

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"

Evaluación de la respuesta inmune humoral por *western blot* en ratones inmunizados con una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*

Dr. Esteban Alberti Amador,¹ Lic. Ana M. Montalvo Álvarez,² Dra. Aniran Ruiz Espinosa,³ Lic. Rocío García Miniet,⁴ Lic. Máximo B. Martínez Benítez,⁵ Dra. María E. Sarmiento García⁶ y Dr. Armando Acosta Domínguez⁷

RESUMEN

Se construyó una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi* con la utilización como vector el plásmido pcDNA3, con la cual se inmunizaron ratones de la línea isogénica BALB/c por vía intramuscular. Se empleó un grupo control positivo al que se le administraron antígenos solubles de *T. cruzi* y otro grupo que recibió el plásmido utilizado para la construcción de la biblioteca genómica; un grupo no recibió inmunización. A todos los animales se les extrajo sangre del plexo retroorbital 2 semanas posteriores a la tercera inmunización, para estudiar la respuesta de anticuerpos específicos contra los antígenos solubles del parásito mediante la técnica de *western blot*. Se obtuvo una respuesta de anticuerpos en los animales inmunizados con la biblioteca genómica de expresión y con antígenos solubles del parásito.

DeCS: BIBLIOTECA GENOMICA; RATONES CONSANGUINEOS BALB C/inmunología; ANIMALES DE LABORATORIO; WESTERN BLOTTING/métodos; ANTIGENOS DE PROTOZOARIOS/inmunología; TRYPANOSOMA CRUZI/inmunología; FORMACION DE ANTICUERPOS; VACUNAS DE ADN.

La inmunización con ADN es una tecnología surgida a principios de los años 90, que consiste en introducir, mediante inyección, moléculas de ADN, generalmente plasmídico, que contienen genes de algún patógeno específico y que al ser expresados en el tejido donde fue inoculado inducen una respuesta inmune, que en ocasiones puede conducir a la protección contra la enfermedad (Chinchuteck K. Safety and regulatory aspects of nucleic acid vaccination En: Symposium "New trends in molecular Biotechnology: basic and applied aspects". Louvain-La-Nueve. September, 1995).^{1,2}

Esta tecnología promete candidatos vacunales de fácil manipulación y bajo costo de producción, que combinen las ventajas de las vacunas de subunidades y la eficacia de las vacunas de vectores vivos.^{3,4} Todo esto permitiría la prevención de enfermedades virales y parasitarias sin correr los riesgos de las vacunas vivas, ya sea la reversión a la virulencia o el posible desencadenamiento de infecciones mortales en huéspedes inmuno-deprimidos, por citar algunos.^{5,6}

El desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas frente a parásitos, entre ellos

¹ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

² Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. IPK.

³ Máster en Parasitología. Especialista de I Grado en Parasitología. IPK.

⁴ Licenciada en Bioquímica. Profesora Instructora. Universidad de Granma.

⁵ Licenciado en Radioquímica. Aspirante a Investigador. IPK.

⁶ Especialista de II Grado en Fisiología y Patología. Investigador Titular. Instituto Finlay.

⁷ Especialista de II Grado en Inmunología. Investigador Titular. Instituto Finlay.

Trypanosoma cruzi, continúa siendo un reto para los investigadores de todo el mundo. El desarrollo de candidatos vacunales contra este, a través de la caracterización de genes que codifican antígenos que estimulan inmunidad protectora, y su transferencia a vectores establecidos no ha sido posible, pues la caracterización de genes que codifican proteínas con capacidad inmunoprotectora es una tarea aún en desarrollo.^{7,8}

Con el objetivo de desarrollar esta novedosa estrategia y profundizar en el estudio de los mecanismos inmunológicos estimulados por este tipo de vacunas, los autores de este trabajo se propusieron construir una biblioteca genómica de *T. cruzi* en un vector de expresión en células eucariotas y evaluar por el método de *western blot* la respuesta humoral específica inducida en ratones de la línea isogénica BALB/c, inmunizados por vía intramuscular con esta construcción genética.

MÉTODOS

CEPAS PARASITARIAS

Se utilizaron epimastigotes de la cepa Y (CT-10C 106) de *T. cruzi* donada gentilmente por la doctora María Auxiliadora de Sousa, Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil.

CEPAS BACTERIANAS

Escherichia coli (*E. coli*) XL-1 blue: F[']: Tn10 proA⁺B⁺ lacI⁸ ^ (lacZ) M15/recA1 end A1 gyrA96 (Nal^r) thi hsd r17 (r_k m_k⁻) supE44 relA1 lac (stratagene).

