

Vacunación en leishmaniasis. Gp46 de Leishmania amazonensis LAISON y SHAW, 1972 como antígeno protector

POR LUIS RIVAS *

Resumen

En el presente trabajo se revisan brevemente los aspectos generales de *Leishmania* ROSS, los métodos de control de la enfermedad, y el desarrollo de la vacunación en dicha enfermedad. Se describe a continuación las diferentes etapas que han conducido a la definición de Gp46, una glucoproteína específica de estado aislada de la membrana plasmática de los promastigotes de *L. amazonensis*, LAISON y SHAW como antígeno capaz de producir una respuesta inmune protectora en animales de experimentación, tanto por anticuerpos monoclonales dirigidos contra ella, como por inoculación de la misma con diferentes adyuvantes. Gp46 es una molécula anclada a la membrana por una estructura de glucosil fosfatidilinositol; es una proteína altamente resistente a la proteólisis y contiene una única cadena de oligosacárido. La secuencia de Gp46 no muestra ninguna similitud con otras proteínas descritas. Los experimentos de vacunación de animales de laboratorio utilizando Vaccinia que contiene el gen de Gp46 insertado en su genoma y capaz de expresar la proteína en animales infectados con el virus, provoca inmunidad protectora contra la leishmaniasis.

Summary

This paper describes briefly the main aspects of *Leishmania* and its relationship with the host, the control methods for leishmaniasis, especially focused on the development of vaccination. This work also deals with the different steps of definition of Gp46, a stage specific plasma membrane glycoprotein isolated from *Leishmania amazonensis* LAISON AND SHAW promastigotes, as an antigen able to elicit a protective immune response in laboratory animals by specific monoclonal antibodies raised against this protein and by inoculation of Gp46 with different adjuvants. Gp46 is anchored to the membrane by a glycosylphosphatidylinositol structure. The molecule is very resistant to proteolytic degradation and has only one oligosaccharide chain. The sequence does not show similarities with any other known proteins. The infection of mice with Gp46 recombinant Vaccinia virus produces the expression of Gp46 in mice and also protective immunity against infection with *Leishmania* promastigotes.

1. Introducción

1.1.- *Leishmania* y su relación con el hospedador.

La leishmaniasis se cuenta entre las principales enfermedades tropicales tanto por su incidencia, cifrada aproximadamente en once a doce millones de personas, como en el número de personas que viven en zonas endémicas y se encuentran expuestas a la enfermedad (O.M.S., 1991).

* Centro de Investigaciones Biológicas. Madrid.

La enfermedad es producida por infección con las diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*, ROSS. Las diferentes manifestaciones patológicas presentan un amplio espectro, desde leishmaniasis cutáneas con alta frecuencia de autocuración, producidas por las especies agrupadas en el complejo *major*, leishmaniasis mucocutáneas del complejo *braziliensis*, o las especies responsables de las leishmaniasis viscerales, pertenecientes al complejo *donovani*. Factores genéticos del paciente y su estado inmunológico hacen variar considerablemente el cuadro clínico, especialmente en la asociación *Leishmania* -SIDA, debido al carácter oportunista del parásito (Alvar, 1989).

La distribución geográfica de *Leishmania* ROSS comprende fundamentalmente las zonas tropicales y subtropicales, alcanzando incluso zonas templadas, tales como cuenca mediterránea, próximo y medio Oriente y zona sur de China (O.M.S., 1990).

