

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
INSTITUTO FINLAY

Construcción de una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* y su expresión en músculo de ratones BALB/c

Lic. Ana Margarita Montalvo Álvarez,¹ Dr. Esteban Alberti Amador,² Dra. Marta M. González Elías,³ Lic. Rocío García Miniet,⁴ Dra. María E. Sarmiento García⁵ y Dr. Armando Acosta Domínguez⁶

RESUMEN

Se construyó una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* mediante el vector pcDNA3, con promotor de expresión en células eucariotas, con el objetivo de contribuir a la aplicación de la tecnología de inmunización con ácidos nucleicos en la leishmaniosis. Para demostrar la expresión de la genoteca en el músculo de ratones inmunizados con esta, se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Como anticuerpo primario se utilizó una mezcla de sueros con alto título antileishmania, de una zona donde predomina la infección con *L. braziliensis*. Se obtuvo una biblioteca con 80 % de clones recombinantes. Se demostró la expresión de determinantes antigénicos en el músculo de ratones BALB/c inmunizados, según resultados de la inmunofluorescencia.

DeCS: INMUNIZACION/métodos; ACIDOS NUCLEICOS/inmunología; BIBLIOTECA GENOMICA; TECNICA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE INDIRECTA; ANIMALES DE LABORATORIO; RATONES CONSANGUINEOS BALBC/inmunología; LEISHMANIA MEXICANA; LEISHMANIASIS/inmunología.

Leishmaniosis es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades causadas por protozoos parásitos del género *Leishmania* y está clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales más importantes.¹ *Leishmania* sp. causa un espectro de enfermedades que van desde la infección cutánea de cura espontánea, hasta la diseminación visceral progresiva de esta, que generalmente causa la muerte.^{2,3}

Existen pocas alternativas para el control de leishmaniosis. El control de vectores y reservorios aún no ha sido posible dada su diversidad biológica.

La terapia de elección es tóxica, en ocasiones ineficiente e inasequible para la mayoría, y la vacunación, que podría ser un método más efectivo para la prevención de la infección, no ha ofrecido aún una solución del todo óptima.^{4,5}

En los años 90 surge una nueva estrategia de vacunación: la inmunización con ADN, también conocida como vacuna de ácidos nucleicos. Esta se basa en el poder inmunogénico generado por la expresión, directamente en células de mamíferos, de genes de organismos patógenos en ellas transfectados. La expresión continua de determinantes antigénicos y su alta estabilidad

¹ Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

³ Especialista de I Grado en Microbiología. IPK.

⁴ Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora. CIREN.

⁵ Especialista de II Grado en Fisiología. Investigadora Titular. Instituto Finlay.

⁶ Especialista de II Grado en Inmunología. Investigador Titular. Instituto Finlay.

constituyen las ventajas principales de este tipo de vacunas. Esta tecnología se ha empleado experimentalmente con la intención de prevenir infecciones virales como la hepatitis B,⁶ influenza⁷ y la infección producida por el VIH-1;⁸ bacterianas como las producidas por *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycoplasma pulmonis*;⁹ así como por parásitos intracelulares, entre ellos *Leishmania major*^{10,11} y *Plasmodium yoeli*,¹² con lo que se obtuvo cierta inmunidad protectora celular y humoral. Se ha reportado la inducción de respuestas inmunes específicas en el nivel celular y humoral en ratones inmunizados con una genoteca de *Mycoplasma pulmonis*, así como un estado de resistencia frente al reto con el microorganismo salvaje.⁹ Más reciente Alberti y otros,¹³ reportaron la expresión de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en el músculo de ratones BALB/c inmunizados con una biblioteca genómica de expresión del parásito y en el año 1999, Piedrafita¹⁴ encontró respuesta inmune protectora inducida por la vacunación con una biblioteca de expresión de *L. major*.

Motivados por la importancia y necesidad de favorecer el control de la leishmaniosis a través de su prevención y teniendo en cuenta observaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en relación con los preparados vacunales, en el sentido de usar más de un inmunógeno en el diseño de nuevas vacunas, los autores de este trabajo se propusieron construir una biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis*, clonarla en un plásmido de expresión en células de mamíferos, y demostrar la expresión de determinantes antigénicos en el músculo de ratones BALB/c inmunizados con dicha biblioteca.

