrocitos.

La superficie del esporozoíto es cubierta con muchas copias de una proteína que es importante en el reconocimiento de la célula hospedera y quizá la invasión de ésta. Los anticuerpos a ciertas porciones de esta proteína circumsporozoítica puede prevenir que los esporozoítos entren a células del hígado en cultivo y con esto prevenir la infección^{17, 24, 26, 27, 34, 51, 64, 66, 71, 120}. La proteína circumsporozoítica puede ser detectada a través del desarrollo del parásito en el hígado como merozoíto. Esta proteína tiene propiedades antigénicas y aunque ha sido vista en varios esporozoítos de *Plasmodium* la composición actual de estas proteínas es específica de las especies.

La esquizogonia en el hígado no presenta manifestaciones patológicas pero recientemente se ha visto que existen mecanismos de inflamación e infiltración celular incluyendo células T citotóxicas las cuales pueden ser inmunológicamente importantes.

Los esporozoítos atenuados por irradiación han sido ampliamente estudiados por dar excelente protección contra el posterior reto en animales, incluyendo humanos a pesar de que el número de picaduras infectivas de mosquitos irradiados para conferir resistencia es grande⁴⁶.

La mayoría de las tentativas para reproducir esta inmunidad se ha enfocado en la expresión sintética y recombinante de parte de la proteína circumsporozoítica (CSP) y en particular la región de la molécula que consiste en repeticiones de pequeñas secuencias de aminoácidos, como asparagina-alanina-asparagina-prolina (NANP) aunque la secuencia es inmunodominante durante las infecciones naturales, las pruebas con candidatos a vacunas basadas en esta estructura ha sido desaprobado en términos de nivel de protección ¹¹.

Estudios clínicos mencionan que para incrementar la inmunización con esporozoitos directos se ha incluido el uso de múltiples péptidos antigénicos que contengan regiones repetitivas (epitopos de B y de T) utilizando la toxina tetánica como un adyuvante no iónico además de liposomas. ¹⁰⁷

La repetición NANP más la terminación C' de CSP se ha expresado en cepas con antígenos de superficie de hepatitis B ³⁵, y la inmunización oral con CSP de *P.falciparum* ha sido expresada en *Salmonella typhi*. ³²

Se ha utilizado la inyección de DNA que codifica para CSP la cual ha dado respuesta de células T citotóxicas y de anticuerpos así como buena protección contra *P. yoelli* en ratones ⁹⁸. Vacunas similares contra antígenos de la formas preeritrocíticas y estados eritrocíticos están siendo evaluadas.

Se ha demostrado que la molécula de histocompatibilidad HLA I Bw53 confiere protección contra malaria cerebral y anemia severa. ³⁸ En Africa extensos estudios de 6 haplotipos de HLA I reportaron la presencia de epitopos de antígenos presentes en cuatro estados preeritrocíticos entre los que se tienen: CSP, LSA-1 TRAP, STARP (proteína de esporozoito rico en treonina y asparagina) los estudios en niños y adultos revelaron un número pequeño de células citotóxicas en algunos de ellos ²

Fase eritrocítica⁶³

Cuando los merozoítos son liberados del hígado dentro del torrente sanguíneo comienza la reproducción asexual o esquizogonia eritrocítica. La invasión de eritrocitos se dan en 4 pasos:

1. Ataque del merozoíto al eritrocito.
2. Rápida deformación de eritrocitos.
3. Invaginación de la membrana del eritrocito donde el parásito es incluido y envuelto.
4. Liberación de la membrana del eritrocito alrededor del parásito.

Una vez dentro de los eritrocitos cada merozoíto madura en un esquizonte conteniendo 8 a 32 nuevos merozoítos, los cuales son liberados para invadir más eritrocitos. Al romperse los eritrocitos se presenta fiebre y signos de la infección.

La fase de ataque es un blanco potencial para desarrollar vacunas como anticuerpos que interfieran con este proceso y puedan prevenir la invasión del parásito a eritrocitos. 15, 42, 83, 84, 87, 104, 117, 123 Los eritrocitos tienen receptores para parásitos de malaria en la superficie, aunque estos receptores quizá sean diferentes para otro género de parásito.

En los últimos años se han identificado un gran número de proteínas candidatas a vacuna de la fase eritrocítica así como las funciones vitales del parásito para bloquear su desarrollo e invasión en las células rojas. El antígeno de superficie del merozoíto MSA-1 induce respuesta natural de anticuerpos y su forma recombinante ha sido altamente efectiva en roedores⁵⁶ desafortunadamente no se ha tenido el mismo efecto en primates. El dominio de la membrana apical AMA-1 expresada en *Escherichia coli* y replicada *in vitro* dieron buena protección pero ésta fue específica de cepa contra *P. chabaudi adami* en ratones.

Fase en el mosquito⁶³

Algunos merozoítos diferenciados en formas sexuales (gametocitos) son ingeridos por un mosquito durante su alimento. Una vez presente en el mosquito la forma sexual deja a los eritrocitos y da lugar a que los gametos masculinos y femeninos se fusionen para formar un cigote. De 12 a 48 horas los cigotes se elongan y forman un oocinete. El oocinete penetra la pared del estómago del insecto llamándose oocisto. En la siguiente semana o más dependiendo de la especie del parásito y la temperatura, el oocisto desarrolla en su interior a más de 10000 esporozoítos. En esta fase el parásito presenta otras proteínas de superficie correspondientes al gameto⁶⁸ las cuales serían un blanco perfecto para bloquear con anticuerpos evitando así el desarrollo del parásito en el vector. Cuando el oocisto se rompe los esporozoítos migran a las glándulas salivales del mosquito de donde quizá sean inyectados dentro de un humano (hospedero) al alimentarse el mosquito completando de esta forma el ciclo.

Se han diseñado vacunas cuyo principal objetivo es prevenir la infección en el mosquito reduciendo de esta forma la transmisión y la propagación de genes responsables en la resistencia a fármacos y vacunas además de evitar la eficacia en otras medidas de control. El mecanismo por el cual se bloquea la transmisión del parásito es predominantemente mediado por anticuerpos. La respuesta inmune dirigida contra antígenos de gametos como Pfs230 y Pfs48/45 de *P.falciparum* son antígenos presentes en gametocitos circulantes. A pesar de que ambos han sido secuenciados y expresados en forma recombinante no se ha podido expresar anticuerpos bloqueadores de la transmisión probablemente por la dificultad de construir la estructura terciaria de epitopos de células B.¹³ Se ha tratado de inducir respuesta inmune con antígenos de superficie del oocinete como Pfs25 en donde su forma recombinante ha dado lugar a una inmunidad en la transmisión del parásito en roedores, monos.⁴⁹ siendo aprobado en pruebas clínicas de fase 1

1.4. VACUNAS

Ante la resistencia de los mosquitos vectores del paludismo a los insecticidas y la de los parásitos productores de esta enfermedad a los fármacos antipalúdicos, la posibilidad de una vacuna efectiva se vislumbra como un arma más debido a que la malaria anualmente cobra entre 2 y 3 millones de muertes.⁹¹

El objetivo al que la mayoría de los investigadores en vacunas quieren llegar es **desarrollar una vacuna que confiera protección a largo plazo con pocos efectos secundarios de tal forma que interrumpa, regule y controle la transmisión de malaria en cualquier estadio del parásito.**

En consecuencia una **vacuna óptima** contra paludismo tendría que ser polivalente, incluyendo antígenos de las diferentes fases del ciclo biológico del parásito.

Dicha vacuna desarrollará en el individuo:

- Anticuerpos contra esporozoitos que prevenga la invasión a hepatocitos.
- Producción de interferón gama y otras citocinas que inhiban el desarrollo del parásito en los hepatocitos.
- Activación de linfocitos T citotóxicos que puedan lisar hepatocitos infectados.
- Anticuerpos contra merozoítos que puedan prevenir la invasión a eritrocitos.
- Anticuerpos contra gametocitos, gametos u oocinetos que prevengan el desarrollo de los esporozoitos dentro del vector.

De acuerdo al complejo ciclo biológico del parásito se tiene un número elevado de blancos para la vacunación, cuatro estrategias para el desarrollo de vacunas antimaláricas se siguen actualmente.⁶³

1. **Vacunas contra estadios pre-eritrocíticos**, estas vacunas pretenden inactivar al parásito antes y después de su entrada a células hepáticas.
2. **Vacunas contra estadios asexuales**, cuando el parásito está presente en eritrocitos dichas vacunas, disminuirían el grado de parasitemia y con ello la enfermedad y mortalidad.
3. **Vacunas dirigidas contra las toxinas que liberan las formas eritrocitarias**, con lo cual la gravedad de la enfermedad sería controlada.
4. **Vacunas dirigidas contra estadios sexuales** que tienen como fin impedir la transmisión del parásito al bloquear su desarrollo en el mosquito.

Sin embargo, se prevé que la vacuna ideal será una combinación de éstas utilizando un vector vivo u otro sistema que ayuden al bloqueo del desarrollo del parásito.

1.5 ALGUNOS IMPEDIMENTOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA MALARIA^{63, 91}

Los problemas principales para el desarrollo de vacunas antimaláricas eficaces incluyen:

1. Diversidad y variación antigénica de los parásitos.
2. Efecto de factores genéticos en la población en riesgo que controlan la respuesta inmune a los antígenos del parásito.
3. Los esporozoítos así como otros estadios del parásito de la malaria no pueden ser producidos en suficiente cantidad y pureza para ser usados en inmunizaciones de humanos, además de que el procedimiento tiende a ser caro.
4. No se tiene el blanco de la respuesta inmune protectora deseada (ejemplo epitopos de células B como blanco para anticuerpos y epitopos de células T como blancos para linfocitos T citotóxicos).

5. No existen péptidos acarreadores para estimular linfocitos T cooperadores.
6. Falta de adyuvantes u otros sistemas para mejorar la magnitud y calidad de la respuesta inmune.

1.6 EPITOPOS ¹⁰¹

Aunque los inmunógenos poderosos son moléculas grandes, sólo porciones restringidas de ellos participan en la captación real con los sitios de combinación del anticuerpo. Tales áreas que determinan la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo se denominan **epitopos** (llamados antes determinantes antigénicos). El número de diferentes determinantes en una molécula de antígeno, por lo general varía con su tamaño y complejidad química.

Se ha encontrado que prácticamente **cualquier región sobre la superficie expuesta de una proteína**, puede servir como epitopo. La complementariedad de anticuerpo está dirigida contra partes limitadas de la molécula antigénica.

Estudios donde se han utilizado homopolímeros de azúcares o aminoácidos indican que un epitopo es de alrededor de cuatro a seis moléculas de aminoácido o azúcar. Las subunidades de aminoácido de un epitopo contribuirán de manera desigual a la unión con el anticuerpo. Los péptidos expuestos a los cuales se les generará una respuesta inmunológica se les conoce como **secuencia consenso**. La especificidad por el anticuerpo puede estar dirigida contra características conformacionales o **secuenciales de antígeno**.

Los epitopos cuya especificidad es dictada por la **secuencia de subunidades (aminoácidos o azúcares)** dentro de los epitopos más que por la superestructura molecular del antígeno, se denominan **epitopos secuenciales**. Los epitopos secuenciales pueden estar compuestos de **secuencias terminales o internas de macromoléculas**, o pueden añadirse de manera artificial a **acarreadores**.

1.7 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La envoltura de las bacterias Gram negativas consta de tres capas, la membrana citoplasmática, la peptidoglicana y la membrana externa. La membrana externa tiene el aspecto trilaminar típico de las membranas biológicas. Esta estructura le confiere a la bacteria gran hidrofobicidad y la protege de los mecanismos de inmunidad inespecífica del hospedero.

Las porinas constituyen su componente mas abundante, pues pueden llegar a constituir hasta un 2% de la proteína total^{22, 72}. Aunque se han descrito varias porinas las más estudiadas en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* son OmpC, OmpF y PhoE. Se considera que las características generales de OmpF y OmpC de *Escherichia coli* se pueden generalizar al resto de las porinas de otras enterobacterias, pues debido al alto grado de homología funcional y estructural entre estas proteínas, se cree que evolucionaron de una gen ancestral común.

Salmonella typhi agente causal de la fiebre tifoidea es un bacilo Gram negativo, no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que sintetiza tres proteínas de membrana externa (Omp) : OmpC, OmpF y OmpA. En humanos con fiebre tifoidea se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos a Omp.

La porina OmpC de *Salmonella typhi* (Figura 2) se encuentra de forma conservada en once serotipos de *Salmonella* excepto *S. arizonae* además presenta asas expuestas que pueden ser modificadas para servir como acarreadores de epitopos heterólogos.⁸⁶ El gen que codifica para OmpC de *Salmonella typhi* ha sido aislado, se conoce su secuencia^{1, 116} y está clonado en el plásmido pST13. Estas proteínas tienen pesos moleculares de 33 a 38 kDa, se ensamblan como trimeros y forman canales que permiten la difusión inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas al interior de la bacteria.⁶

El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio, que tienen forma cilíndrica, semejante a un barril. Los estudios cristalográficos realizados en

OmpF y PhoE²² muestran que el barril está formado por 16 regiones de hojas β plegadas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras β de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1. En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal.