El ciclo del parásito comprende dos formas principales, el promastigote o forma flagelada, que vive y se reproduce en el interior del tubo digestivo del vector invertebrado o flebotomo, migrando posteriormente a la trompa, donde se transforma en promastigote metacíclico, y es inoculado conjuntamente con la saliva en el interior de huésped vertebrado; el parásito es fagocitado por células del sistema retículoendotelial, mediante reconocimiento por receptores del macrófago CR1 y CR3 del C3b y C3bi del sistema de complemento fijados sobre la superficie del parásito (Russell y Talamás-Rohana, 1989), así como de componentes de la membrana externa de la superficie de promastigote por integrinas de la familia de LFA-1 (Talamás-Rohana et al., 1990). El parásito es incluido en una vacuola parasitófora que posteriormente fusiona con lisosomas donde se transforma en amastigote o forma flagelada, con cambios tanto morfológicos, antigénicos y metabólicos. El amastigote continúa su división hasta la lisis de la célula y liberación consecuente de los amastigotes que infectan nuevos macrófagos. El ciclo se completa por la ingestión por el flebotomo de sangre que contiene macrófagos infectados, que se lisan en el tubo digestivo, donde los amastigotes vuelven a transformarse en promastigotes (Chang et al., 1985).

La supervivencia de *Leishmania* ROSS en el interior del macrófago es uno de los casos más sorprendentes de adaptación a un hábitat hostil originado por los mecanismos de producción de metabolitos oxigenados, de óxido nítrico y de las hidrolasas presentes en el lisosoma de macrófago (Fenton-Hall y Joiner, 1991). Los mecanismos de evasión son diversos: parasitación de macrófagos poco susceptibles a la activación por interferón-gamma o deficientes en la respuesta respiratoria, empleo de receptores del macrófago silentes para la respuesta oxidativa, secreción de metabolitos capaces de inactivar la respuesta oxidativa, como la fosfatasa ácida, y sistemas enzimáticos capaces de metabolizar los productos oxigenados y hacerlos inocuos (Fenton-Hall y Joiner, 1991; Bogdan et al., 1990). Dicha capacidad de supervivencia es limitada; cuando el macrófago

es activado por acción conjunta del interferón gamma y el factor de necrosis tumoral (TNF), el parásito muere (Liew et al., 1990).

El curso de la enfermedad, al menos en el modelo murino, se basa en la proliferación diferencial de los subconjuntos de linfocitos CD4+, Th1 y Th2. El primero produce interferón-gamma e interleucina 2 (IL-2) y es responsable de los fenómenos de hipersensibilidad retardada. El subconjunto Th2 produce IL-4, IL-10 y niveles altos de GM-CSF y coopera en la maduración y proliferación de linfocitos B (Mosmann, 1991).

Si el macrófago infectado por *Leishmania* ROSS es capaz de presentar antígeno que active el subconjunto Th1, el interferón-gamma producido por dichos linfocitos en conjunción con TNF activa los macrófagos, destruyendo el parásito; si por el contrario el antígeno presentado activa el subconjunto Th2 la IL-4 producida provoca en el macrófago insensibilidad a la activación por IFN-Gamma y la IL-10 inhibe la producción de linfocinas del subconjunto Th1; por otro lado el GM-CSF atrae macrófagos inmaduros y poco susceptibles de activación, constituyendo un refugio seguro para *Leishmania* ROSS. (Locksley y Scott, 1991).

1.2.- Control de leishmaniasis.

La erradicación de la leishmaniasis presenta graves problemas; el hábitat del flebotomo en madrigueras y grietas del terreno dificulta la acción de insecticidas sobre el mismo; por otro lado se han citado aparición de estirpes resistentes a los insecticidas. (O.M.S., 1990).

El hombre es considerado como un hospedador accidental de la leishmaniasis, a excepción del complejo *donovani*; sólo en las grandes aglomeraciones humanas en India y China, se encuentran ciclos antroponóticos de leishmaniasis, con transmisión hombre-hombre a través del vector. La enfermedad es mantenida por infección en mamíferos no domésticos de muy difícil control (O.M.S., 1990).

En la actualidad el tratamiento quimioterapéutico es el único para la leishmaniasis en humanos. Aunque diversos fármacos se encuentran en proceso de desarrollo (Berman, 1988), el medicamento de elección son antimoniales pentavalentes, a pesar de su elevada toxicidad hepática y renal y aparición de estirpes de parásitos resistentes a los mismos.