MÉTODOS

Se utilizó la cepa MHOM/77/LTB0016 de *Leishmania mexicana amazonensis*, gentilmente cedida por el Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Para la construcción de la biblioteca genómica de expresión se empleó la cepa de *E. coli* XL1-blue, suministrada por la firma New England's BIOLABS, de genotipo F':Tn10 pro A⁺B⁺ LacI^q (lacZ) M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac.

El vector comercial pcDNA3 fue suministrado por la firma Invitrogen, EE.UU. así como las enzimas de restricción Sau3A, BamHI, EcoRV, T4 ligasa y fosfatasa alcalina y el patrón de peso molecular (PPM) IV, por la firma *Boehringer Mannheim Biochemica, Germany*, todos utilizados según las instrucciones del fabricante.

Los antibióticos empleados fueron tetraciclina a una concentración de 30 mg/mL y ampicilina a 50 mg/mL, también de procedencia *Boehringer Mannheim Biochemica, Germany*.

Se empleó un total de 8 ratones machos, de línea isogénica BALB/c, con un peso entre 16 y 18 g y 6 semanas de edad, suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Ciudad de La Habana, Cuba).

*Preparación de células competentes*¹⁵

Partiendo de las células XL1-blue se realizó la preparación de las células competentes, por el método del cloruro de calcio, con la metodología descrita por Maniatis según fue citado.

*Purificación de colonias por el método de lisis alcalina*¹⁵

Las colonias transformadas fueron purificadas por este método según describe Maniatis.

Electroforesis de ADN

Se prepararon geles con concentración de agarosa de 0,8 % disuelto en tampón de corridas trisborato-EDTA (TBE) (tris base 0,004 mol, ácido bórico 0,001 mol, EDTA 0,5 mol) pH 8. Se fundió la agarosa y se le adicionaron 5 µL de bromuro de etidio por cada 100 mL (0,5 µg/mL). Se dejó a temperatura ambiente hasta que alcanzó 60 °C y se vertió en el molde hasta gelificar. Se colocó en la cámara GNA-200 (*Pharmacia*) que contenía *buffer* TBE y se aplicaron las muestras disueltas en bromofenol azul 0,25 % en solución de sacarosa a 40 %. La corriente empleada fue entre 1 y 5 V/cm de distancia entre los electrodos por circuito (100 V).

*Purificación masiva*¹⁵

Para realizar la purificación masiva se sembraron todas las colonias obtenidas en la

biblioteca, incluidos los restos de los precultivos de la purificación de las colonias analizadas, en 500 mL del medio LB con ampicilina y se aplicó la metodología descrita ampliamente por *Maniatis*. El botón de ADN obtenido se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se realizó la lectura a 260 nm y 280 nm de una dilución 1:500 del ADN (espectrofotómetro *ultrospec III*, *Pharmacia*, LKB) para calcular la concentración y el grado de pureza de este.

Construcción de la biblioteca genómica de Leishmania amazonensis

Los promastigotes del parásito fueron cultivados en medio de *Schneider* con 10 % de suero fetal bovino y una mezcla de ampicilina y estreptomycin a 250 µg/mL y 100 UI respectivamente, se incubó a 26 °C.

El ADN genómico de *Leishmania amazonensis* se obtuvo por el método de *Hookey*. Se tomaron aproximadamente 10⁹ promastigotes del cultivo que fueron lavados por centrifugación a 250 g en tampón PBS (KCl 200 mg, KH₂PO₄ 200 mg, NaCl 8 000 mg, Na₂HPO₄ 1 150 mg, H₂O csp 1 L). Los promastigotes lavados fueron resuspendidos en tampón de lisis (tris HCL 100 mmol, pH 8, EDTA 100 mmol, pH 8, SDS 2 %, NaCl 150 mmol y proteinasa K 200 µg/mL) e incubados 2 h a 56 °C. Seguidamente se procedió a hacer la extracción del ADN con fenol-cloroformo y a continuación se precipitó con etanol absoluto. El sedimento obtenido fue resuspendido en tampón TE y la integridad del ADN obtenido fue chequeada por electroforesis en gel de agarosa a 0,8 %, en las condiciones ya explicadas. La concentración de ADN fue estimada con un cuantificador automático de ADN y ARN, *gene quant* (*Pharmacia Biotech England*).