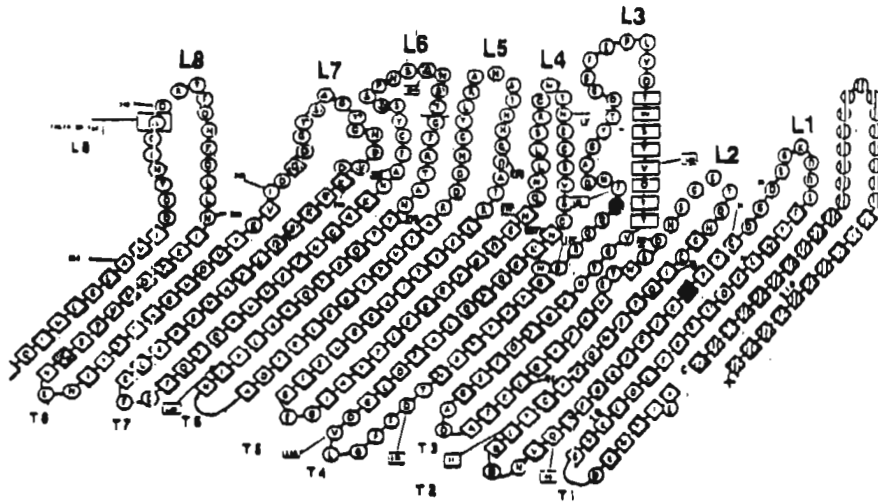


Figura 2 : Estructura secundaria de la porina OmpC de *Salmonella typhi* donde se observan los ocho *loops* ó asas externas

La entrada del poro está restringida por las asas largas y disperejas que se extienden hacia el centro. La salida del poro al espacio periplásmico está definido para las vueltas β . El mayor número de diferencias en la secuencia protéica entre una y otra porina se localiza en estas asas expuestas al medio externo y por tanto se les atribuye las discrepancias en el tamaño de entrada de los poros.

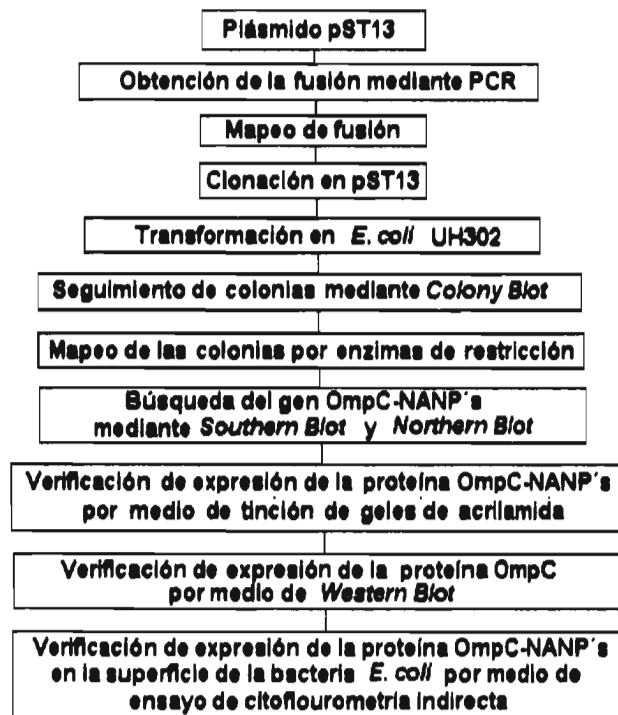
Los monómeros de las porinas se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa y formar trímeros²². La principal contribución a la formación del trímero es el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas β - 15 y β - 16, donde los diez residuos carboxilo de la región β -16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y la estabilidad de la porina ^{10, 103}.

La estructura de las porinas presenta una gran estabilidad en presencia de detergentes como las sales biliares y el SDS, y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas. La expresión de las porinas esta regulada por las condiciones de crecimiento, como la actividad osmótica y la temperatura. En un medio de cultivo común que contenga fuentes de C y N, factores de crecimiento y sales minerales, solo se producen OmpF, OmpC y OmpD. En cambio, PhoE se expresa únicamente bajo condiciones de escasez de fosfatos. La expresión de OmpF se reprime por la temperatura y la osmolaridad elevadas; por lo que algunas cepas no sintetizan esta proteína a 37°C o en presencia de aproximadamente 0.9% de NaCl. Por el contrario, la expresión de OmpC se favorece con niveles elevados de sales. Por último, se han descrito mutantes de *Salmonella typhi* carentes de porinas, esta mutación las hace mas resistentes al cloramfenicol ¹⁰⁹

En el presente proyecto se pretende construir un plásmido que contenga epitopos de *Plasmodium falciparum* en el asa cinco de la porina OmpC la cual se encuentra formando parte del plásmido utilizado y posteriormente transformar una bacteria *Escherichia coli* con la construcción para que exprese dichos epitopos en la superficie de la bacteria.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA :

Se construirán proteínas de fusión entre la porina OmpC de *Salmonella typhi* y el epitopo inmunodominante (NANP)₃ de *Plasmodium falciparum* de esta forma la proteína será transportada a la membrana externa. Se espera que la proteína de fusión que contiene el epitopo (NANP)₃ no trastornará la estructura tridimensional de la porina OmpC, pues se ha elegido como sitio de clonación la región que codifica para una asa externa.

3. MODELO EXPERIMENTAL:

4. OBJETIVO :

Expresar en la superficie de *Escherichia coli* la región central NANP de la proteína circumsporozoítica presente en *Plasmodium falciparum*.

5. HIPÓTESIS :

La proteína de fusión clonada en la porina OmpC presente en un vector y transformada en una *Escherichia coli* dará lugar a la expresión de dicha proteína en la superficie de la bacteria.

6. MATERIALES Y MÉTODOS**6.1 CEPAS BACTERIANAS**

- *Escherichia coli* UH302 , cepa mutante deficiente en porinas OmpC donada por el Dr. U. Henning.²¹
- *Escherichia coli* UH302 pST13 , cepa mutante que presenta el plásmido que tiene el gen que codifica para la OmpC.
- *Salmonella typhi* Ty2 , bacteria silvestre

6.2 PLÁSMIDOS

- pST 13: Donado por el Dr. Felipe Cabello. Contiene el gen que codifica para la porina OmpC y el gen que codifica para la resistencia a ampicilina.¹ (Figura 3)
- pST 13-OmpC-NANP's. Se reporta en este trabajo. Contiene el epitopo (NANP), de *Plasmodium falciparum* integrado al gen de la OmpC y el gen que codifica para la resistencia a ampicilina.

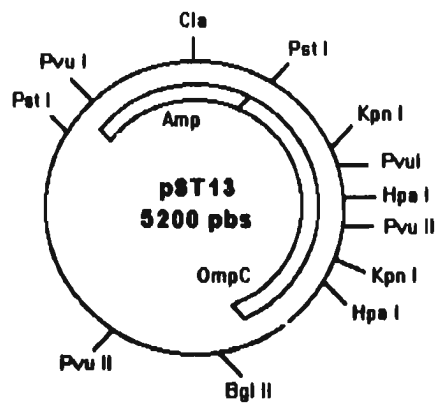


Figura 3 : Mapa del plásmido pST13. La figura muestra los sitios de restricción del plásmido; el inicio y final del gen que codifica para la porina OmpC así como la localización del gen que codifica para la resistencia a ampicilina (Amp).

6.3 ESTRATEGIA DE CLONACIÓN

6.3.1 Elaboración de fusión OmpC-NANP's

A partir de la secuencia de OmpC reportada en la literatura, se diseñaron oligonucleótidos (*primers* o cebadores) para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ⁹⁴ el gen que codifica para dicha proteína insertando la secuencia que codifica para (NANP)₃ utilizando como *template* el plásmido pST13.

Los oligonucleótidos internos serán híbridos con la secuencia que codifica para (NANP)₃ y la correspondiente a la asa cinco de OmpC. De tal manera que la fusión se logrará por PCR, después de amplificar por separado ambas mitades del gen. (**Figura 4**)

Los oligonucleótidos iniciadores empleados fueron, para el extremo 5' la secuencia:

5'	3'
AAC GCC AAT CCT AAC GCT AAT CCG AAC GCT AAC CCG GAT CGC GCC ACG GTT TAC	
N A N P N A N P N A N P D R A T V Y	
Región que codifica para NANP's Región que codifica para OmpC	

en el cual se incluyó un sitio de restricción Eco R I. Para el extremo 3', la secuencia:

3'	5'
TTT GCA TGA CCG CTA GTA TTG CCG TTA GGA TTG CGA TTA GGC TTG CGA TTG GGC	
K R T A D Q N A N P N A N P N A N P	
Región que codifica para OmpC Región que codifica para NANP's	

en el cual se incluyó un sitio de restricción Hind III.

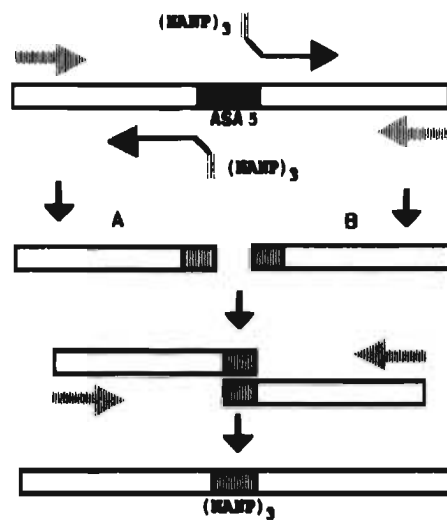


Figura 4 : Sustitución del asa 5 por parte del epítipo (NANP)₃ . La figura nos muestra la amplificación de dos subproductos que al unirse dieron lugar al producto de fusión el cual incluye el epítipo (NANP)₃ en el asa 5.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Robocycler, Stratagene), bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
DNA plasmídico pST13	0.1 mg
Oligonucleótidos o "primers"	50 µg
Mezcla de dNTP's	0.2 mM
MgCl ₂	1.3 mM
Taq DNA polimerasa	1 IU
Buffer de reacción 10X	10 µl
Agua inyectable c.b.p.	100 µl

A) En un tubo Eppendorf para PCR se puso lo siguiente : 1 µg del plásmido pST13 , 3 µl de dNTP's 10mM diluidos 1:10, 3 µl de amortiguador 10X, 2 µl de cloruro de magnesio 25mM, 3 µl de los cebadores correspondientes al principio y final del gen de la OmpC con NANP's (cebador 73 y 129 o cebador 128 y 127), (Figura 5) 10 µl de agua estéril, 2 µl de DMSO, 1µl de la enzima Taq-polimerasa de 1 IU / µl, 15 µl de aceite mineral grado Biología Molecular (Boehringer Mannheim). Se programó el termociclador Robocycler, Stratagene) con las siguientes condiciones.