1.3.- Vacunación en leishmaniasis

La vacunación se ofrece como el mejor medio para prevenir la leishmaniasis, especialmente en aquellos países donde la infraestructura sanitaria es deficiente, sin embargo hasta la fecha sólo las vacunaciones con parásitos vivos han tenido una cierta eficacia especialmente en Rusia e Irán (Gunders, 1987). Actualmente se encuentran diferentes antígenos en fase de experimentación en laboratorio. La definición de los mismos ha seguido el mismo patrón de otras enfermedades infecciosas, con la

utilización de antígenos cada vez más purificados y de acción más específica. El desarrollo cronológico de la vacunación en leishmaniasis se resume en la TABLA I.

TABLA I.
PRINCIPALES ETAPAS EN LA VACUNACIÓN CONTRA

- Material de lesiones	Antigüedad
- Promastigotes cultivados	Nicolle y Manceaux, 1910
- Promastigotes irradiados	Alexander, 1982
- Promastigotes muertos	Mayrink et al., 1977
- Promastigotes avirulentos	Alexander y Phillips, 1978
- Promastigotes congelados	Greenblatt, 1980
- Fracciones subcelulares	Brycesson et al, 1970
- Antígeno purificado	Handman y Mitchell, 1985
- Péptidos sintéticos	Jardim et al., 1990
- <u>Salmonella</u> recombinante	Yang et al., 1990
- <u>Vaccinia</u> recombinante	McMahonPratt et al., 1992

Los antígenos purificados más utilizados han sido el lípidofosfoglicano (Handam y Mitchell, 1985) y dos glucoproteínas de superficie, Gp63 (Russell y Alexander, 1988) y Gp46 (Champsy y McMahon-Pratt, 1988). Dichos antígenos son propios del promastigote y los componentes más abundantes de su membrana plasmática (Bouvier et al., 1985). La razón de su mayor estudio y aplicación es la facilidad de cultivo en masa de los promastigotes, que permite una producción suficiente para estudios bioquímicos. Estructuras similares a los tres antígenos mencionados se encuentran en todas las especies de *Leishmania* ROSS, a excepción de Gp46 ausente en *Leishmania braziliensis* (VIANNA), MATTA (McMahon-Pratt et al., 1992). Los tres antígenos se insertan a la membrana plasmática por mediación de estructuras de glucosil fosfatidilinositol (Handman y Goding, 1985; Etges et al., 1986; Rivas et al., 1991).

El presente trabajo pretende describir los avances logrados en la caracterización molecular de Gp46 de *Leishmania amazonensis* LAINSON Y SHAW y su utilización en la vacunación de leishmaniasis.

2.- Gp46 de *Leishmania amazonensis*

2.1.- Protección pasiva por anticuerpos monoclonales contra Gp46.

El descubrimiento de la Gp46 se produjo en experimentos de infección en ratón con promastigotes de *Leishmania amazonensis* LAINSON Y

SHAW. Los parásitos eran incubados previamente a su inoculación con diferentes anticuerpos monoclonales producidos contra dicha especie. Diversos anticuerpos que reconocían Gp46 eran capaces de producir una protección total hasta inoculaciones de 10.000 promastigotes. La infección con un número mayor de parásitos sólo producía un retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad en relación a un control de parásitos no tratados (Anderson et al., 1983).

2.2.- Caracterización del epitopo reconocido por 2H7.

El anticuerpo monoclonal 2H7 es capaz de reconocer una proteína con un peso molecular aparente de 46 Kd en presencia de dodecil sulfato sódico. Dicho anticuerpo no reconoce ninguna proteína en amastigote ni en promastigotes de otras especies de *Leishmania* ROSS. Por otra parte el epitopo reconocido por 2H7 en Gp46 es conformacional, siendo dependiente de la conservación de los puentes disulfuro de la proteína, perdiéndose por reducción y alquilación de los mismos (Kahl y McMahon-Pratt, 1987; McMahon-Pratt et al., 1987). Un suero policlonal producido por inmunización contra la proteína purificada, es capaz de reconocer proteínas relacionadas en las diversas especies de *Leishmania* ROSS, a excepción de *Leishmania braziliensis* (VIANNA) MATTA, en concordancia con datos posteriores obtenidos a partir de pruebas DNA (McMahon-Pratt et al., 1992a).