El ADN genómico de *L. amazonensis*, a una concentración de 1 µg/µL fue digerido con la enzima *Sau3A* a diferentes intervalos, y diferentes concentraciones de la enzima, hasta obtener fragmentos de la talla deseada. Después 1,5 µg de estos fragmentos y 800 ng del plásmido pcDNA3, previamente digerido con *BamHI* y desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina, se ligaron en el sitio *BamHI* del vector, con el empleo de la enzima *T4* ligasa a 16 °C toda la noche. A continuación

las células competentes de la cepa XL1-blue de *E. coli* fueron transformadas por el método de CaCl₂ según se describió. Se tomaron 100 µL y se le añadieron 10 µL de la mezcla de ligazón, después se incubó 30 min en hielo y luego se mantuvo por 2 min a 42 °C. Inmediatamente se añadió 1 mL de medio (LB) estéril, se mezcló con gentileza y se colocó a 37 °C por 1 h en zaranda a 150 rpm. Por último, se tomaron 50 µL que fueron sembrados en una placa de LB-ampicilina (LB_A) durante 16 h a 37 °C.

De las colonias obtenidas se seleccionaron al azar 20, a las que se les realizó la purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina ya descrito. El ADN obtenido de las colonias fue digerido con la enzima *EcoRV* y más tarde se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 0,8 %, con la utilización como control del plásmido pcDNA3 digerido con la misma enzima. El gel fue fotografiado con una cámara *Polaroid Kodak*. El resto del precultivo (950 µL) y de las colonias obtenidas se añadió a 500 mL de LB_A, para llevar a cabo la amplificación de toda la biblioteca genómica. Después de incubar por 16 h a 37 °C con agitación (150 rpm) el cultivo fue centrifugado a 600 g durante 15 min a 4 °C. Con las células obtenidas se llevó a cabo la purificación masiva de plásmidos por el método referido anteriormente. El material purificado fue diluido en solución salina 0,9 % estéril hasta obtener una concentración final de 250 µg/mL, después de esto fue conservado a -20 °C hasta el momento de su uso.

Esquema de inmunización

Para determinar la expresión de antígenos de *L. amazonensis* en el músculo de los ratones BALB/c inmunizados, los animales se dividieron en 4 grupos, de la forma siguiente:

- B: Grupo inmunizado con la biblioteca genómica de *Leishmania amazonensis* (n = 2).
- P: Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3 (n = 2).
- C: Grupo no inmunizado (n = 2).
- S: Grupo inmunizado con solución salina fisiológica 0,9 % (n = 2).

Se administró a cada ratón 50 µg de inóculo, en todos los casos en un volumen de 0,1 mL en

solución salina estéril 0,9 %, por vía IM en la región anterior de la pata trasera izquierda, con excepción del grupo C que no recibió ningún tipo de inmunización. El grupo S recibió en igual volumen, solución salina fisiológica estéril (SSF).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar la expresión de antígenos de Leishmania amazonensis en el músculo de los animales inmunizados