NUMERO DE VENTANA	DESNATURALIZACION T°C / MINUTOS	ALINEAMIENTO T°C / MINUTOS	EXTENSION T°C / MINUTOS	NUMERO DE CICLOS
1	95°C / 5'	40°C / 1'	72°C / 1'	1
2	95°C / 1'	40°C / 1'	72°C / 1'	29
3	72°C / 4'			1

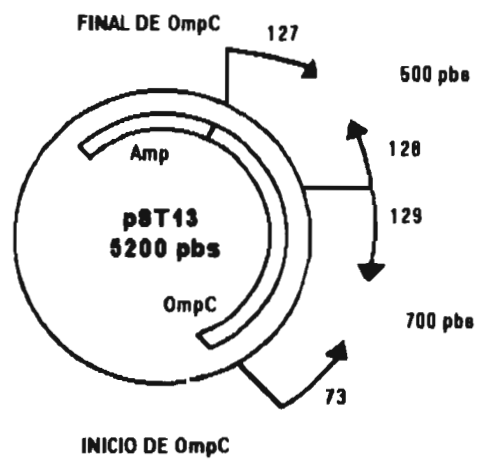


Figura 5 : Localización de los oligonucleótidos en el plásmido pST13. La figura muestra la posición de los oligonucleótidos que participaron en la amplificación de los dos subproductos que finalmente dieron lugar al producto de fusión.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

B) En un tubo Eppendorf para PCR se realizó una segunda PCR poniendo lo siguiente : 1 µg de los productos de la PCR anterior (subproductos A y B) , 3 µl de dNTP's 10mM diluidos 1:10, 3 µl de amortiguador 10X, 2 µl de cloruro de magnesio 25mM, 3 µl de cebadores correspondientes al principio y fin del gen de la OmpC (cebadores 73 y 127), 10 µl de agua estéril, 2 µl de DMSO, 2 µl de de la enzima Taq-polimerasa de 1IU/ µl, 15 µl de aceite mineral grado Biología Molecular. (Boehringer Mannheim). Se programó el termociclador Robocycler, Stratagene) con las siguientes condiciones:

NUMERO DE VENTANA	DESNATURALIZACION T°C / MINUTOS	ALINEAMIENTO T°C / MINUTOS	EXTENSION T°C / MINUTOS	NUMERO DE CICLOS
1	92°C / 3'	45°C / 2'	72°C / 2'	1
2	92°C / 1'	45°C / 1' 10''	72°C / 1'	20
3	92°C / 4'	45°C / 1'	72°C / 1'	1

Finalmente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia del producto de fusión. (Figura 6)

6.3.2 Ingeniería genética.

La manipulación del DNA se realizó de acuerdo a los métodos y procedimientos recomendados por Sambrook, Fritch , Maniatis, ⁹⁵ Dieffenbach y Dveksler. ²³

La concentración de DNA utilizado para la construcción del pST13 OmpC - NANP's fue estimada semicuantitativamente mediante la comparación de un estándar de pesos moleculares, los cuales son sometidos a electroforesis en gel de agarosa, al mismo tiempo que la muestra problema. ⁹⁵

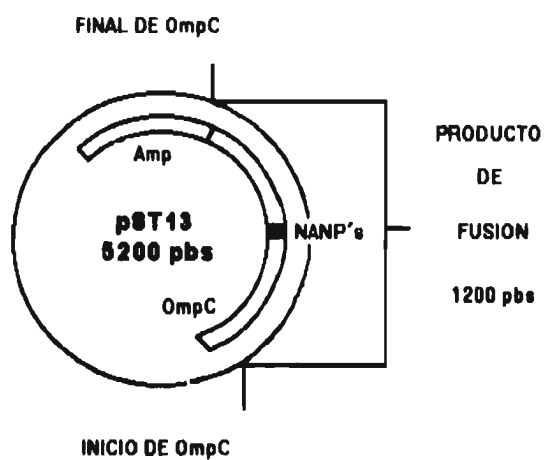


Figura 6 : Producto de Fusión en el plásmido pST13 como resultado de la PCR de los subproductos se obtuvo como producto final la fusión segmento de 1200 pbs.

A. Digestiones

La longitud del DNA fue estimada mediante la comparación de dos estándares de 1Kb DNA Ladder (GIBCO, BRL) y algunas electroforesis con 600 pb DNA Ladder (GIBCO, BRL). Aproximadamente 25 μ g de DNA fueron depositados en tubos Eppendorf. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 30 μ l, durante dos horas a 37°C, adicionando 1 μ l de enzima de restricción (Boehringer Mannheim), 3 μ l de amortiguador 10X y agua estéril inyectable.

B. Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis se realizaron en agarosa (Ultra pure, GIBCO, BRL) al 1%, en una cámara horizontal (Horizon 58, BRL), con 10 μ l de DNA a 60 V (12 V/cm³) , durante 45 min utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 1X. La agarosa contenía 1 μ g de bromuro de etidio, al terminar el corrimiento el gel se observó sobre un analizador de imágenes de luz ultravioleta para ser fotografiado (Digital Imaging System, IS-1000).

C. Purificación de Proteína de Fusión

El fragmento obtenido mediante PCR fue cortado del gel de agarosa y depositado en tubos Eppendorf para su purificación mediante la técnica de *Gene Clean*¹²¹. Se agregaron 800 μ l de yoduro de sodio 6 M, incubándose a 56 °C hasta la disolución de la agarosa, se le agregó 10 μ l de perlas de vidrio, se incubó en hielo durante media hora agitando el tubo frecuentemente, enseguida se centrifugó un minuto a 6,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, las perlas de vidrio se lavaron tres veces con una solución amortiguadora (NaCl 50 mM y etanol al 50%), después se resuspendieron en 15 μ l de agua inyectable estéril, se dejaron 20 minutos a 56 °C, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se trasladó a un tubo limpio. Se repitió el paso

nterior teniendo un volumen final de 30 μ l de DNA purificado. Por último se realizó una electroforesis en gel de agarosa, para verificar la presencia y concentración de DNA.

D. Desfosforilación

El fragmento purificado mediante la técnica de *Gene Clean* se trató con CIP (*Calf Intestine Phosphatase*, GIBCO) enzima que cataliza la hidrólisis de residuos 5' fosfato de DNA. (Figura 7). Los productos desfosforilados poseen terminaciones 5' hidroxilo cuya función es evitar la autoligación del plásmido asegurando la ligación del vector con el inserto. En tubos Eppendorf se depositó 1 μ g de DNA ya purificado. Se llevó a un volumen final de 30 μ l incubando durante 30 minutos a 37 °C adicionando 3 μ l de amortiguador, 3 μ l de la enzima CIP y 12 μ l de agua estéril. Para desactivar la enzima la mezcla se calentó a 75°C durante 10 minutos.

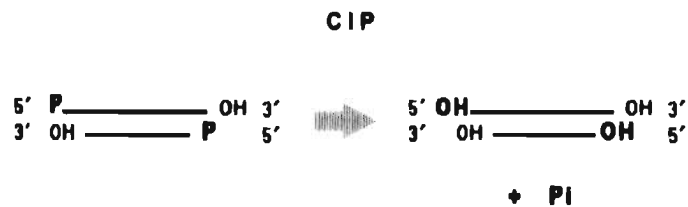


Figura 7 : Desfosforilación de DNA. La figura muestra la acción de la enzima CIP en residuos fosfato del DNA teniendo como resultado hidroxilos en los extremos 5'.

E. Ligación

En un tubo Eppendorf se mezclaron 50 ng del vector pST13 (digerido con la enzima de restricción Kpn I, purificado por *Gene Clean* y desfosforilado mediante CIP) 100 ng del producto de fusión (inserto) digerida con la enzima de restricción Kpn I y purificada por la técnica de *Gene Clean*, se agregaron 2.5 µl de amortiguador, 2 µl de la enzima T₄ ligasa (GIBCO, BRL) y 11.5 µl de agua estéril incubándose toda la noche a 15°C.

F. Transformación

Se cultivó *Escherichia coli* **UH302** en 50 ml de medio BHI hasta fase logarítmica. Se cosechó la bacteria por centrifugación a 6,000 rpm durante 10 min lavándose dos veces con una mezcla fría de cloruro de calcio 100 mM, glucosa 50 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 7.5). La pastilla bacteriana resultante fue resuspendida en 1 ml de la mezcla anterior e incubada toda la noche a 4°C. Posteriormente 200 µl de la suspensión bacteriana se depositaron en un tubo Eppendorf y se les adicionó 15µl de la mezcla de ligación dejándose 30 minutos en hielo. Se incubó la mezcla a 42°C durante 1 minuto y se dejó 5 min en hielo, se le agregó 800 µl de medio SOC (250 mM de KCl, 100 mM de MgCl₂, triptona 2 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 20mM para un litro), se agitó y se incubó durante 45 min a 37°C. Por último, 100 µl del cultivo anterior se sembró en una placa de medio BHI que contenía 75µg / ml de ampicilina y se incubó a 37°C durante 24 hrs.

6.4. Identificación de las colonias transformadas

6.4.1 Colony Blot

Las colonias transformantes se seleccionaron por su crecimiento en BHI con ampicilina. Dichas colonias fueron sembradas en placas de BHI (con ampicilina) y se levantaron por medio de una membrana de nylon (Hybond-N⁺ nucleic acid-transfer).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La membrana de las bacterias se desnaturalizaron sumergiendo la membrana de nylon en una mezcla de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M durante 2 min, posteriormente se neutralizó en NaCl 1.5 M y Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 por 5 min y por último se lavaron con Tris-HCl 0.2 M y SSC 2X. Se dejó secar la membrana y posteriormente se llevó a cabo el entrecruzamiento durante 1 min (UV-Stratalinker 1800, Stratagene).

Se preparó una sonda para la hibridación de acuerdo al método de iniciador al azar ("Random Primer") de la siguiente manera: Aproximadamente 100 µg de DNA correspondientes al producto de fusión, se desnaturalizaron por ebullición durante 10 min y se transfirieron en hielo durante 5 min, posteriormente se le añadió 6 µl de dNTP's 5X (sin citocinas), 7 µl de α -CTP (citocina marcada con ³² P), 6 µl de amortiguador para la polimerasa Klenow (fragmento largo de la DNA polimerasa I) y 1 µl de dicha enzima. Se incubó 1 hr a temperatura ambiente y finalmente se añadieron 2.5 ml del reactivo A (NENSORB® 20) para detener la reacción. Después de lo anterior la sonda marcada se purificó mediante una columna de Sephadex G-50 (Sigma). La membrana se puso en solución de hibridación (SSC 6X, DENHARDT 10% (Ficoll 10 g, Pup 10 g, BSA (fracciónV) 10 g en un litro de agua estéril) y SDS 0.1%) se añadió la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada) incubando toda la noche a 68°C (Hibridizer 700, Stratagene), posteriormente se lavó la membrana tres veces durante 15 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1%, SSC 0.5X), y se dejó exponer ante una película (Kodak), durante 2 horas.

6.4.2 Obtención de DNA plasmídico

Se seleccionaron las colonias positivas del *Colony Blot* la cuales se crecieron por separado en 30 ml de BHI con ampicilina, se cosecharon y lavaron 2 veces con SSI. Posteriormente, se realizó una minipreparación para extracción de DNA plasmídico donde a la pastilla bacteriana previamente lavada con SSI se le adicionó 300 µl de TELT (Tritón X100, EDTA 62.5mM y LiCl 2.5M) y lisozima, la mezcla de agitó

6. MATERIALES Y MÉTODOS

vigorosamente y se sometió a ebullición durante 1 min, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 100 μ l de isopropanol frío, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm (Mikroliter Heltich) durante 10 min a 4°C, la pastilla resultante correspondiente al DNA plasmídico se lavó una vez con etanol al 70% , se dejó secar y se resuspendió en 25 μ l de agua inyectable estéril. Por último se verificó la construcción por medio de enzimas de restricción.

6.5. Verificación de la presencia del gen de la construcción OmpC - NANP's

6.5.1 Southern Blot

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Ultra pure, GIBCO, BRL) al 1%, en una cámara horizontal (Horizon 58, BRL) a 60 V (12 V/cm²), de 25 μ g de DNA de clonas digeridas con enzimas de restricción y su respectivo control (vector pST13 digerido con la enzima correspondiente), durante 45 min utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 1X. La agarosa contenía 1 μ g de bromuro de etidio, al terminar el corrimiento el gel se observó sobre un analizador de imágenes de luz ultravioleta para verificar la presencia del DNA digerido (Digital Imaging System, IS-1000).

El DNA se transfirió a un papel de nitrocelulosa 0.45 Micron Hybond-C de Amersham por difusión capilar y se fijó mediante la utilización de luz UV. La preparación de la sonda fue igual al Colony Blot. La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSC 6X, DENHARDT 10% (Ficoll 10 g, Pup 10 g, BSA (fracciónV) 10 g en un litro de agua estéril) y SDS 0.1%) y la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada) incubando toda la noche a 68°C (Hibridizer 700, Stratagene), posteriormente se lavó la membrana tres veces durante 15 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1%, SSC 0.5X), y se dejó exponer ante una película (Kodak), durante 2 horas.

6.5.2 Extracción de RNA y detección de RNAm por Northern Blot

Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de medio BHI dejándose crecer toda la noche, se centrifugó y la pastilla bacteriana se lavó con solución salina, se resuspendió en SSI y se ajustó espectrofotométricamente a 1×10^9 bacterias en 100 ml 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 y se centrifugó a $12,000 \times g$ por 15 min, se separó la fase acuosa y 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 se centrifugó a $12,000 \times g$ 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.

Se corrió un gel de agarosa al 1% (1 gr de agarosa, buffer de corrimiento 1X, formaldehído 2.2 M) de 50 μg de RNA total, a 60 V. Se transfirió la muestra por difusión capilar a una membrana de nylon (Hybond-N^o nucleic acid-transfer), por difusión capilar y se fijó mediante la utilización de luz UV. La preparación de la sonda fue igual al Colony Blot. La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSC 6X, DENHARDT 10% (Ficolil 10 g, Pup 10 g, BSA (fracciónV) 10 g en un litro de agua estéril) y SDS 0.1%) y la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada) incubando toda la noche a 68°C (Hibridizer 700, Stratagene), posteriormente se lavó la membrana tres veces durante 15 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1%, SSC 0.5X), y se dejó exponer ante una película (Kodak), durante 2 horas.

6.6 Búsqueda del marco de lectura en clonas positivas.

La selección de las clonas con marco de lectura se llevó a cabo mediante la digestión de las clonas con la enzima de restricción Pvu II.