PLÁSMIDO

Se empleó el vector comercial pcDNA3 (vector de expresión en células superiores, suministrado por la firma Invitrogen, EE.UU.).

ANIMALES

Se emplearon un total de 20 ratones machos, de la 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, Cuba).

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN

Se emplearon las enzimas de restricción Sau3A, Bam HI y Eco RV así como las enzimas T4 ligasa y la fosfatasa alcalina y el patrón de peso molecular (PPM) IV, todos suministrados por la firma *Boehringer Mannheim Biochemica* (RFA), y utilizados según las instrucciones del fabricante.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se inoculó una colonia de *E. coli* XL-1 blue en un precultivo de 5 mL de medio Luria Bertaini con tetraciclina (Lb_T) (medio Luria-Bertaini: triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L) pH 7,5 y se incubaron a 37 °C con agitación (*incubator shaker*, Co, EE.UU.) a 200 rpm. A partir del precultivo crecido se sembró 1 µL/mL en un erlenmeyer con 200 mL de medio LB_T y se incubó a 37 °C con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 660 nm en un espectrofotómetro (*Ultrospec III Pharmacia LKB*). El cultivo crecido se dejó reposar en baño de agua helada durante 30 min y se centrifugó a 600 g por 30 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (MLW K23D VEB MLW MEDIZINTECHNIK, Alemania). El precipitado celular fue lavado 2 veces con agua destilada estéril fría (4 °C) y 2 con glicerol 10 % (*Pharmacia*). Todas las centrifugaciones se realizaron con iguales condiciones. Finalmente el precipitado celular se resuspendió en la solución de glicerol 10 % y se distribuyó en alícuotas de 80 µL que fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de realizar la transformación genética.

PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA

La técnica se realizó según *Maniatis*⁹ con algunas modificaciones. Cada clon de *E. coli* escogido fue inoculado en un precultivo de LB suplementado con los antibióticos de selección escogidos y se dejó crecer a 37 °C, con agitación durante 16 h, luego se centrifugó a 35 000 rpm a 4 °C por 10 min. A continuación el botón celular se resuspendió en 1 mL de tris-EDTA (TE) (tris 10 mmol, EDTA 1 mmol, pH 8) pH 8; frío y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante con micropipetas y se resuspendió

el *pellet* en 100 μ L de Liso I (tris 25 mmol, EDTA 10 mmol, glucosa 50 mmol, pH 8) frío. Se colocaron los viales 5 min en hielo y se añadieron 200 μ L de Liso II (NaOH 0,2 mmol, SDS 1 %) recién preparado, posteriormente se añadieron 150 μ L de KAc 5/3 (acetato de potasio 5 mmol, ácido acético 3 mmol) se dejó reposar en hielo durante 5 min y se centrifugó 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante se depositó en otro tubo y se añadieron 450 μ L de fenol-cloroformo (v:v), se agitó y centrifugó 10 min a 10 000 rpm. La fase acuosa se depositó en viales nuevos y se adicionaron 800 μ L de etanol absoluto frío y se dejó precipitar 1 h a -20°C . A continuación se centrifugó 15 min a 14 000 rpm, se lavó el botón celular con 900 μ L de etanol 70 % y se centrifugó. Por último los tubos se secaron al vacío (DNA Mini. Hote. Denmark) durante 3 min. Se resuspendió el precipitado en 20 μ L de tampón TE estéril y se guardó a -20°C . Los resultados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 %.

PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DE *T. CRUZI*

El ADN genómico de *T. cruzi* fue obtenido de las formas epimastigóticas del parásito según el método de *Hookey*.¹⁰ El cultivo inactivado con formaldehído tamponado 0,5 % se centrifugó a 5 000 rpm y 4°C durante 20 min. Se resuspendió en 1 mL de TE para luego centrifugarlo 15 min a 3 500 rpm y 4°C . Se tomaron 10^9 epimastigotes que fueron resuspendidos en tampón lisis e incubados 2 h a 56°C . Seguidamente se procedió a realizar varias extracciones del ADN con fenol-cloroformo (v:v) hasta que la interfase se hizo imperceptible. Se precipitó con un décimo del volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento obtenido fue resuspendido en tampón TE estéril que se dejó toda la noche para que se despegara. La integridad del ADN obtenido fue chequeada por electroforesis en gel de agarosa 0,8 %.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se llevó a cabo según el protocolo propuesto por *Maniatis*.⁹ Los geles de agarosa se prepararon a 0,8 % con la utilización de agarosa N.A (Pharmacia) y tampón de corrida tris-borato-EDTA

(TBE) (tris base 0,004 mol, ácido bórico 0,01 mol EDTA 0,5 mol pH8) 0,5 x adicionándole bromuro de etidio a una concentración final de 5 μ L/100 mL.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

La concentración de ADN se determinó espectrofotométricamente según lo recomendado por *Maniatis*⁹ con un cuantificador automático de ADN y ARN, *gene quant* (Pharmacia Biotech England).