2.3.- Caracterización molecular de Gp46.

La proteína es purificada a partir de la fracción de membranas del promastigote mediante solubilización con Brij 97 (relación detergente/proteína 10:1 p/p y posterior cromatografía de afinidad sobre el anticuerpo monoclonal 2H7 fijado a Sepharose 4B (Kahl y McMahon-Pratt, 1987).

Los resultados de marcaje de superficie con ¹²⁵I-lactoperoxidasa muestran que la glucoproteína Gp46 se encuentra expuesta en el lado exterior de la membrana plasmática. Por inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo monoclonal 2H7, el patrón de distribución de Gp46 en la superficie es uniforme, encontrándose incluso en la membrana flagelar.

El marcaje de la proteína con el reactivo hidrofóbico 3-(trifluormetil)-3-([^m-¹²⁵I] iodofenil)-diazirina indica que parte de la estructura de su molécula se encuentra en contacto con la parte hidrofóbica de la membrana (Khal y McMahon-Pratt, 1987).

Debido a la abundancia de ejemplos de proteínas de superficie de parásitos ancladas a la superficie por estructuras de glucosil fosfatidilinositol, se estudió la existencia de dicha estructura en Gp46. El tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PIPLC), purificada de *Trypanosoma brucei brucei* (DUTTON), revierte el

comportamiento de proteína integral de membrana de Gp46 a proteína soluble, demostrando que la estructura de GPI es la responsable del anclaje a la membrana. La conversión de la forma de membrana a forma soluble fue medida mediante cuatro técnicas:

a).- Partición de la proteína en Triton X-114 (Bordier, 1981). La técnica sirve para diferenciar aquellas proteínas que posean interacción con el detergente. Se basa en la separación de las fases detergente y acuosa debido al incremento del tamaño micelar que tiene lugar por encima de la temperatura del denominado punto nebuloso ("cloudy point"), que en el Triton X-114 se sitúa en una temperatura fisiológica que no presupone la desnaturalización de las proteínas. Las proteínas incluídas en la micela particionan en la fase detergente (TABLA II).

TABLA II
PARTICIÓN DE GP46 EN TRITON X-114.

Tratamiento	% de Gp46 en fase de detergente
Control	98.5
Fosfolipasa C (<i>T. brucei</i>)	4
Fosfolipasa C pretratada con 2mM iodoacetamida	95

El experimento se realizó con 4 μ g de Gp46 purificada y marcada con 125I por el método de lactoperoxidasa (radiactividad específica: 50.000 cpm/ μ g proteína).

b).- Electroforesis de cambio de carga (Helenius y Simons, 1977).- Las proteínas unidas a micelas de detergente presentan cambios en la movilidad electroforética mediados por la carga del detergente empleado. Si la proteína no interacciona con la micela, como sucede tras el tratamiento con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, no sufre cambios en su movilidad en los diferentes detergentes. La utilización de fosfolipasas C comerciales, como de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* es dependiente del contenido de la preparación en la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol; las preparaciones comerciales empleadas en el experimento de la figura 1 carecían de la misma. (Figura 1).

c).- Aparición del epitopo CRD (Common Reactive Determinant). Dicho epitopo aparece tras el tratamiento de la proteína con fosfolipasa C; el enlace fosfodiéster interno en la molécula de mio-inositol, originado tras la rotura del enlace fosfodiéster entre la molécula de mio-inositol y diacilglicerol, forma parte del CRD (Zamze et al., 1988). Gp46 sólo es inmunoprecipitada en presencia de un suero policlonal contra CDR cuando es tratada con fosfolipasa C (Rivas et al., 1991).