6.7 Verificación de la expresión del la proteína de fusión OmpC-NANP's

6.7.1 Obtención y purificación de proteínas de membrana externa

Se realizó por medio de la técnica propuesta por Schnaitman.⁹⁶ Se cultivaron bacterias en BHI, y se ajustaron a una densidad óptica entre 1.0 y 1.5 a 540 nm se cosecharon por centrifugación lavando 3 veces con SSI. Las bacterias se rompieron por sonicación a 180 watts (Sonicator Ultrasonic proccesor XL misonix). por periodos de 2 min en baño de hielo. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, ésta se centrifugó a 6,000 rpm durante 15 min (Sorvall RT 6000 D), el sobrenadante se sedimentó por ultracentrifugación a 45,000 rpm durante 45 min a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80), éste se solubilizó con 1 ml de MgSO₄ agregando 20 µl de DNasa y 20 µl de RNasa incubando durante 45 minutos a 37 °C. Se ultracentrifugó a 45,000 rpm durante 45 min a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80). La pastilla se resuspendió en HEPES 10 mM pH 7.7. Se ultracentrifugó nuevamente a 45,000 rpm durante 45 min a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80). La pastilla se solubilizó en en Tritón X-100 al 2% en HEPES 0.01M pH 7.4 centrifugando a 45,000 rpm durante 45 min a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80). La pastilla se resuspendió en Tris-EDTA-Tritón (0.05M-5mM-2% respectivamente) pH 7.2 se incubó durante 10 minutos a 37°C y posteriormente se ultracentrifugó a 55,000 rpm 45 min a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80). El sobrenadante se precipitó con acetona en una relación 3:1, se dejó toda la noche a -70 (REVCO Ins). Al cabo de este periodo se centrifugó a 6,000 rpm durante 30 min (Sorvall Ins), el precipitado se resuspendió finalmente en HEPES 0.01M pH 7.7.

6.7.2 Cuantificación de proteína

Se llevó a cabo por medio de la técnica descrita por Lowry⁸² Se realizó una curva estándar con albúmina sérica bovina como proteína de referencia donde se leyó la concentración de proteínas de membrana externa presentes en alicuotas de 100 µl

y 300 μ l obteniéndose posteriormente el valor medio de la concentración de las proteínas de las diferentes cepas utilizadas.

6.7.3 Electroforesis de proteínas de membrana externa en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) ¹¹⁰

La SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa de cada una de las cepas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo al método de Laemmli ⁵² poniendo 30 μ g / ml de proteína en cada carril.

El gel superior estuvo constituido por 2.5 % de acrilamida, 0.13 % de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8. El gel separador presentó 12 % de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida, 0.66 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8. Las muestras (proteína de membrana externa purificada) se resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris 0.5 M pH=6.8, que contenía SDS al 2 %, β -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.1%) y se hirvieron por 5 min. El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante aproximadamente 5 hrs. empleando 5 volts por cm, y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.195 M, SDS al 0.1%, pH=8.3. Posteriormente se llevaron a cabo dos tipos de tinciones:

A. Tinción con azul de Coomassie

El gel se tiñó durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45) y se destiñó empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel se observó transparente. Posteriormente el gel se secó y se sacó foto.

B. Tinción de plata

Se trató el gel con una solución prefijadora (metanol 50 %, ácido acético 10%, agua bidestilada 40 %) durante 30 minutos. Posteriormente se dejó durante 16 horas en solución fijadora (glutaraldehído 10%). Se lavó el gel 3 veces con agua bidestilada en intervalos de 15 minutos. Se agregó solución para teñir (30 % de NH_4OH , NaOH 0.36% y 19.4 % de nitrato de plata) durante 15 minutos. El gel se reveló con una solución de citrato de sodio al 0.5 % y 0.5 ml de una solución de formaldehído al 37 %. Para detener la reacción el gel se trató con una mezcla de agua bidestilada y solución fijadora (V / V). Finalmente el gel se secó y se fotografió.

6.7.4 Inmunoelctrotransferencia (*Western blot*)

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 Micron Hybond-C de Amersham, en una unidad de transferencia electrónica LKB 2005 TRANSPHOR por 3 hrs a 0.5 amperes alimentado por una fuente de poder LKB 2005 TRANSPHOR de acuerdo al método de Towbin.⁵²

Posterior a esto el papel de nitrocelulosa se bloqueó por 1 hr con leche al 5 % en PBS, y después se lavó tres veces con PBS y tres veces con PBS-TWEEN al 0.1 %. Se puso en contacto con un suero de conejo hiperinmune (el cual fue inmunizado con la porina OmpC), el suero se empleó en una dilución 1:1000 en PBS-Leche al 5% durante 1 hr a 37°C y se procedió a lavar en las mismas condiciones que se mencionaron arriba. Se adicionó el segundo anticuerpo revelador el cual consistió en un conjugado de cabra contra IgG de conejo y peroxidasa (Sigma) diluido 1:1000 durante 45 min. La reacción inmunológica se reveló con α 4-Cloro Naftol - H_2O_2 . El método se llevó a cabo a una temperatura de 37°C.

6.7.5 Ensayo de Citofluorimetría indirecta (FACS)

Se cultivaron bacterias en BHI y se ajustaron a una densidad óptica de 0.6 a 540 nm se cosecharon por centrifugación lavando 3 veces con PBS 1X. El total de bacterias fue de 1×10^9 por mililitro pudiéndose medir por medio de espectrofotómetro. Se repartió la bacteria en tubos Eppendorf estériles y se llevó a cabo una dilución 1:100 con PBS 1X para obtener 1×10^8 bacterias por mililitro. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm. Las pastillas se resuspendieron con su anticuerpo correspondiente (anticuerpo monoclonal de ratón contra OmpC o anticuerpo monoclonal de ratón NANP así como anticuerpo policlonal de conejo), incubándose durante 1 hora a 4°C. Los tubos se lavaron dos veces con PBS-suero 1% y las pastillas se resuspendieron con el segundo anticuerpo en donde se utilizó gamas de cabra anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) para los tubos que tenían anticuerpo monoclonal de ratón contra OmpC y para los tubos que contenían anticuerpo policlonal de conejo se le agregó anti IgG de conejo, conjugado a FITC. Se incubaron durante 2 horas a 4°C y se lavaron dos veces y se resuspendió la pastilla en 500 μ l de yoduro de propidio. La intensidad de fluorescencia se determinó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, C.A.).

7. RESULTADOS

7.1 CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN E INGENIERÍA GENÉTICA

El plásmido pST13 contiene el gen que codifica para la porina OmpC de *Salmonella typhi* así como el gen que codifica para la resistencia a ampicilina.

Al llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del plásmido pST13 utilizando los primers que incluan al epitopo (NANP)₃ así como las regiones que codificaban para la porina OmpC se obtuvieron dos subproductos es decir dos genes sintéticos A y B.

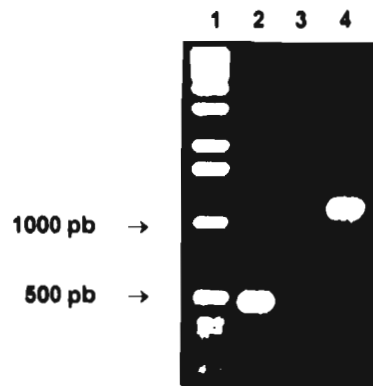
Los subproductos A y B se unieron mediante PCR por medio de la cual se obtuvo un producto de fusión. (Figura 8)

PRODUCTO	BANDA EN PARES DE BASES (pb)
A	500 pb
B	700 pb
FUSION	1200 pb

Se verificó a la proteína de fusión (Figura 9) llevando a cabo un mapeo con enzimas de restricción.

PRODUCTO DE FUSION	NUMERO DE BANDAS	TAMAÑO DE LAS BANDAS EN PARES DE BASES (pb)
Sin digerir	1	1200 pb
Digerido con Kpn I	3	750 pb; 350 pb; 100 pb
Digerido con Pst I	2	950 pb; 250 pb
Digerido con Pvu I	1	1200 pb
Digerido con Pvu II	2	970 pb; 230 pb

(Figura 10)



Carril 1	Indicador de 1Kb
Carril 2	Subproducto A de 500 pb
Carril 3	Subproducto B de 700 pb
Carril 4	Producto de fusión de 1200 pb

Figura 8 : Electroforesis en gel de agarosa de los subproductos A,B y producto de fusión.

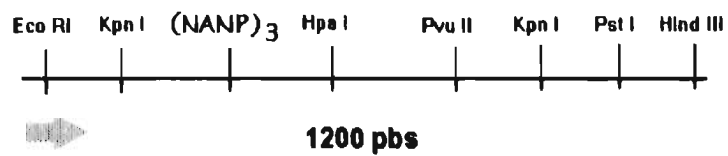
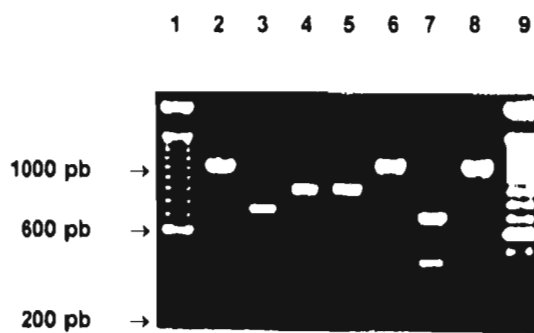
PRODUCTO DE FUSION

Figura 9 : Mapa del producto de fusión. La figura muestra los sitios de restricción que presenta la fusión donde se puede observar la eliminación del sitio Pvu I el cual se sustituyó por el epitopo (NANP)₃



Carril 1	Indicador de 600 pbs
Carril 2	Fusión sin digerir
Carril 3	Fusión digerida con enzima Kpn I
Carril 4	Fusión digerida con enzima Pst I
Carril 5	Fusión digerida con enzima Pvu II
Carril 6	Fusión digerida con enzima Pvu I
Carril 7	Porina OmpC digerida con Pvu I
Carril 8	Porina OmpC sin digerir
Carril 9	Indicador de 600 pbs

Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa del mapa del producto de fusión.

Posteriormente se hizo la preparación del inserto (producto de fusión) y el vector (pST 13) ambos digiriéndolos con la enzima Kpn I. (Figura 11)

DIGESTIÓN CON ENZIMA Kpn I DE:	BANDAS	TAMAÑO DE LAS BANDAS EN PARES DE BASES (pb)
Vector (pST 13)	2	4450 pb , 750 pb
Inserto (producto de fusión)	3	750 pb; 350 pb; 100 pb

(Figura 12)

Por medio de la técnica de *Gene Clean*⁵⁶ se separaron y purificaron las siguientes bandas:

GENE CLEAN DE:	BANDA SEPARADA
Vector	4450 pb
Inserto	750 pb

(Figura 13)

El vector se desfosforiló para evitar que se cerrara por tener los mismos extremos ya que al no desfosforilar se puede impedir la entrada del inserto.

Se llevó a cabo la ligación del inserto y vector dando lugar a un nuevo plásmido pST13 OmpC - NANP's.

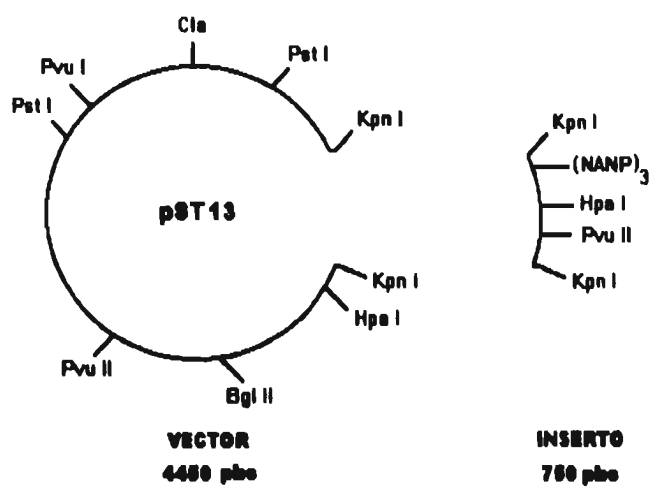
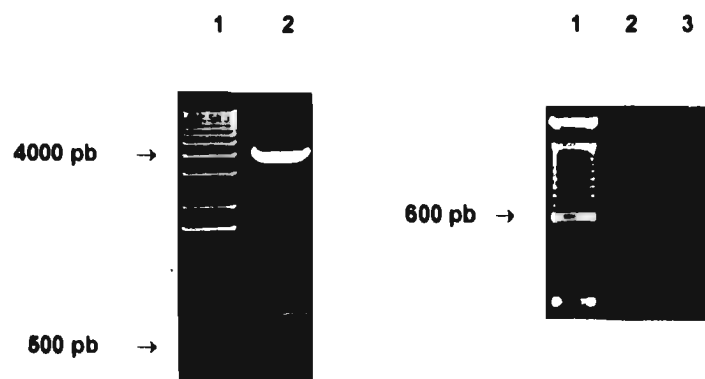
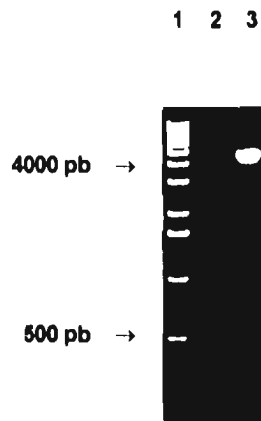


Figura 11 : Vector e inserto digeridos con la enzima Kpn I.