DIGESTIONES ANALÍTICAS

En todas las digestiones las enzimas de restricción se utilizaron a una concentración de 1 U/ μ g de ADN, los tampones empleados fueron los recomendados por *Boehringer Mannheim Biochemica* para la máxima actividad enzimática y la concentración del ADN fue de 50-100 ng/ μ L en volúmenes finales de 20 μ L. Las mezclas de reacción fueron incubadas en baño térmico durante 1 h a 37°C .

DIGESTIONES PREPARATIVAS

Las digestiones preparativas se realizaron en las mismas condiciones que las analíticas pero con sus componentes en mayor cantidad. Se digirieron 10 μ g de ADN genómico de *T. cruzi* con la enzima Sau3A, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 5-1,8 pb, y fue comprobado por electroforesis en gel de agarosa 0,8 % con la utilización del patrón de peso molecular (PPM) IV. Se digirieron 10 μ g del vector con la enzima BamH I y fue comprobado de la misma manera. Fueron resuspendidos en un volumen final de 30 y 40 μ L el vector y el ADN respectivamente.

DESFOSFORILACIÓN DE LOS EXTREMOS 5'DEL VECTOR

La reacción de desfosforilación se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ L. Se empleó 1 U de enzima fosfatasa alcalina, por cada 50 pmol de extremos a desfosforilar del plásmido pcDNA3. La mezcla de la reacción se incubó a 37°C durante 1 h.

REACCIÓN DE LIGAZÓN

Se tomaron 1,5 µg de fragmentos de ADN genómico de *T. cruzi* y 800 ng del plásmido pcDNA3 que había sido previamente desfosforilado. Los fragmentos a ligar en cada caso fueron colocados en tubos de microcentrífuga con una relación vector-inserto de 1:3. Las reacciones de ligazón fueron realizadas con el empleo de 1 U de T4 DNA ligasa en 10 µL de volumen final a temperatura de 14 °C durante 16 h. Por último, la ligasa fue inactivada en un baño a 65 °C durante 10 min.

ELECTROPORACIÓN

A las cubetas de electroporación, enfriadas previamente, se les añadieron 80 µL de células más 20 ng del plásmido o la ligazón. Posterior a este paso se le dio el golpe eléctrico con los parámetros reportados para *E. coli* (2 500 V; 21 µF y 400 Ω (Recomended Procariotic Protocol. IBI gene Zarpper 450/2500 Electroporation System Cat No. 9100)). Se adicionó entonces 1 mL de LB y se dejó crecer durante 1 h a 37 °C; a 80 rpm y de esta mezcla se sembró en medio sólido y líquido suplementado con los antibióticos de selección.

PORCENTAJE DE RECOMBINANTES

Para la determinación del porcentaje de recombinantes presentes en la librería se sembraron en una placa 20 µL de la transformación y se seleccionaron al azar 10 colonias, de las cuales se purificó el ADN plasmídico que fue sometido a análisis de restricción con la enzima EcoRV. El porcentaje de recombinantes se calculó de la forma siguiente:

$$\text{Porcentaje de recombinantes} = \frac{\text{Número de clones recombinantes} \times 100}{\text{Número de colonias ensayadas}}$$

PURIFICACIÓN MASIVA DE ADN PLASMÍDICO

Para llevar a cabo la purificación de la biblioteca genómica se sembró todo el producto de la transformación genética de *E. coli* en 500 mL del medio LB con el antibiótico de selección

(ampicilina) y se dejó crecer a 37 °C, durante 16 h. Posteriormente se centrifugó a 3 500 rpm durante 10 min, a 4 °C y el sedimento se resuspendió en 10 mL de tampón lisis (tris HCL 100 mmol, pH-8, EDTA 100 mmol, SDS 2 %, NaCL 150 mmol y proteinasa K 200 µg/mL) y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 20 mL de Liso II, y se incubó en hielo durante 10 min. A continuación se adicionaron 18,7 µL de solución de KAc, pH 4,8, se mezcló cuidadosamente y se matuvo 20 min en hielo. Se centrifugó durante 15 min a 12 500 rpm a 4 °C. A continuación se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente.