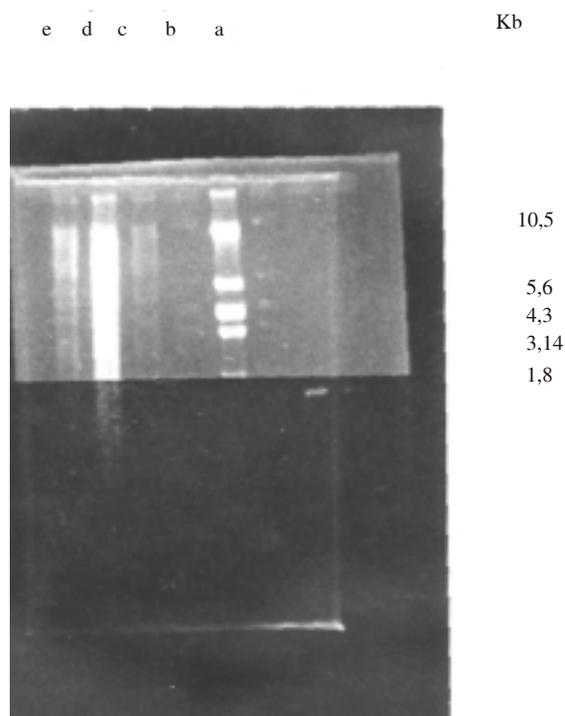
A los 3 d de la primera inmunización se sacrificaron por dislocación cervical los animales de cada grupo, para obtener muestras de tejido muscular del sitio inoculado y se realizaron cortes por congelación de aproximadamente 4 µm de espesor con un criostato (*Friostat Leitz*). Los cortes de tejido se depositaron en láminas portaobjetos y se dejaron secar al aire 60 min. Posteriormente, se fijaron en acetona fría durante 10 min, se dejaron secar y se añadieron 50 µL de una mezcla de sueros con alto título anti *Leishmania*; procedente de pacientes con leishmaniosis de área endémica, a una dilución 1/20 en SSF. Se realizó una incubación durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda; se lavó 3 veces durante 5 min con SSF y se puso a secar en aire frío. A continuación se añadieron 50 µL de un conjugado de inmunoglobulinas de conejo anti Ig-G humanas marcado con isotiocianato de fluorescencia (sigma), diluido 1/20 en SSF, que contenía azul de Evans (1/1000) y se incubó nuevamente 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados similares a los anteriores, se depositó una gota de glicerina fosfatada y se colocó el cubreobjetos. La evaluación de la expresión antigénica se realizó mediante la observación de los cortes de tejido en un microscopio de fluorescencia (Wild-Leitz, Heerbrugg Switzerland) equipado con lámpara HBO 500 watt CAC y con un lente de 25 x de inmersión en aceite. Las láminas fueron fotografiadas con un equipo acoplado al microscopio.

RESULTADOS

Como resultado de la extracción de ADN, se obtuvieron 40 µL de ADN genómico de *L. amazonensis*

a una concentración de 1 µg/µL, que se visualizó como una fluorescencia amarillo naranja al observarlo en un trasiluminador ultravioleta (modelo *Ultra Linker, Kodak*). En la figura 1 (B, C, D y E) se muestran los resultados de las digestiones analíticas realizadas con la enzima Sau3A, donde pueden observarse los patrones de bandas que se obtuvieron a diferentes tiempos de digestión (3, 7, 15 y 21 min respectivamente). El PPM empleado (línea A) permitió estimar que las tallas de los fragmentos obtenidos se encontraran en un rango de 8-1,5 kb. En corridas electroforéticas anteriores (no mostradas) se pudo observar la integridad total del genoma sin digerir, lo que indicó la ausencia total de nucleasas inespecíficas en la preparación.

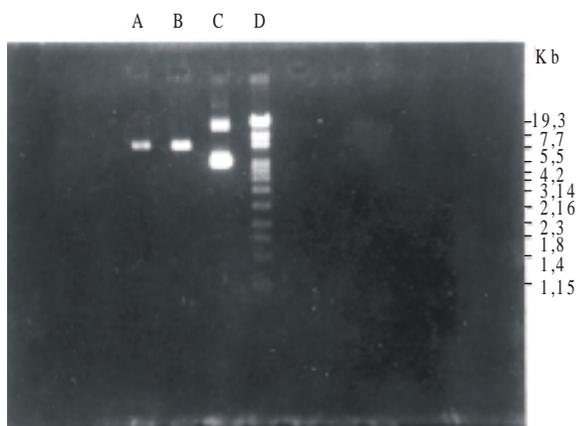
La figura 2 muestra la purificación del plásmido pcDNA3, del cual se obtuvieron 200 µL a una concentración final de 14,58 µg/µL y que fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. También se pueden observar las conformaciones correspondientes al plásmido



A: patrón de peso molecular; B, C, D y E: tiempos de incubación con la enzima, 3, 7, 15 y 21 min respectivamente.

Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Ensayo de restricción del ADN genómico de *Leishmania amazonensis*. Se empleó Sau3A a diferentes tiempos de incubación a 37 °C.

nativo, con predominio de la forma superenrollado y ausencia de ARN (línea C). Una muestra de las digestiones realizadas con la enzima BamHI, durante la preparación de los vectores para la construcción de la biblioteca, puede ser observada también (línea B), donde se muestra la banda correspondiente al vector linealizado (5,446 kb) que migró muy cerca de la línea correspondiente del PPM. A continuación (línea A) puede observarse el resultado de la desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina, encargada de impedir la recircularización de los plásmidos, al eliminar sus grupos fosfatos de los extremos 5', porque este proceso no se produjo, al incubarlo con la enzima T4 ligasa. A pesar de la cantidad de ADN digerido aplicado, no se observan signos de degradación ni bandas por encima del vector, lo que indica una digestión total.

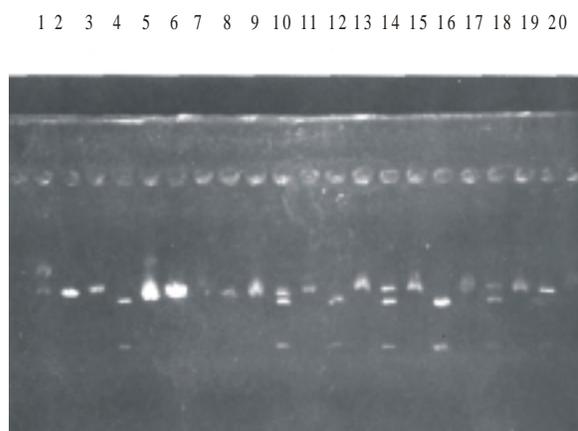


Línea A: pcDNA3 desfosforilados, B: pcDNA3 digerido con BamHI, C: pcDNA3 nativo, D: patrón de peso molecular.

Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 %.

En la figura 3 se observa el resultado obtenido del análisis de restricción realizado con la enzima EcoRV, a 10 de las 20 colonias purificadas de los transformantes obtenidos luego de la obtención de la biblioteca genómica. Como resultado de este experimento se observaron con insertos de ADN de *L. amazonensis*, 16 de los 20 clones seleccionados al azar (80 %), algunos de los cuales se muestran en las líneas,

de izquierda a derecha (4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20). Todos los clones recombinantes analizados en este caso muestran bandas con tallas mayores y menores que el vector digerido (línea 2) utilizado como control. El resto de las digestiones se mantienen en el nivel del vector y parecen corresponder a plásmidos no recombinantes (línea 6).



Línea 1: plásmido pcDNA3 íntegro, Línea 2: plásmido pcDNA3 digerido con EcoRV; Líneas 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20: plásmido con insertos ADN de *L. amazonensis*; Línea 6: plásmido sin inserto.

Fig. 3. Análisis de restricción con la enzima EcoRV de los plásmidos purificados de los transformantes obtenidos.

Utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se demostró la expresión de determinantes antigénicos de *L. amazonensis* en las muestras de tejido muscular, tomadas de los animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión del microorganismo (fig. 4A). De otra parte, se observó ausencia de expresión tanto en los animales inoculados con el plásmido pcDNA3, como en los inoculados con solución salina fisiológica y en el grupo no inmunizado, como muestra la negatividad de fluorescencia en la figura 4B.