VECTOR		INSERTO	
Carril 1	Indicador de 1 Kb	Carril 1	Indicador de 1 Kb
Carril 2	pST13 digerido con Kpn I	Carril 2	Producto de fusión sin digerir
		Carril 3	Producto de fusión digerido con enzima Kpn I

Figura 12 : Electroforesis en gel de agarosa del vector e inserto



Carril 1	Indicador de 1 Kb
Carril 2	Inserto de 750 pb
Carril 3	Vector de 4450 pb

Figura 13 : Electroforesis en gel de agarosa de purificación mediante la técnica de *Gene Clean* de vector e inserto.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POSITIVAS

Posteriormente se transformó en *E. coli* **UH302** que como ya se mencionó presenta una mutación que le da a la bacteria como principal característica ser deficiente en porina OmpC.

Se obtuvieron 70 colonias transformadas y por medio de *Colony Blot* se seleccionaron 4 colonias positivas es decir aquellas que presentaron la construcción OmpC-NANP's. (Figura 14)

Se obtuvo DNA plasmídico de las clonas (colonias que dieron positivo al *Colony Blot*) por medio de TELT de donde se llevó a cabo un mapeo por medio de enzimas de restricción obteniéndose lo siguiente:

DIGESTIÓN DE:	ENZIMA	BANDAS	TAMAÑO DE LAS BANDAS EN PARES DE BASES (pb)
pST 13	Kpn I	2	4450 pb; 750 pb
pST 13	Pvu I	2	3900 pb; 1300 pb
pST 13	Pvu II	2	3500 pb; 1700 pb
Clona	Kpn I	2	4450 pb; 750 pb
Clona	Pvu I	1	5200 pb
Clona	Pvu II	2	3500 pb; 1700 pb

(Figura 16)

En la Figura 9 y 15 se puede observar que el sitio de restricción Pvu I fue eliminado. Se utilizó como control positivo el plásmido pST 13 digerido con las enzimas de restricción empleadas en las clonas.

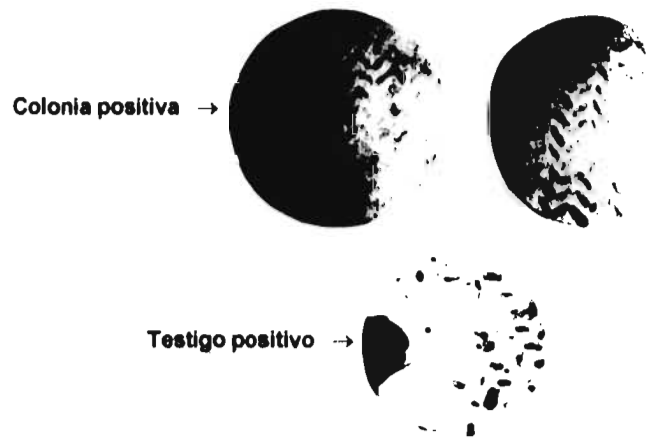


Figura 14 : Colony Blot . En esta figura se puede observar el testigo positivo así como las colonias que fueron positivas. Se utilizó como sonda al producto de fusión marcado con

³² P.

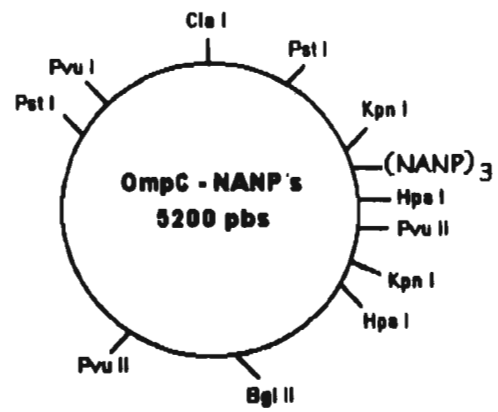
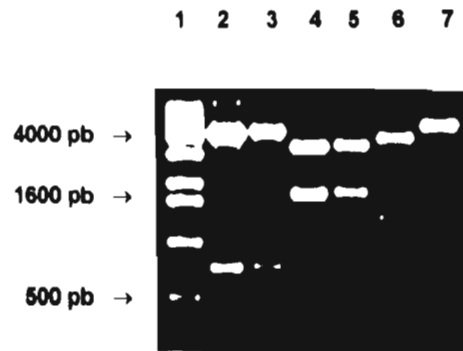


Figura 16 : Mapa del plásmido pST13 OmpC - NANP's. La figura muestra los sitios de restricción así como la localización del epitopo (NANP)₃

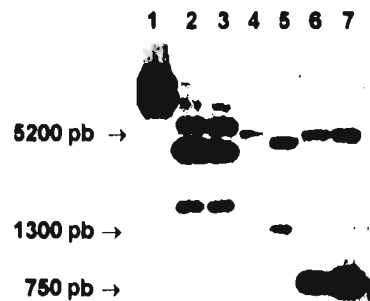


Carril 1	Indicador de 1 Kb
Carril 2	pST13 digendo con enzima Kpn I
Carril 3	Clona D2 digenda con enzima Kpn I
Carril 4	pST13 digendo con enzima Pvu II
Carril 5	Clona D2 digenda con enzima Pvu II
Carril 6	pST13 digendo con enzima Pvu I
Carril 7	Clona D2 digenda con enzima Pvu I

Figura 16 : Electroforesis en gel de agarosa del mapa de la construcción OmpC-NANP's

7.3 PRESENCIA Y FUNCIONALIDAD DEL GEN DE LA CONSTRUCCIÓN OmpC-NANP's

Se llevó a cabo un *Southern Blot* para verificar la presencia del gen de la construcción utilizando como sonda el producto de fusión marcado con 32 P; donde se pudo observar la presencia del gen en las clonas así como el control utilizado pST13 este último da lugar a marca porque presenta el gen que codifica para la porina OmpC. (Figura 17). Para ver si el gen lleva a cabo la transcripción de RNA se llevó a cabo un *Northern Blot* de donde se extrajo RNAm. Se pudo ver que el gen se expresa en las clonas por la marca negra que se observó en la placa. (Figura 18)



Carril 1	Clona D2 sin digerir
Carril 2	Clona D2 digerida con enzima Pvu II
Carril 3	pST13 digerido con enzima Pvu II
Carril 4	Clona D2 digerida con enzima Pvu I
Carril 5	pST13 digerido con enzima Pvu I
Carril 6	Clona D2 digerida con enzima Kpn I
Carril 7	pST13 digerido con enzima Kpn I

Figura 17 : Placa de *Southern Blot* donde se aprecia la presencia del gen OmpC-NANP's. Se utilizó como sonda la fusión marcada con 32 P.



Carril 1	Clona D1
Carril 2	<i>Escherichia coli</i> UH302
Carril 3	<i>Escherichia coli</i> UH302 - pST13

Figura 18 : Placa de Northern Blot donde se ve la presencia de funcionalidad por parte de la construcción OmpC - NANP's. El método es parecido al *Colony Blot* donde únicamente nos interesó observar la presencia de RNAm. en la placa. Se utilizó como sonda la fusión marcada con ^{32}P .

7.4 MARCO DE LECTURA EN LAS CLONAS POSITIVAS

Se determinó al digerir las clonas con la enzima de restricción Pvu II. El marco de lectura es de interés debido a que si las clonas no lo presentan (**Figura 19**) la proteína de OmpC - NANP's no se expresaría en la superficie de la bacteria. Como se observa en la **Figura 20** el marco de lectura involucra la posición en la que el inserto fue ligado.

DIGESTIÓN DE:	ENZIMA	BANDAS	TAMAÑO DE LAS BANDAS EN PARES DE BASES (pb)
pST 13	Pvu II	2	3500 pb; 1700 pb
Clona con marco de lectura	Pvu II	2	3500 pb; 1700 pb
Clona sin marco de lectura	Pvu II	2	3100 pb; 2100 pb

(Figura 21)

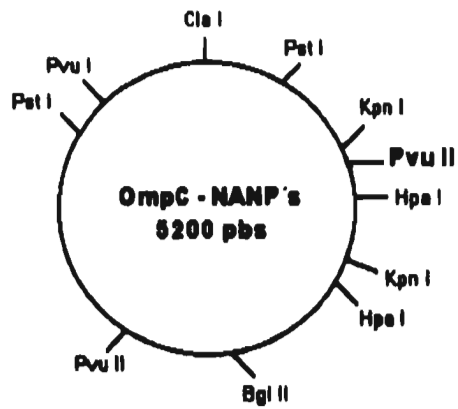


Figura 19 : Clona sin marco de lectura donde se puede apreciar la posición del sitio de restricción Pvu II.

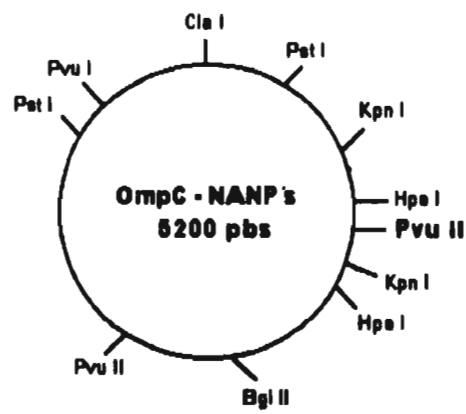
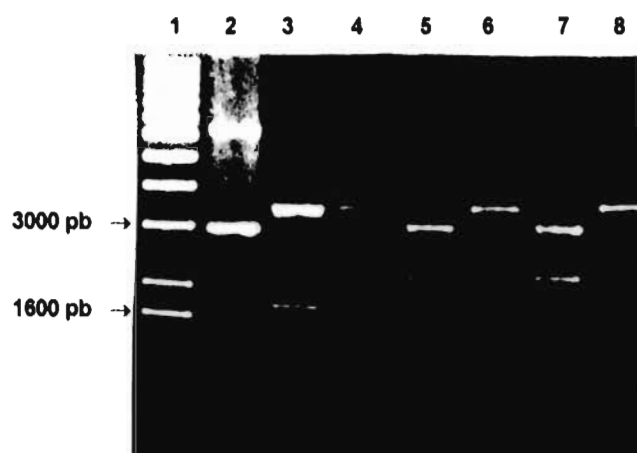


Figura 20 : Clona con marco de lectura donde se puede apreciar la posición del sitio de restricción Pvu II.



Carril 1	Indicador de 1 Kb
Carril 2	Clona D2 sin digerir
Carril 3	pST13 digerido con enzima Pvu II
Carril 4	Clona D2 digerida con enzima Pvu II
Carril 5	Clona A1 digerida con enzima Pvu II
Carril 6	Clona F1 digerida con enzima Pvu II
Carril 7	Clona A2 digerida con enzima Pvu II
Carril 8	Clona F2 digerida con enzima Pvu II

Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa de clonas con marco de lectura y sin marco de lectura.

7.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EN LA SUPERFICIE *Escherichia coli*

Después de obtener las proteínas de membrana externa se cuantificaron mediante la técnica descrita por Lowry. Se realizó una curva estándar (Tabla 2) con ABS donde se leyó la concentración de proteína que se encontraba presente en alícuotas de 100 μ l y 300 μ l obteniendo posteriormente el valor medio de la concentración de la clona así como de los controles correspondientes.

PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE:	CONCENTRACIÓN OBTENIDA EN μ g / ml	μ l NECESARIOS PARA UNA CONCENTRACIÓN DE 30 μ g / ml
UH 302	515.13	58.23
UH 302 pST 13	1247.66	24.04
<i>Salmonella typhi</i>	903.33	33.21
Clona D1	512.86	58.49
Clona F1	673.6	44.53

Las muestras se corrieron en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida y posteriormente se transfirió y se tñió con azul de Coomassie (Figura 22) donde no se pudo ver la presencia de la porina OmpC. La presencia de la porina se pudo observar al teñir el gel con plata (Figura 23).

Se llevó a cabo un *Western Blot* (Figura 24) en donde se pudo verificar la expresión de la porina OmpC.

Se realizó un FACS (Tabla 3) para ver la presencia de la proteína OmpC - NANP's de la clona D1 en la superficie de la *Escherichia coli* UH302. En donde se observó la expresión tanto de la porina OmpC en la superficie de la bacteria así como del epitopo (NANP)₃.