Se centrifugó 10 min a 10 000 rpm y las células se resuspendieron en 500 µL de tampón TE, se adicionaron 3 µL de RNAasa (10 µg/µL) y se incubó durante 30 min a 37 °C. A continuación se añadió igual volumen de fenolcloroformo (v:v) que se mezcló con ayuda de vortex, se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm durante 10 min. Este paso se repitió 2 veces, se tomó en cada uno la fase acuosa y se desechó el resto. Después se realizó un lavado con cloroformo isoamílico 24:1 y al botón celular obtenido después de la centrifugación, se le agregó etanol absoluto, se mezcló e incubó a -20 °C por 1 h.

Por último se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante. El botón de ADN se lavó con etanol 70 %, se centrifugó en iguales condiciones y el sedimento se secó al vacío durante 5 min y se resuspendió en 1 mL de agua destilada. Se realizó la lectura a 260 y 280 nm de una dilución adecuada del ADN, obtenido en un espectrofotómetro para calcular la concentración y el grado de pureza de este.

OBTENCIÓN DEL SONICADO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Los epimastigotes de la cepa Y (CI-IOC 106) a una concentración de 10⁹ fueron mantenidos en medio de cultivo de infusión de hígado-triptosa suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (Gibco) y 50 µg/mL de gentamicina, durante 7 d.¹¹ Seguidamente estas células fueron cosechadas por centrifugación y lavadas 4 veces con solución salina tamponada con fosfato (SSTF) (NaCl 8 g/L, KCl

0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,2) a 400 g durante 10 min a 4 °C. Después el botón celular obtenido fue resuspendido en 5 mL de SSTF y sonificado con una intensidad de 18 Hz (Soniprep 120, *England*) por 3 veces durante 60 s con intervalos de reposo de 60 s en hielo. Por último, el homogenizado fue centrifugado a 1 200 g durante 1 h a 4 °C y el sobrenadante fue distribuido en viales y conservado a - 70 °C. Más tarde se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.¹²

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

Los animales se dividieron en 4 grupos distribuidos de la forma siguiente:

- L: Grupo inmunizado con la biblioteca genómica de *T. cruzi* (n = 5).
- T: Grupo inmunizado con antígenos solubles de *T. cruzi* (n = 5).
- P: Grupo inmunizado con el plásmido pcDNA3 (n = 5).
- C: Grupo no inmunizado (n = 5).

DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Se administraron 50 µg de inóculo en cada caso en 0,1 mL de solución salina 0,9 % por vía intramuscular en la región anterior de la pata trasera derecha, con excepción del grupo C que no recibió inmunización.

REINMUNIZACIONES

Se realizaron 2 reinmunizaciones cada 2 semanas con la misma dosis y vía de administración.

WESTERN BLOT

El sonificado de *T. cruzi* fue sometido a electroforesis (SDS-PAGE)¹³ en una cámara electroforética Bio Rad, (EE.UU.) acoplada a una fuente *Multidrive, Pharmacia*, (Suecia). Para esto se prepararon las muestras en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol y se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 5 min. Las proteínas contenidas en el sonificado de *T. cruzi*

fueron separadas electroforéticamente de acuerdo con sus respectivos pesos moleculares; para esto se empleó un gel 12,5 % de acrilamida, y se realizó la electroforesis a un voltaje constante de 120 V.

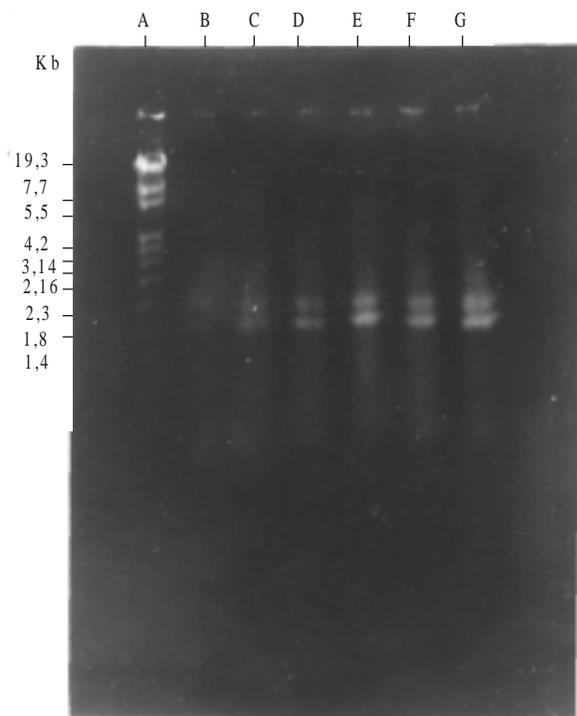
El patrón de peso molecular empleado en la electroforesis fue el juego de marcadores cuyo rango de peso molecular es de 14-70 kD, (Sigma, EE.UU.) y que fue sometido a las mismas condiciones de las muestras. Una vez concluida la electroforesis se procedió a hacer la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, con la utilización para esto de un equipo de transferencia húmedo (Bio Rad, EE.UU.) y tampón tris (25 mmol)-glicina (125 mmol) pH 8,2, que contenía 20 % de metanol. La electrotransferencia se realizó con la aplicación de una corriente de 300 mA durante 1 h. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche descremada 2 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave en zaranda *Janke & Kumkel IKA-Labortechnik*, RFA.