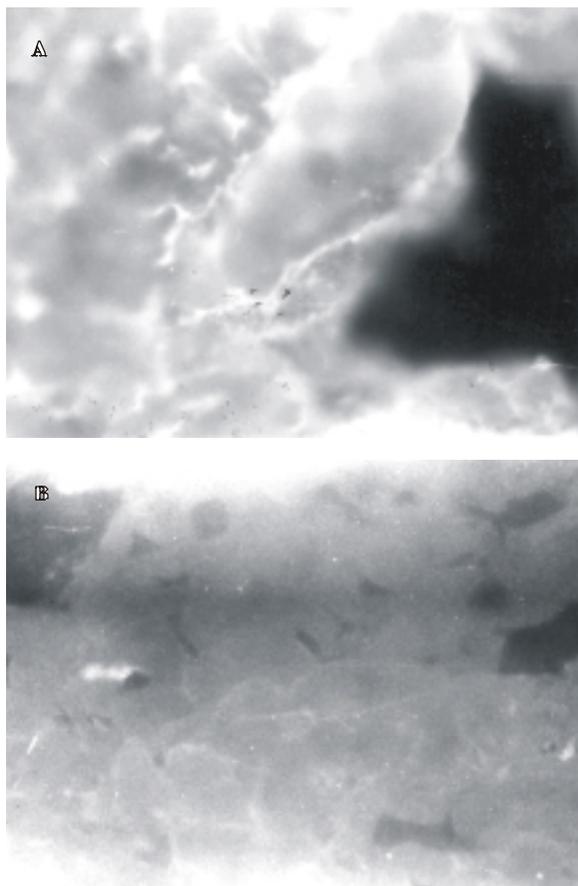


Fig.4 Inmunofluorescencia positiva, B: Inmunofluorescencia negativa.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el análisis de la presencia de insertos de ADN del parásito, en los transformantes provenientes de la biblioteca genómica de expresión, ponen de manifiesto un alto porcentaje (80 %) de plásmidos recombinantes en la preparación, que posteriormente se administraron a los ratones BALB/c. Se aseguró, por lo tanto, una elevada representatividad del genoma del microorganismo en la preparación administrada. Las tallas de los fragmentos seleccionados posibilitan la presencia de genes que pudieran codificar productos importantes del parásito, tal vez relacionados con la protección o con su posible identificación. Sin embargo, los autores de este trabajo piensan que este conjunto de fragmentos es también representativo de los genes que el parásito expresa en una infección natural, esto permite plantear la posible utilización de esta genoteca como preparado vacunal.

Los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia confirman la expresión de determinantes antigénicos de *L. amazonensis* en el músculo de los ratones inmunizados con la biblioteca. Es posible que una parte de los antígenos del parásito se expresaran con una conformación similar a la encontrada en el microorganismo original, porque la mezcla de sueros utilizada como anticuerpos primarios en la técnica, provenía de pacientes infectados con el parásito en su forma salvaje. Además, como la mezcla de sueros utilizada correspondía a pacientes con alto título antileishmania, provenientes de una zona donde predomina la infección por *L. braziliensis*, se puede plantear la posibilidad de la existencia de epitopes comunes entre estas especies.

Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores, tanto para la expresión de bibliotecas, como para la expresión de genes individuales provenientes de otros microorganismos administrados por vía intramuscular.^{13,16,17} Existe un reporte donde no se realizó el estudio de expresión antigénica en el tejido muscular, sin embargo, al detectar respuesta inmune específica en los animales inmunizados con la genoteca, se puso de manifiesto la expresión de genes posterior a la inmunización.¹²

Como elemento importante a señalar está el hecho de que la biblioteca fue construida con ADN genómico de *Leishmania amazonensis*, que es un organismo eucariota y por lo tanto tiene un gran porcentaje de sus genes con intrones. El hecho de haber encontrado expresión de antígenos del microorganismo en el músculo, después de la administración de la biblioteca, permite plantear la posibilidad de que la célula muscular haya realizado el procesamiento del ARN mensajero (ARNm) de *L. amazonensis* como lo realiza el propio parásito o bien que se hayan expresado genes de *Leishmania* sin intrones, lo que debe confirmarse en trabajos posteriores. De ser así, este resultado tendría implicaciones desde el punto de vista básico y aplicado, pues hasta el momento los trabajos publicados de inmunización con ADN de parásitos se llevaron a cabo después de la obtención de ADN complementario, a partir de ARN mensajero maduro de estos microorganismos.^{10,12} De confirmarse el procesamiento del ARN del parásito por las células musculares se simplificaría

sustancialmente la preparación de ADN a partir de organismos eucariotas.