ABS

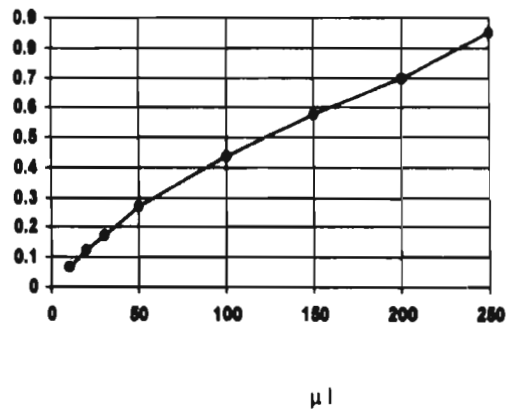
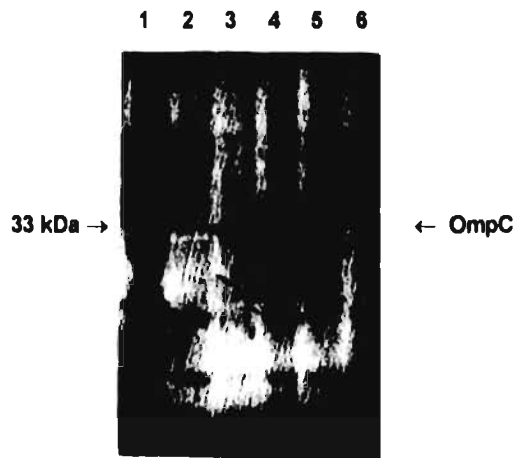
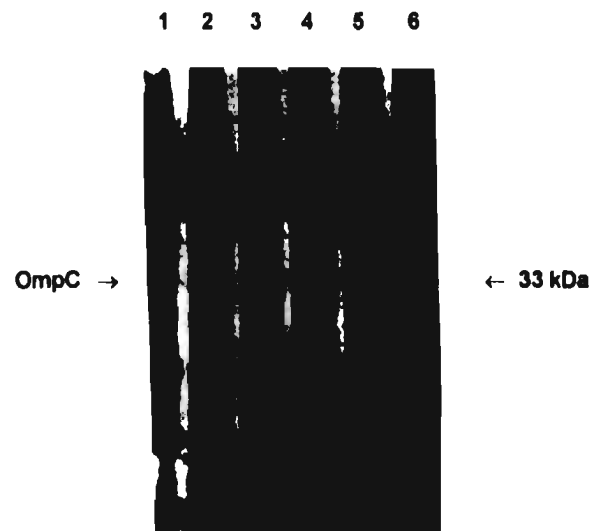


Tabla 2 : Curva estándar empleada en la cuantificación de proteína de membrana externa por el método de Lowry.



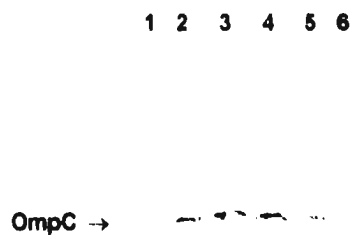
Carril 1	Pesos moleculares
Carril 2	Proteínas de membrana externa de <i>Escherichia coli</i> UH302
Carril 3	Proteínas de membrana externa de <i>Escherichia coli</i> UH302 pST13
Carril 4	Proteínas de membrana externa de <i>Salmonella typhi</i>
Carril 5	Proteínas de membrana externa de Clona D1
Carril 6	Proteínas de membrana externa de Clona F1

Figura 22 : Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie figura donde no se observa la presencia de la porina OmpC



Carril 1	Proteínas de membrana externa de Clon F1
Carril 2	Proteínas de membrana externa de Clon D1
Carril 3	Proteínas de membrana externa de <i>Salmonella typhi</i>
Carril 4	Proteínas de membrana externa de <i>Escherichia coli</i> UH302 pST13
Carril 5	Proteínas de membrana externa de <i>Escherichia coli</i> UH302
Carril 6	Pesos moleculares

Figura 23 : Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata figura donde se observa la presencia de la porina OmpC en una de las clonas.



Carril 1	<i>E. coli</i> UH302
Carril 2	Porina OmpC
Carril 3	Clona D1
Carril 4	Clona D2
Carril 5	Clona F1
Carril 6	Clona A2

Figura 24 : *Western Blot* de OmpC

CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-PORINA

BACTERIAS	MEDIA DEL CANAL DE FLUORESCENCIA (MCF)
UH302	68.81
UH302 pST13	60.32
Ty2	128.67
CLONA D1	162.64

CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-NANP's

BACTERIAS	MEDIA DEL CANAL DE FLUORESCENCIA (MCF)
UH302	53.92
UH302 pST13	50.26
CLONA D1	101.53

Tabla 3 : Expresión de proteína OmpC - NANP's en la superficie de *E.coli* UH302 transformada.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

Actualmente es posible modificar diversas proteínas de enterobacterias utilizando métodos de ingeniería genética, con el propósito de expresar péptidos (a los que se les conoce como "pasajeros") en la superficie bacteriana. Para ello, se han utilizado como "vectores" a las proteínas de membrana externa (como LamB, PhoE, OmpA, TraT), la flagelina y fimbrias³⁶

Las proteínas de membrana externa (Omp) contienen sitios "permisivos" donde es posible insertar secuencias que codifican para péptidos que no perturban la estructura terciaria de la proteína.¹²

La proteína periplásmica MalE de *Escherichia coli*, por ejemplo, puede aceptar péptidos de hasta 70 aminoácidos⁸⁷. Este método ha sido utilizado en estudios topográficos de las proteínas⁹² para identificar y purificar péptidos con actividades biológicas^{18, 105} o para obtener anticuerpos monoclonales contra epitopos bien definidos⁸⁸. La localización de la proteína "vector" determina el tipo de respuesta inmunológica.

Cuando los epitopos se expresan en LamB, que se exporta a la membrana, de *E. coli* se obtiene respuesta de anticuerpos tmo independiente, en cambio cuando se expresan en MalE, que se queda en el espacio periplásmico, la respuesta de anticuerpos es dependiente de linfocitos T⁵⁶.

Utilizando LamB o MalE se ha logrado inducir anticuerpos neutralizantes contra poliovirus⁵⁷ o contra HIV¹⁶ de *E. coli*.

Las Omp son excelentes candidatos para incluir epitopos en ellas. Se ha logrado la expresión de epitopos en la superficie de la porina PhoE de *Escherichia coli*¹⁰⁸, OmpC de *Salmonella typhi*⁸⁶ y OprF de *Pseudomonas aeruginosa*¹²².

La inmunogenicidad intrínseca de las Omp de *Salmonella typhi* ha sido evaluada extensivamente y se considera que son buenos candidatos para formar parte de una

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

vacuna contra la fiebre tifoidea. Se ha reportado que las Omp, o bien las porinas purificadas de *S. typhimurium*, son capaces de inducir protección en ratones^{112, 113}.

El LPS induce protección mediante el desarrollo de una respuesta de anticuerpos y aumentando la respuesta celular dirigida contra las porinas⁷⁰.

La inoculación de porinas de *S. typhimurium*, en el cojinete plantar de ratones inmunizados con dosis subletales, es capaz de generar una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)¹¹¹. Por otro lado en humanos el LPS y las porinas inducen la producción de TNF- α , IL-1 α , IL-4, IL-6 e INF- γ de manera dosis dependiente²⁹. Los enfermos de fiebre tifoidea tienen anticuerpos de clase IgM contra las Omp de *Salmonella typhi*, durante la fase aguda de la enfermedad en tanto que durante la convalecencia presentan IgG's que reconocen principalmente a OmpC y OpmF^{8, 107}.

Las Omp⁴⁵, porinas purificadas⁴⁶, así como la porina OmpC recombinante de *S. typhi*⁴⁷ son capaces de generar protección en ratones al reto, en un modelo de infección intraperitoneal utilizando mucina. El LPS contaminante en las preparaciones de PME's, o de porinas, parece no tener un papel relevante porque a dosis iguales o mayores a las presentes en estas preparaciones no genera protección. En un modelo libre de LPS, la inmunización con un plásmido que contiene el gen que codifica para la porina OmpC, se induce respuesta de anticuerpos contra esta porina⁶⁰. En los mecanismos de protección que inducen las Omp se encuentra involucradas las ramas efectoras humoral y celular de la inmunidad³⁰. Como las porinas se encuentran en la superficie bacteriana, son accesibles a los anticuerpos⁶⁰. En el mismo modelo murino, es posible transferir pasivamente protección, específica al reto con *S. typhi* y cruzada al reto con *S. typhimurium*, utilizando un suero hiperinmune de conejo contra Omp²⁸. Aunque menos eficientemente, también los anticuerpos monoclonales contra porinas protegen al reto con *S. typhi*⁴⁴, efecto que no se observa administrando anticuerpos monoclonales contra LPS⁷⁸. Por otro lado, se ha demostrado que las porinas son capaces de inducir respuestas específicas de linfocitos T, tanto en ratones³², como en humanos⁸. La respuesta proliferativa de linfocitos T está controlada genéticamente en el ratón³³ y promueve la

activación de macrófagos⁷. En ensayos preliminares se ha demostrado que la inmunización con Omp induce linfocitos T citotóxicos específicos contra la porina OmpC⁵⁹

En el humano, la inmunización con la vacuna parenteral de células muertas induce menores títulos de anticuerpos contra porinas y respuesta linfoproliferativa más pobre que la vacuna atenuada oral. Algunas regiones inmunodominantes de la porina OmpC han sido localizadas⁸¹. La inmunización con péptidos sintéticos induce respuesta de anticuerpos capaces de reconocer a la porina en la bacteria intacta, estas regiones no son compartidas por porinas de otras enterobacterias por lo que probablemente correspondan a epitopos específicos de *Salmonella typhi*.

Considerando que existe amplia experiencia en la expresión de epitopos en la superficie de enterobacterias y que las porinas de *Salmonella typhi* son buenos inmunógenos. En este trabajo se eligió a la porina OmpC como vector del epitopo inmunodominante de células B de *Plasmodium falciparum* (NANP)₃. Aunque no se conoce la estructura cristalográfica de la porina, fue posible predecir cuáles son las regiones que se encuentran expuestas al medio, utilizando como modelo la estructura de OmpF de *Escherichia coli*. Se diseñaron un par de oligonucleótidos que codifican para tres repeticiones del tetrapéptido NANP (Figura 5) y mediante PCR se substituyó el asa cinco de la porina OmpC (Figura 4). Este gen quimérico se reinsertó en el plásmido pST13 (Figura 6) y se evaluó la producción de la proteína recombinante (Figura 24 y Tabla 3). Los métodos reportados anteriormente para la construcción de proteínas de fusión involucran la inserción de secuencias nuevas en sitios permisibles de las proteínas de membrana.

En el diseño de los oligonucleótidos que codifican para las tres repeticiones del tetrapéptido NANP se utilizaron diferentes codones, con el propósito de evitar que los oligonucleótidos formaran dímeros traslapados. Esto sin embargo, puede causar que la eficiencia de la transcripción disminuya, (Figura 22) pues algunos codones son poco utilizados por *Escherichia coli*. No obstante, se comprobó mediante citofluorometría indirecta que la proteína de *Escherichia coli* UH302 transformada con el plásmido pST13-NANP, se traduce adecuadamente, se exporta a la membrana y que algunos epitopos, en

otras asas externas de la porina, están conservados (Tabla 3). Por tanto, se cuenta con una bacteria que expresa en su superficie un epitopo de *Plasmodium falciparum*.

La expresión de epitopos en la superficie bacteriana utilizando a las porinas para construir proteínas de fusión ofrece la ventaja de incrementar el número de copias del antígeno de interés, aún cuando el gen quimérico se encuentre integrado en el cromosoma bacteriano, debido a que las porinas constituyen más del 2% de la proteína total bacteriana y al ser más accesibles a los linfocitos B, inducen respuestas humorales más eficientes.

Por otro lado para evaluar la inmunogenicidad de la proteína quimérica se deberá administrar a animales la bacteria acarreadora y los anticuerpos que se generen deberán reconocer a la proteína nativa, con lo cual se comprobará que el epitopo adquiere una conformación espacial semejante a la proteína original. Para ello, la técnica más conveniente es la inmunofluorescencia aunque otra alternativa es ELISA utilizando como antígeno MAPS de *Plasmodium falciparum*. En estudios recientes se ha comprobado que la inmunización de ratones con la bacteria acarreadora ha inducido anticuerpos haciendo probable el mismo efecto en humanos, así mismo se ha llevado a cabo inmunofluorescencia observándose la presencia de la proteína.