Se cortaron las tiras correspondientes a cada uno de los puntos de aplicación, con el objetivo de incubar por separado cada una de las muestras de suero de los 4 grupos contemplados en el esquema de inmunización. Las muestras de suero se diluyeron 1/100 en leche descremada 1 %, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Seguidamente se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó 1 h con un conjugado de inmunoglobulinas de conejo anti IgG de ratón marcado con peroxidasa (sigma) a una dilución de 1/ 2000, luego se realizaron otros 3 lavados con PBS y se reveló con peróxido de hidrógeno como sustrato y 4-cloro-1-naftol (sigma) como elemento cromógeno. Transcurridos 15 min la reacción se detuvo y se lavaron las tiras de nitrocelulosa con agua destilada.

RESULTADOS

Como resultado de la purificación del ADN genómico de *T. cruzi* se obtuvieron 40 µL a una concentración de 1 µg/µL. En la figura 1 (B,C) se muestran los resultados de las digestiones analíticas realizadas con la enzima Sau3A, y los patrones de bandas que se obtuvieron a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min, respectivamente). Las

tallas de los fragmentos obtenidos se encontraban en un rango de 5-1,8 kb. En corridas electroforéticas anteriores se pudo observar la integridad del genoma sin digerir, lo que indicó la ausencia total de nucleasas inespecíficas en la preparación.



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

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

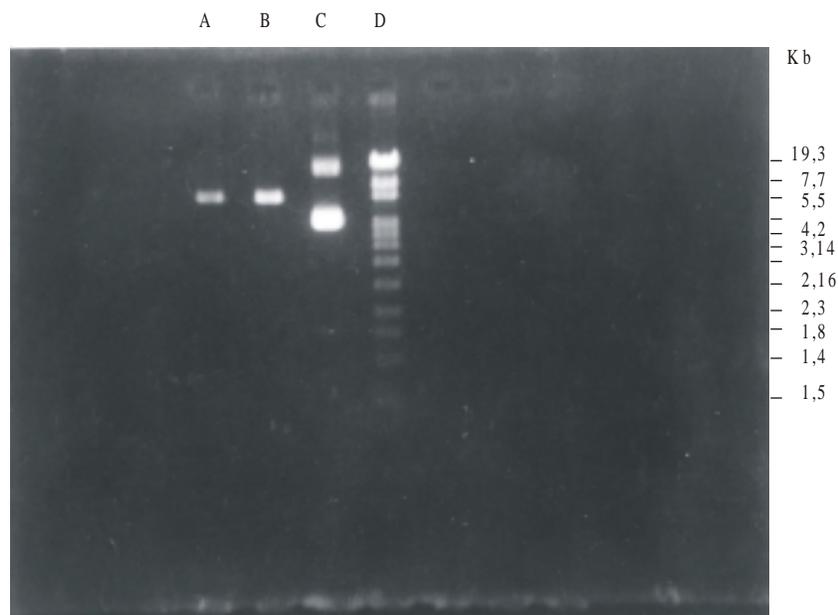
La figura 2 muestra la purificación del plásmido pcDNA3 del cual se obtuvieron 200 μ L a una concentración final de 14,58 μ g/ μ L, analizado en una electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Se pueden detallar las configuraciones correspondientes al plásmido nativo con predominio de la forma superenrollada y ausencia de ARN (línea C). Una muestra de las digestiones realizadas con la enzima Bam HI durante la preparación de los vectores para la construcción de la biblioteca puede ser observada también (línea B), el vector linealizado (5,446 kb) que ha migrado

muy cerca del patrón de peso molecular empleado. A continuación (línea A) puede observarse el resultado de la desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina, encargada de impedir la recirculación de los plásmidos al eliminar sus grupos fosfatos de los extremos 5'. 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.

En la figura 3 se observa el resultado obtenido del análisis de restricción realizado con la enzima Eco RV, a 10 de los plásmidos purificados de los transformantes obtenidos después de la obtención de la biblioteca. Como resultado de este experimento se observaron 8 clones con insertos de ADN de *T. cruzi* entre los 10 clones seleccionados (80 %), líneas 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 con vectores no recombinantes (línea 6).