En una reciente investigación de *Piedrafita*, ya citada, se describe la inmunización con distintas fracciones de una biblioteca, así como la caracterización *in vitro* de la respuesta inmune generada en el nivel celular o humoral. Se considera muy conveniente conocer el papel de la inmunización con la biblioteca genómica en la posible protección *in vivo* de ratones BALB/c, susceptibles a la infección con este parásito, por cuanto abriría nuevas posibilidades en el camino hacia la inmunoprotección de este.

Muchos investigadores han argumentado las ventajas y desventajas de una posible vacuna con ADN en seres humanos.^{18,19} Los autores de este estudio consideran que la inmunización con ADN ofrece alternativas atractivas y aún explorables para la vacunación. Este trabajo pretende estimular la búsqueda de nuevas variantes en la inmunización con ácidos nucleicos de organismos eucariotas, como el parásito que aquí se estudia y consideran esta tecnología como una herramienta útil para la identificación de antígenos o la preparación de vacunas de última generación.

SUMMARY

A genomic library of *Leishmania amazonensis* was built through a pcDNA3 vector, with expression promoter in eukaryot cells, to contribute to the application of immunization technology with nucleic acids in leishmaniasis. To show the expression genomic library in the muscles of mice immunized with it, the indirect immunofluorescence technique was used. A mix of sera with high antileishmania titers from an area where *L.braziliensis* infection is predominant was used as primary antibody. A library of 80% recombinant clones was obtained. Antigen determinant expression was confirmed in immunized BALB/c mice's muscles, according to the results of immunofluorescence testing.

Subject headings: IMMUNIZATION/methods; NUCLEIC ACIDS/immunology; GENOMIC LIBRARY; FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE, INDIRECT; ANIMALS, LABORATORY; MICE, INBRED BALB/C/immunology; LEISHMANIA MEXICANA; LEISHMANIASIS/immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Informe de un Comité de Expertos. Luchas contra las leishmaniasis. Serie de Informes Técnicos; 793. Ginebra, 1990.
2. Grimaldi GJ, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiologic of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41:687.

3. Marsden PD, Jones TC. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. En: KP, Chang Leishmaniasis RS, Bary RS ed. Elseviers Science. Publishers, Amsterdam: 1995:183.
4. Greenblatt CL. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. En: New development with human and veterinary vaccines. New York: Alan R. Liss, 1980:259.
5. Grimaldi GJ. Meetings on vaccine studies towards the control of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995;90:553-6.
6. Davis HL, Michael LM, Mancini M, Schleeff M, Whalen RG. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen vaccine 1994;12:1503-9.
7. Ulmer JB. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993;259:1745-9.
8. Shiver IW, Perry HC, Davies ME, Fred DC, Liu MA. Cytotoxic T lymphocyte and helper T responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann N Acad Sci* 1995;772:198-208.
9. Barry AM, Lai WC, Johnston AS. Protection against mycoplasma infection using expression library immunization. *Nature* 1995;377:632-5.
10. Xu D, Liew FY. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 1994;12:1534-7.
11. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Parasitol* 1997;186(7):1377-47.
12. Hoffman SL, Sedegah M, Hedstrom RC. Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelli* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine* 1994;12:1529-33.
13. Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A, et al. Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunized with an expression genomic library of *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 1998;(16)6:608-12.
14. Piedrafita D, Xu D, Heenter RA, Harrinson F, Liew FY. Protective immune response induced by vaccination with an expression library of *L. major*. *J Immunol* 1999;163:1467-72.
15. Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring: Harbor Laboratory Press 1989:1,2-6,34.
16. Webster RG, Fynan EF, Santoro JC, Robinson H. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 1994;12:1495-8.
17. Ulmer JB, Deck RR, Witt MC, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MM. Protective immunity by intramuscular injection of low dosed of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 1994;12:1541-4.
18. Pardo OL. La inmunización con ADN. Una nueva generación de vacunas. *Biotechnol Aplic* 1996;(13):81-8.
19. Wain GJ, McManus DP. Nucleic acids. Vaccine of the future. *Parasitol Today* 1995;11:113-6.

Recibido: 6 de noviembre del 2000. Aprobado: 30 de abril del 2001.

Lic. *Ana Margarita Montalvo Álvarez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado 601, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: amontalvo@ipk.sld.cu