Para que esta construcción llegue a ser considerada como candidato a formar parte de una vacuna, los anticuerpos deberán tener alguna función biológica relevante, como neutralización u opsonización. Para esto se tendrá que integrar el gen quimérico en el cromosoma de *Salmonella* dando como característica adicional hacer estable la producción de la proteína, porque la desventaja principal de utilizar plásmidos es que las bacterias pueden expulsarlos cuando se crecen en ausencia de la presión selectiva de los antibióticos, situación que se presenta cuando se administra *in vivo* a la bacteria transformada.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Agüero, J., Mora, G., Mroczenski - Wildey, M.J., Fernández, M., Aaron, L. and Cabello, F. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 KDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. Microbial. Pathogenesis 3:339-407.
- 2 Aidoo, M., Lalvani, A., Allsopp, C.E.M., Plebanski, M., Meisner, S.J., Krausa, P., Browning, M., Morris-Jones, S., Gotch, F., Fidock, D.A., Takiguchi, M., Roberson, K.J., Greenwood, B., Druilhe, O., Whittle, H. and Hill, A.V. 1995. Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria. Lancet. 345, 1003 -1007
- 3 Alonso, P., Smith, T., Schellenberg, J.R.M., Masanja, H., Mwankusye, S., Urassa, H., Bastos de Azevedo, I., Chongela, J., Kobero, S., Menendez, C., Hurt, N., Thomas, M.C., Lyimo, E., Weiss, N.A., Hayes, R., Kitua, A.Y., Lopez, M.C., Kilama, W.L., Teuscher, T. and Tanner, M. 1994. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. Lancet. 344, 1175 - 1181
- 4 Alonso, P., Teuscher, T. and Tanner, M. 1994. SPf66: Research for development or development of research? Vaccine . 12: 99-101.
- 5 Amador, R., Moreno, A., Valero, V., Murillo, L., Mora, A., Rojas, M., Rocha, C., Salcedo, M., Guzmán, F., Espejo, F., Nuñez, F. and Patarroyo, M. 1992. The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine SPf66 safety, immunogenicity and protectivity. Vaccine. 10. 170-178.
- 6 Benz, R. and Bauer, K. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Eur. J. Biochem. 176:1-19.
- 7 Beudin R.L. 1988. Diagnóstico de Malaria. En: Publicación Científica No. 512. Organización Panamericana de la Salud, OMS. Washington D.C. EUA. pp 67-74.
- 8 Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguin, C. and Kumate, J. 1983. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. Scan. J. Infectol. 25:73-80.
- 9 Boletín Epidemiológico Mensual. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Salud 4(8):61-63,1993
- 10 Bosch, D., Scholten, M., Verhagen, C. and Tommassen, J. 1989. The role of the carboxy terminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein PhoE. Mol. Gen. Genet. 216:144-148

- 11 Brown, A. E., Singharaj, P., Webster, H. K., Pipithkul, J., Gordon, D.M., Boslego, J.W., Krinchai, K., Su-Archawatana, P., Wongsrichanalai, C., Ballou, W.R., Permpanich, B., Kain, K.C., Hollingdale, M.R., Witte, J., Cryz, S.J. and Sadoff, J.C. 1994. Safety, immunogenicity and limited efficacy study of a recombinant *Plasmodium falciparum* circumsporozoite vaccine in Thai soldiers. *Vaccine* 12, 102-108
- 12 Cárdenas, L. and Clements, J.D. 1993. Stability, Immunogenicity and Expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine* 11:126-135.
- 13 Carter, R., Coulson, A., Bhatti, S., Taylor, B.J. and Elliot, J.F. 1995. Predicted disulfide-bonded structures for three uniquely related proteins of *Plasmodium falciparum*, Pfs230, Pfs48/45 and Pf12. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 71, 203 - 210
- 14 Caspers, P., Gentz, R., Matile, H., Pink, R. and Sinigaglia, F. 1989. The circumsporozoite protein gene from NF54, a *Plasmodium falciparum* isolate used in malaria vaccine trials. *Molecular and Biochemical-Parasitology*. 35: 185-190.
- 15 Chang, S., Case, S., Gosnell, W., Hashimoto, A., Kramer, K., Tam, L., Hasiro, Q., Nikaido, C., Gibson, H., Lee-NG, C., Barr, P., Yokota, B. and Hui, G. 1996. A recombinant Baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* Merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. *Infect. Immun.* 64:253-261
- 16 Charbit, A., Molla, A., Ronco, J., Clement, J.M., Favier, V., Bahraoui, E.M., Montagnier, L., and Leguerm, A. 1990. Immunogenicity and antigenicity of conserved peptides from the envelope of HIV-1 expressed at the surface of recombinant bacteria. *AIDS* 4:454-451
- 17 Chatterjee, S., Wery, M., Sharma, P. and Chauhan, V.S. 1995. A Conserved Peptide Sequence of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein and Antipeptide Antibodies Inhibit *Plasmodium berghei* Sporozoite Invasion of Hep-G2 Cells and Protect Immunized Mice against *P. berghei* Sporozoite Challenge. *Infect. Immun.* 63:4375-4381
- 18 Clement, J.M., Charbit, A., Martineau, P., O'Callaghan, D., Szmelcman, S., Leclerc, S., and Hofnung, M. 1991. Bacterial vectors to target and/or purify polypeptides: their use in immunological studies. *Ann. Biol. Clin. Paris* 49:249-254
- 19 Clyde, D.F., McCarty, V.C., Miller, R.M. and Hornick, R.B. 1973. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced *Plasmodium falciparum* infection. *Amer. J. of. Med. Sciences* 266:398-400

- 20 Cohens, Deans, J.A. 1988. Specific acquired immunity in experimental malaria. In: *Malaria Principles and practice of Malariaology* Vol.2, Wernsdorfer W.H., Mc Gregor I.eds. Edinburgh; Churchill Livingstone, pp 517-557.
- 21 Cole, S., Sonntag, I. and Henning, U. 1982. Cloning and expression in *Escherichia coli* K12 of genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 149: 145-150
- 22 Cowan, S.W., Schirmer, O., Rummel, O., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., and Rossmusch, J.P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358:727-733
- 23 D'Alessandro, U., Leach, A., Drakeley, C., Bennett, S. and Olaye, B. 1995 . Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *The Lancet.* 346: 462-466
- 24 Dame, J.B., Williams, J.L., McCutchan, T.F. and Weber, J.L. 1984. Structure of the gene encoding the immunodominant Surface Antigen on the Sporozoite of the Human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225:593-599
- 25 Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G. 1995 PCR Primer. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press
- 26 Doolan, D., Bech, H. and Good, M. 1994. Evidence for limited activation of distinct CD4⁺ T cell subsets in response to the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in Papua New Guinea. *Parasite Immunology.* 16: 129-136
- 27 Enea.V. 1984. DNA cloning of *Plasmodium falciparum* gene: amino acid sequence of repetitive epitope. *Science* 225:628-630
- 28 Ferreira, A., Schofield, L., Enea, V., *et al.* 1986. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science* 232.881-884.
- 29 Galdiero, F., de L'Ero, G., Benedetto, N., Galdiero, M., and Tufano, M. 1993. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 61:155-161
- 30 Garcia, J.A.; Paniagua, Pelayo, R., Isibasi, A., and Kumate, J. 1992. Factores de virulencia de *Salmonella typhi* en relación al desarrollo de nuevas vacunas. *Sal. Pub. de Mex.* 34.262-267

- 31 González, C.R., Hone, D., Noriega, F., Tacket, C., Davis, J.R., *et al.* 1994. *Salmonella typhi* Strain CVD908 Expressing the Circumsporozoitic Protein of *Plasmodium falciparum* : Strain Construction, Safety and Immunogenicity in Humans. *J. Infect. Dis.* 169:927-931
- 32 González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Blanco, F. and Kumate, J. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol and Immunol* 37:793-799
- 33 González, C.R., Mejía, M.V., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Ramírez, G. and Isibasi, A. 1995. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. 26:S99-S103
- 34 Good, M., Zevering, Y., Currier, J. and Billsborough, J. 1993. Original antigenic sin, T cell memory, and malaria sporozoite immunity: an hypothesis for immune evasion. *Parasite Immunology*. 15: 187-193
- 35 Gordon, D.M., McGovern, T. W., Krzych, U., Cohen, J.C. Shneider, I., LaChance, R., Heppner, D.G., Yuan, G., Hollingdale, M., Slaoui, M., Hauser, P., Voet, P., Sadoff, J. and Ballou, W.R. 1995. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 171, 1576 - 1585
- 36 Gwedz, R.W., Cochrane, A.H. and Nussenzweig, V. 1979. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull WHO* 57:(suppl.1) 165-173
- 37 Heppner, D.G. and Gordon, D.M. 1996. Safety, Immunogenicity, and Efficacy of *Plasmodium falciparum* Repeatless Circumsporozoite Protein Vaccine Encapsulated in Liposomes. *The Journal of Infectious Diseases*. 174: 36
- 38 Hill, A.V. S., Kwiatkowski, D., Anstey, N. Twumasi, P., Rowe, P.A. Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J. and Greenwood, B.M. 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 352, 595 - 600
- 39 Hofnung, M. 1991. Expression of foreign polypeptides at the *Escherichia coli* cell surface. *Methods Cel. Biol.* 34:77-105
- 40 Hone, D.M., Harris, A.M. and Chatfield, S. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9:810-816

- 41 Hone, D.M., Tacket, C.O. and Harris, A.M. 1992. Evaluation in volunteers of a candidate live oral attenuated *Salmonella typhi* vector vaccine. *J. Clin. Inves* 90:412-420
- 42 Hui, G., Nikaido, C., Hashiro, C., Kaslow, D. and Collins, W. 1996. Dominance of Conserved B-Cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, MSP1, in Blood - Stage infections of naive *Aotus* Monkeys. *Infect. Immun.* 64:1502-1509
- 43 Información Epidemiológica de Morbilidad, Estados Unidos Mexicanos, 1989, Dirección General de Epidemiología. Dirección de Información Epidemiológica Depto. de Morbilidad. Secretaría de Salud
- 44 Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C., and Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from Gram-negative bacteria as vaccine with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* porins. In: Cell function and disease. Todd, L., Jaz, J., and Parker, L, eds. pp281 Plenum, New York.
- 45 Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with Outer Membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9.12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- 46 Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., Garcia, J.A. and Kumate, J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* 10:811-813.
- 47 Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M., Martín, N., Ramírez, G., González, C.R., López-Macias, C., Sanchez, J., Kumate J. and Ortiz-Navarrete, V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the Induction of Protective Immunity. *I Ann. NY Acad. Sci.* 730:350-354, 1994.
- 48 Jones, T. R. & Hoffman, S. L. 1994. Malaria vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews.* 7, 303-310
- 49 Kaslow, D.C., Bathurst, I.C., Lensen, T., Ponnudurai, T., Barr, P.J. and Keister, D.B. 1994. *Saccharomyces cerevisiae* recombinant Pfs25 adsorbed to alum elicits antibodies that block transmission of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity.* 62, 5576- 5580

- 50 Kowanko, I. and Ferrante, A. 1996. Tumor Necrosis Factor Primes Neutrophils To Kill *Staphylococcus aureus* by an Oxygen-Dependent Mechanism and *Plasmodium falciparum* by an Oxygen-Independent Mechanism. *Infection and Immunity*. 64:3435-3437
- 51 Kumar, S., Miller, L.H. and Quaky, L. A. 1988. Cytotoxic T cell specific for circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 334:258-261
- 52 Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
- 53 Lai, A., Hughes, M., Oliveira, D., Nelson, C., Bloland, P., Oloo, A., Hawley, W., Hightower, A., Nahlen, B. and Udhayakumar, V. 1996. Identification of T-Cell Determinants in Natural Immune Responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in an Adult population exposed to malaria. *Infect. Immun.* 64:1054-1059
- 54 Lanar, D., Tine, J., Seguin, M., Cox, W., Winsslow, J., Ware, L., Kauffman, E., Gordon, D., Ballou, W., Paoletti, E. and Sadoff, J. 1996. Attenuated Vaccinia Virus-Circumsporozoite Protein Recombinants Confer Protection against Rodent Malaria. *Infection and Immunity*. 64:1666-1671
- 55 Leach, A., Drakeley, C., D'Alessandro, U., Fegan, G., Bennett, S., Ballou, W., Targett, G. and Greenwood, B. 1995. A pilot safety and immunogenicity study of the malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *Parasite Immunology*. 17: 441-444.
- 56 Leclerc, C., Charbit, A., Martineau, P., Deriaud, E., and Hofnung, M. 1991. The cellular location of a foreign B cell epitope expressed by recombinant bacteria determines its T cell-independent or T cell-dependent characteristics. *J. Immunol.* 147:3545-3552
- 57 Leclerc, C., Martineau, P., Van der Werf, S., Deriaud, E., Duplay, P., and Hofnung, M. 1990. Induction of virus-neutralizing antibodies by expressing the C3 poliovirus epitope in the periplasm. The route of immunization influences the isotypic distribution and the biologic activity of the antipoliovirus antibodies. *J. Immunol.* 144:3174-3182
- 58 Ling, I.T., Ogun, S.A. & Holder, A.A. 1994. Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunology*, 16, 63- 67
- 59 López-Macias, C.R. 1995. Respuesta de linfocitos T citotóxicos contra la porina OmpC de *Salmonella typhi*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina. UNAM. México