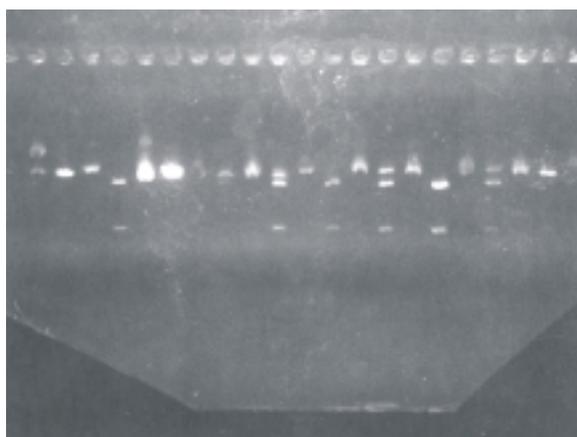
En relación con los resultados obtenidos en la evaluación de la respuesta inmune humoral frente a antígenos solubles de *T. cruzi* con la utilización del método de *western blot*, 2 semanas después de la tercera inmunización (fig. 4), se pudo observar el reconocimiento de diferentes bandas, con tallas que oscilaban en un rango aproximado entre 55 hasta 25 kDa, por los animales inmunizados con la biblioteca genómica (L1, L2, L3, L4, L5). Todos los animales reconocieron una banda de casi 55 kDa, algunos animales (L1 y L3) reconocieron además una banda de aproximadamente 45 kDa, mientras que un animal reconoció adicionalmente una banda con talla aproximada de 25 kDa (L3).

Al analizar la respuesta contra antígenos solubles de *T. cruzi* en el suero de los animales inmunizados con el vector y en el suero de los animales no inmunizados, considerados ambos grupos como controles negativos, no se observó reactividad. Como era de esperar, los sueros de los animales inmunizados con los antígenos solubles de *T. cruzi* fueron reactivos y se reconoció una diversidad de bandas correspondientes a un amplio rango de pesos moleculares.



Línea A: pcDNA3 desfosforilados, B: pcDNA3 digerido con BamH1, C: pcDNA3 nativo, D: patrón de peso molecular.

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



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 *Trypanosoma cruzi*; Línea 6: plásmido sin inserto.

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

DISCUSIÓN

Obtención de la librería genómica de expresión de Trypanosoma cruzi

El resultado del análisis de restricción de los recombinantes obtenidos después de la transformación genética de *E. coli* con la biblioteca

genómica de expresión de *T. cruzi*, permitieron demostrar que en el inóculo que se administró había una elevada cantidad de material genético de *T. cruzi*. Esto se evidenció por la presencia de bandas con tallas superiores e inferiores a las del plásmido utilizado en la construcción de la biblioteca, al ser digerido con la enzima de restricción EcoRV. En trabajos anteriores, este grupo de trabajo obtuvo resultados similares con la misma metodología.^{6,14}

Las características del plásmido utilizado no permitieron usar uno de los métodos simples para el análisis de este aspecto.⁹ lo que limitó el número de colonias analizadas; no obstante si este resultado fuera un reflejo de la proporción de recombinantes en la biblioteca, indicaría una elevada representatividad del genoma de *T. cruzi* en el inóculo. Esto elevaría las probabilidades de lograr una respuesta inmune específica detectable y protección, pero haría más compleja la identificación precisa de el o los genes relacionados con la protección; mientras que, una reducida representatividad limitaría las posibilidades de inducir protección aunque facilitaría encontrar los genes responsables, si esta se produjera. Por lo tanto, dentro de ciertos límites, la proporción de recombinantes en la biblioteca no constituiría, y de hecho no constituyó, uno de los elementos limitantes en esta fase del trabajo.

De izquierda a derecha: Patrón de peso molecular: PM; Línea 2: suero de ratones inmunizados con antígenos solubles de *Trypanosoma cruzi* (C+); Línea 3: suero de ratones no inmunizados (C-); Línea 4: sueros de ratones inmunizados con el plásmido (CP); Líneas 5-9: suero de ratones inmunizados con la biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi* (L1-L5).

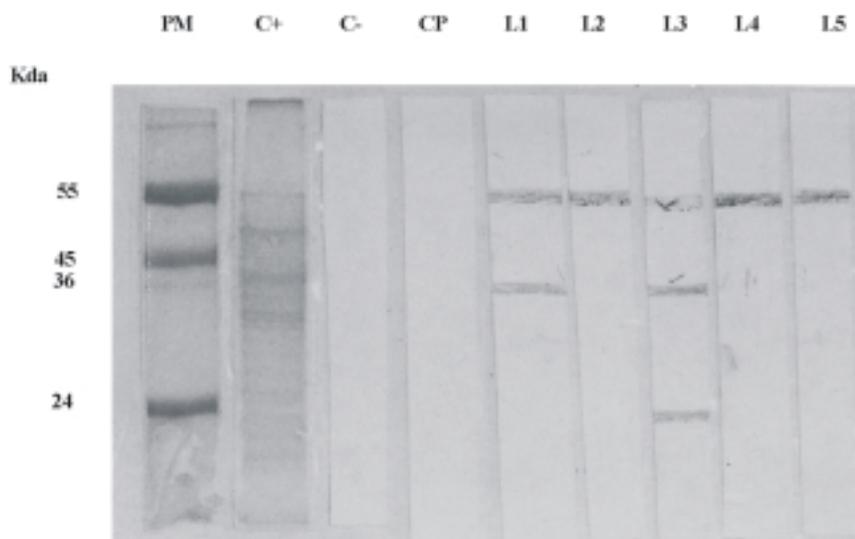


Fig. 4. Western blot. Reactividad de los sueros de ratones BALB/c inmunizados contra antígenos solubles de *Trypanosoma cruzi*.

Evaluación de la respuesta inmune humoral en los ratones inmunizados con la biblioteca genómica mediante la técnica del western blot

Al evaluar la respuesta inmune humoral mediante la técnica del *western blot* en los diferentes grupos de estudio, se pudo confirmar la reactividad de los sueros de los animales inmunizados con la biblioteca genómica. Se demostró que las respuestas encontradas en los animales inmunizados con esta construcción genética estuvieron dirigidas contra los productos de los genes de *T. cruzi* representados en esta y no contra productos codificados por genes presentes en el vector (fig. 4), pues en ninguna de las determinaciones realizadas se mostró respuesta en los sueros de los animales inmunizados con el vector pcDNA3.

Las variaciones de la respuesta observada entre distintos animales (fig. 4), e incluso en el mismo animal en diferentes momentos del esquema de inmunización (datos no mostrados), reflejan la composición diferente, en cuanto a genes de *T. cruzi* se refiere, en los distintos inóculos suministrados a los diferentes animales; porque si bien la dosis de ADN fue la misma, la composición de cada inóculo, en cuanto a fragmentos de ADN de *T. cruzi* debió ser diferente por tratarse de una

biblioteca genómica y no de genes individuales bien definidos como los utilizados en otros trabajos.^{15,16} No obstante, se apreció un reconocimiento preferencial de la banda de 55 kDa, lo que pudiera estar en relación con una elevada inmunogenicidad de esta proteína, unido a una alta representatividad del gen correspondiente en la biblioteca genómica. Esta proteína reconocida por el suero de todos los animales, pudiera corresponder con una cisteína proteinasa, a la cual se le ha demostrado una alta inmunogenicidad.¹⁷

En relación con el limitado número de bandas reconocidas por el suero de los animales inmunizados con la biblioteca genómica, entre otros factores, pudiera estar influido por la no expresión de todos los antígenos, porque no todos los plásmidos recombinantes contienen fragmentos de ADN posibles a expresar, ya que para esto sería necesario la presencia de un ATG lo suficientemente cercano al promotor de citomegalovirus (CMV) presente en el vector de expresión, sin que existan secuencias que ocasionen la terminación prematura de la transcripción. Además, también es un hecho fortuito cuáles de las moléculas de ADN de las inyectadas son exitosamente transfectadas en la célula blanco, pues esto condiciona después la expresión de antígenos, los que aunque expresados, no necesariamente son inmunogénicos y en caso

de serlo, los anticuerpos reaccionantes contra estos pudieran no ser detectados por *western blot* porque no se evidenciarían los que reaccionan contra epitopes conformacionales.

En este análisis también es necesario tener en cuenta la dosis empleada para la inmunización (50 µg), que pudiera considerarse baja si se tiene en cuenta que el inmunógeno no es homogéneo, aunque las dosis comúnmente empleadas para genes individuales oscilan en un amplio rango en dependencia de la vía y el método de inmunización empleado y la especie animal.¹⁸

Otro factor importante a señalar es que en la preparación de antígenos solubles del parásito utilizada en el *western blot*, no están representados todos los antígenos del microorganismo, mientras que teóricamente en la biblioteca genómica deben estar representados todos los genes del microorganismo, por lo que un grupo de respuestas inducidas en los animales pudo no haber sido detectada.