- 60 López-Macias, C. López-Hernández, M.A., González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V. 1995. Induction of antibodies against *Salmonella typhi* OmpC by naked DNA immunization. Ann NY Acad of Sci 772:285-288
- 61 Lopez M.H.R. 1992. Vacunas contra el Paludismo En: Vacunas Ciencia y Salud. Escobar, A.G., Valdespino, J.L.G., Amor, J.S eds. Secretaria de Salud, Subsecretaria de Salud, México D.F. pp 529-542.
- 62 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193:265-275
- 63 Malaria Obstacles and Opportunities. A report of the committee for the study on Malaria Prevention and Control: Status and Alternative Strategies. Division of International Health. Institute of Medicine. Oacks, S.C. Mitchel, V. Pearsons, G.W, and Carpenter, C.J eds. National Academy Press. Washington, D.C. 1991
- 64 Malik, A., Egan, J.E. and Houghten, R.A. 1991. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 88:3300-3304
- 65 Marshall, V., Zhang, L., Anders, R. and Coppel, R. 1996. Diversity of the vaccine candidate AMA-1 of *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology. 77: 109-113
- 66 Martineau, P., Charbit, A., Leclerc, C., Werts, C., O'Callaghan, D., and Hofnung, M. 1991. A genetic system to elicit and monitor antipeptide antibodies without peptide synthesis. Biotechnology 9:170-172
- 67 Martineau, P., Guillet, J.G., Leclerc, C., and Hofnung, M. 1992. Expression of heterologous peptides at two permissive sites of the MalE protein: antigenicity and immunogenicity of foreign B-cell and T-cell epitopes. Gene. 113:35-46
- 68 Mazier, D.S., Mellouk, R.L., Beaudin, B. and Texier, B. 1986. Effect of antibodies to recombinant and synthetic peptide on *Plasmodium falciparum* sporozoites *in vitro*. Science 231:156-159
- 69 Mc Gregor, I.A. and Wilson, R.J.M. 1988 Specific immunity: acquired in man. In: Malaria. Principles and practice of Malarology, Vol. 2, Wernsdorfer W.H., Mc Gregor I eds. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp 559-661

- 70 Muthukkumar, S., and Muthukkaruppan, V. 1993. Mechanism of protective immunity induced by porin lipopolysaccharide against murine *Salmonellosis*. *Infect Immun.* 61:3017-3025
- 71 Nardin, E. 1986. Development of a sporozoite malaria vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:678-683
- 72 Nikaido, H., and Vaara, M. 1987. Outer Membrane. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H.E. eds. American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA. pp 7-22
- 73 Nussenzweig, R.S., Vanderberg, H., Most, H. and Orton, C. 1967. Protective immunity Induced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216:160-162
- 74 Nussenzweig, R.S. 1972. The antibody response to sporozoites of simian and human malaria parasite: its stage and species specificity and strain cross-reactivity. *Bull WHO* 50:293-297
- 75 Ockenshouse, C.F. 1994. NYVAC-Pf7, a multistage *P.falciparum* vaccine expressed by attenuated vectors. 8th International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey; abstract no. S21.1, p86
- 76 Ortiz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E., and Kumate J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1640-1654
- 77 Paniagua, J., Isibasi, A., García, J.A., González, C.R., Ortiz-Navarrete, V., and Kumate, J. 1992. Porins as protective immunogens against typhoid fever. In: *Typhoid fever: Strategies for the 90's*. Pang, T., Koh, C.L., and Puthucherry, S.D. eds. pp 65. World Scientific Publishing Co. London
- 78 Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Mui, M., González, C., García, A., Islas, S., and Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12. Vi.d. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch Inv Med (Mex)* 20:315-20

- 79 Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., González, C., García, A., Islas, S. and Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales murinos de fiebre tifoidea. Arch. Invest Med 20:315-320
- 80 Paniagua, J., Martín, N., Ortiz, V., Ramírez, G., González, C.R. and Isibasi, A. 1995. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. Immunol. Infec. Dis. 5:244-249
- 81 Paniagua-Solis J., Sánchez J., Ortiz-Navarrete V., González C.R., Isibasi, A. 1996. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* OmpC peptide loops. FEMS Microbiol Letters 141:31-36
- 82 Patarroyo, G., Franc, L., Amador, R., Murillo, L., Rocha, C., Rojas, M. and Patarroyo, M. 1992. Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years. Vaccine. 10: 175-178
- 83 Patarroyo, M.E., Amador, R. and Clavijo, P. 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with sexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 332:158
- 84 Perraut, R., Mercereau, O., Mattei, D., Bourreau E., Garraud, O., Nonnemains, B., Pereira, L. and Michel, J.C. 1995. Induction of Opsonizing Antibodies after Injection of Recombinant *Plasmodium falciparum* Vaccine Candidate Antigens in Preimmune *Saimiri sciureus*; Monkeys. Infect. Immun. 63:554-562.
- 85 Perris, J.S.M., Premawansa, S. and Ranakewa, M. 1988. Monoclonal and polyclonal antibodies can block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. Am J. Trop. Med. Hyg. 39(1):26
- 86 Puente, J.L., Juárez, D., Bobadilla, M., Arias, C.F., and Calva, E. 1995. The *Salmonella ompC* gene structure and use as a carrier for heterologous sequences. Gene. 156:1-9
- 87 Ranford, L., Taylor, R., Asgari-Jirhandeh, N., Smith, D., Roberts, P., Robinson, J., Babiker, H., Riley, M., Walliker, D. and McBride, J. 1996. Differential antibody recognition of FC27-like *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein MSP2 antigens which lack 12 amino acid repeats. Parasite Immunology. 18: 411-420
- 88 Read, D., Lensen, A., Bergamie, S., Haley, S., Raza, A. and Carter, R. 1994. Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the *Plasmodium falciparum* gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. Parasite Immunology. 16: 511-519

- 89 Robinson, A., Severn, A. and Phillips, R. 1996. Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*. *Parasite Immunology*. 18: 425-430
- 90 Rocha, C., Murillo, L., Mora, A., Rojas, M., Franco, L., Cote, J., Valero, M., Moreno, A., Amador, R., Nuñez, F., Coronell, C. and Patarroyo, M.E. 1992. Determination of the immunization schedule for field trials with the synthetic malaria vaccine SPf66. *Parasite Immunology*. 14:95-109
- 91 Rodríguez, H. 1996. Vacunas contra el Paludismo. Primer Congreso Nacional de Vacunología. El Colegio Nacional. pp. 29
- 92 Ronco, J., Charbit, A., and Hofnung, M. 1990. Creation of targets for proteolytic cleavage in LamB protein of *Escherichia coli* K12 by genetic insertion of foreign sequences: implications for topological studies. *Biochimie* 72:183-189
- 93 Sadoff, J.C., Ballou, L.S. and Baron, L.S. 1989. Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science* 240:336-338.
- 94 Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-49
- 95 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press
- 96 Schnaitman, C.A. 1971. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108:553-563
- 97 Schofield, L., Villaquiram, J. and Ferreira, A. 1987. Gamma-interferon, CD8+ T cells and antibodies are required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330:664-666.
- 98 Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. and Hoffman, S.L. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91, 9866 - 9870
- 99 Shai, S., Blackman, M. and Holder, A. 1995. Epitopes in the 19 kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1 (PfMSP-1₁₉) recognized by human antibodies. *Parasite Immunology*. 17: 269-275

- 100 Sharma, P., Bharadwaj, A., Bhasin, V., Sailaja, V. and Chauhan, V. 1996. Antibodies to a Conserved-Motif Peptide Sequence of de *Plasmodium falciparum* Thrombospondin-Related Anonamous Protein and Circumsporozoite Protein Recognize a 78-Kilodalton Protein in the asexual Blood Stages of the Parasite and Inhibit Merozoite Invasion *in vitro*. *Infect. Immun.* 64:2172-2179
- 101 Stites, D. and Terr, A. 1991. Immunología Básica y Clínica. Manual Moderno. México D.F. Séptima edición
- 102 Stowers, A., Prescott, N., Cooper, J., Takacs, B., Stueber, D., Kennedy, P. and Saul, A. 1995. Immunogenicity of recombinant *Plasmodium falciparum* rhoptry associated proteins 1 and 2. *Parasite Immunology*. 17: 631-642
- 103 Struyvé, M., Moons, M. and Tommassen, J. 1991. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* 218:141-148
- 104 Su, S., Yang, S., Ding, R. and Davidson, E. 1996. Primary Structure of the variable region of monoclonal antibody 2B10, Capable of Inducing anti-idiotypic antibodies that recognize the C-Terminal region of MSA-1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 64: 326-331
- 105 Szmelcam, S., Clement, J.M., Jehanno, M., Schwartz, O., Montagnier, L., and Hofnung M. 1990. Export and one-step purification from *Escherichia coli* of a MalE-CD4 hybrid protein that neutralizes HIV *in vitro*. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 3:859-872
- 106 Tacket, C.O., Hone, D.M., Curtiss, R. I., Kelly, S.M., Losonsky, G., Guers, L., Harris, A.M., Edelman, R. and Levin, M.M. 1992. Comparison of the safety and immunogenicity of AroD aroD and cya crp *Salmonella typhi* strain in adult volunteers *Infect. Immun.* 60:536-541.
- 107 Tanner, M., Teuscher, T. and Alonso, P.L. 1995. SPf66 the first malaria vaccine. *Parasitology Today*. 11, 10 - 13
- 108 Tommassen, J., Agterberg, M., Janssen, R. and Spierings, G. 1993. Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccine and probes. *Int. J. med. Microbiol. Virol. parasitol. Infect. Dis.* 278:396-406

- 109 Torn, C.S., Lobos, S.R., Calderon, I., Rodriguez, M., and Mora, O. 1990. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1715-1719
- 110 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon. 1979. J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354
- 111 Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. 1987. An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigens for delayed-type hypersensitivity in murine *Salmonellosis*. *Infect. Immun.* 55(3):822-824
- 112 Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. 1987. Protective immunity by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55:816-821
- 113 Udhayakumar, V., and Muthukkaruppan, V. 1989. Protective immunity induced by porin against *Salmonella* infection mice. *Indian J. Med. Res.* 89:121-127
- 114 Valero, M. V., Amador, L.R., Galindo, C., Figueroa, J., Bello, M.S., Murillo, L.A., Mora, L., Patarroyo, G., Rocha, C., Rojas, M., Apponte, J.J., Sarmiento, L.E., Lazada, D.M., Coronell, C.G., Ortega, N.M., Rosas, J.E., Alonso, P. and Patarroyo, M.E. 1993. Vaccination with SPf66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet.* 341, 705 - 710
- 115 Vanderberg, J.P., Nussenzweig, R.S. and Most, H. 1970. Protective immunity produced by the bite of X-irradiated mosquitoes infected with *Plasmodium berghei*. *J. Parasitol.* 56:350-351
- 116 Venegas, A., Gómez, I., Zaror, I. and Yudelevivh, A. 1988. The nucleotide sequence of *Salmonella typhi* OmpC porin gene. *Nucleic Acids Res.* 16:7721
- 117 Venn, A., Fairbridge, D., Mason, T., Marbrook, J., Murray, L., Anders, R. and Shortman, K. 1993. Specificity variants in monoclonal antibodies reactive with peptide epitopes of the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunology.* 15: 455-464

- 118 Wahlgren, M., Bejarano, M., Troye-Blomberg, M., Perlmann, E., Greenwood, B., Patarroyo, M., Gonzalez, C. and Martinez, A. 1991. Epitopes of the *Plasmodium falciparum* clustered-asparagine- rich protein (CARP) recognized by human T-cells and antibodies. *Parasite Immunology*. 13:681-694
- 119 Wang, R., Charoenvit, Y., Corradin, G., Porrozi, R., Hunter, R.L., Glenn, G., Alving, C.R., Church, P. and Hoffman, S.L. 1995. Induction of protective polyclonal antibodies by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein multiple antigen peptide vaccine. *Journal of Immunology*, 154, 2784 - 2793
- 120 Weiss, W.R., Sedegal, H.M. and Beaudin, R.L. 1989 CD8+ T cell (cytotoxic/supressor) are required for in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:573-576
- 121 Wilson, V.G. 1988. A rapid method for removal of excess linkers. *Biotechniques* vol.6: 733-738
- 122 Wong, R.S.Y., Wirtz, R.A., and Hancock, R.E.W. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF as an expression vector for foreign epitopes: the effects of positioning and length on the antigenicity of the epitope. *Gene* 158:55-60
- 123 Yaman, F., Genton, B., Anders, R., Taraika, J., Ginny, M., Mellor, S. and Alpers, M.P. 1995. Assessment of the role of the humoral response to *Plasmodium falciparum* MSP2 compared to RESA and SPf66 in protecting Papua New Guinean children from clinical malaria. *Parasite Immunology*. 17: 493-501
- 124 Zavala, T. 1991. *Parasitología Médica*. Ed. Francisco Méndez Cervantes. 5ta. ed. México, D.F., pp. 157-158