Sería interesante en trabajos futuros inmunizar distintos grupos de animales con fracciones diferentes de la biblioteca genómica, para determinar el patrón de reconocimiento antigénico tanto celular como humoral, así como llevar a cabo estudios de reto que permitan identificar de forma precisa los genes que codifican inmunógenos con una elevada capacidad protectora.

La vacuna de ácidos nucleicos representa una efectiva y novedosa forma de expresión de antígenos *in vivo* que genera respuestas inmune humorales y celulares contra antígenos virales, bacterianos y parasitarios.^{18,19} Esta tecnología promete ser una nueva herramienta en la inmunización para el control de las enfermedades. Sin embargo, no se puede afirmar que esta sea la solución para este problema; existen argumentos tanto a favor como en contra de la posible aplicación en seres humanos.¹⁸ Hasta el momento, basta con saber, que la inmunización con ácidos nucleicos permite, de forma práctica, la búsqueda de nuevos antígenos potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas de nueva generación.

SUMMARY

An expression genomic library of *Trypanosoma cruzi* was built by using plasmid pc DNA3 as a vector. This

library served to immunize by intramuscular administration BALB/c inbred mice. A positive control group to which *T. cruzi* soluble antigens were administered and other group which was given the same plasmid used for the building of the genomic library were included in this study; another group was not immunized. Blood was extracted from the retroorbital plexus of all the mice two weeks after the third vaccination so as to study the specific antibody response to soluble parasite antigens through the Western Blot technique. The antibody response was shown in animals immunized with the expression genomic library and with soluble parasite antigens.

Subject headings: GENOMIC LIBRARY; MICE, INBRED BALB C/immunology; ANIMALS, LABORATORY, WESTERN BLOTTING/methods; ANTIGENS, PROTOZOAN; TRYPANOSOMA CRUZI/immunology; ANTIBODY FORMATION; VACCINES, DNA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rhodes GH, Dwarki VJ, Abai A, Felgner J, Felgner PL, Gromkowski SH et al. Injection of expression vectors containing viral genes induces cellular, humoral and protective immunity. En: Ginsberg HS, Brown F, Chanock RM, Lerner RA, eds. Vaccines 1993. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993:137-41.
- Danko I, Wolff JA. Direct gene transfer into muscle. Vaccine 1994;12:1499-502.
- Spier RE. Meeting on vaccine strategies for tomorrow. Vaccine 1993;11:1450-2.
- Waine GJ, Mc Manus DP. Nucleic acids: vaccine of the future. Parasitol Today 1995;11:113-6.
- Manickan E, Karem KL, Rouse BT. DNA vaccines – A modern Gimmick or a boon to vaccinology. Immunology 1997;17:139-54.
- 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 Trypanosomic cruzi. Vaccine. 1998;(16):6:608-12.
- Fouts DL, Ruef BJ, Ridley PT, Wrightsman RA, Peterson DS, Manning JE. Nucleotide sequence and transcription of a trypomastigote surface antigen gene of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol 1991;46:189-200.
- Parodi AJ, Pollevick GD, Mautner M, Buschiazzo A, Sanchez DO, Frasch ACC. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of Trypanosoma cruzi. EMBO J 1992;11:1705-10.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1989:1.2-6.34.
- Hookey JV, Palmer MF. A comparative investigation and identification of Leptospira interrogans serogroup icterohaemorrhagiae strains by monoclonal antibody and fingerprint analysis. Zbl Bakt 1991;275:185-99.
- Camargo EP. Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. I origin of metacyclic trypansomes in liquid medium. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1964;6:93-100.
- Lowry DH, Rosebrogh NJ, Farr AL, Randal LJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

13. Tsang VC, Peralta JM, Simons AR. Enzyme linked immunotransfer blot technique (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1983;92:377-91.
14. Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Fachado A, Vidal T. *et al.* Respuesta humoral específica en ratones BALB/c inmunizados con una librería genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Cubana Med Trop* 1999;51:620-5.
15. 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.
16. Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martínez D *et al.* Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of vectors. *DNA Cell Biol* 1993;12:777-83.
17. Scharfstein JM, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendocapreviato, Miles M. *Trypanosoma cruzi* characterization and isolation of 57/51 M.W surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and blood stream trypomastigote. *J Immunol* 1986;137:1336-41.
18. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shever JW, Leu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:617-48.
19. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgener PL, Dwarki VJ *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-9.

Recibido: 18 de septiembre del 2000. Aprobado: 27 de febrero del 2001.

Dr. *Esteban Alberti Amador*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico:estebana@ipk.sld.cu