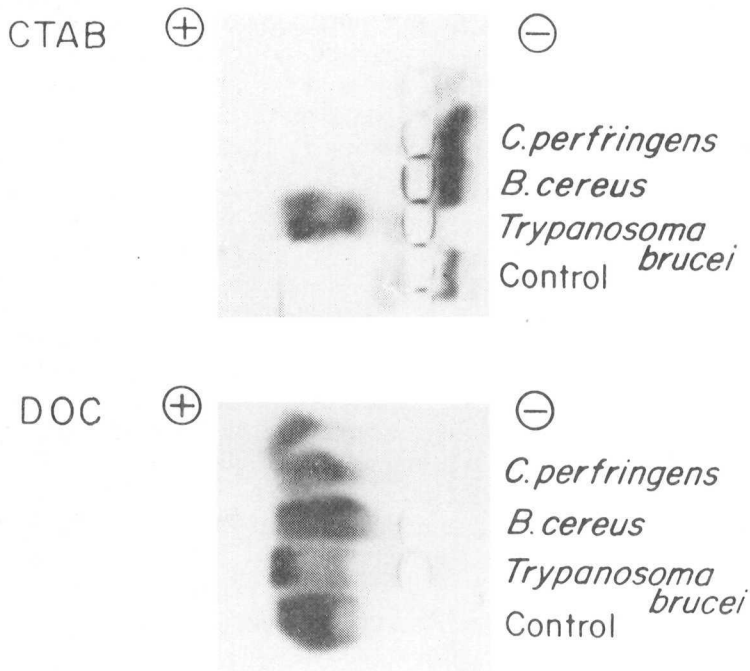


Figura 1. ELECTROFORESIS DE CAMBIO DE CARGA.- Se empleó 5µg de Gp46 purificada y marcada radiativamente con 125I (radiactividad específica: 50.000 cpm/mg proteína) incubada con fosfolipasa C de diferentes orígenes. La electroforesis se realizó conforme a las condiciones descritas por Helenius y Simons (1977). DOC.- Desoxicolato sódico. CTAB.- Bromuro de cetiltrimetilamonio.

d).- Marcaje metabólico de Gp46 con ácido 3H-mirístico.- El ácido mirístico es un componente común en la parte lipídica de la estructura de glucosil fosfatidilinositol. La proteína, marcada metabólicamente con ácido mirístico tritiado, es inmunoprecipitada con el anticuerpo monoclonal 2H7. El tratamiento con fosfolipasa C hace desaparecer la radiactividad debida al ácido mirístico incorporado, confirmando que la radiactividad incorporada no se debe al metabolismo del ácido graso en otros constituyentes de Gp46.

El contenido en azúcares constituye el 10% del peso molecular, conforme a los datos de su disminución por tratamiento de proteína purificada con endoglucosidasa H o la proteína sintetizada en presencia de tunicamicina (Rivas et al., 1991). De acuerdo con el patrón obtenido a diferentes tiempos de incubación con endoglucosidasa H y del análisis de la secuencia de aminoácidos, la cadena oligosacáridica es única (Lohman et al., 1990; Kahl y McMahon-Pratt, 1987). La eliminación de la cadena oligosacáridica no afecta al epítipo reconocido por el monoclonal 2H7 (Rivas et al., 1991).

La cuestión sobre el origen de la Gp46 como producto de degradación de la Gp63 se resolvió tras la diferenciación de ambas proteínas mediante inmunoprecipitación secuencial por anticuerpos monoclonales específicos para cada una de ellas, mostrando que no existía competición de una proteína por el anticuerpo monoclonal de la otra. La diferenciación fue confirmada posteriormente por mapas peptídicos de ambas proteínas tras digestión con SV8 y tripsina (McMahon-Pratt et al., 1987) y secuencia de la Gp46 (Lohman et al., 1990).

2.3.- Secuencia de Gp46

La secuencia de la proteína fue obtenida a partir de una genoteca genómica formada por fragmentos de alto peso molecular de DNA obtenidos por digestión parcial del DNA con *Sau*3A; se aislaron fragmentos de 15-20 kilobases que fueron aislados y clonados en λ EMBL3. Los clones positivos se identificaron por hibridización con un oligonucleótido sintético de 62 bases de acuerdo con la secuencia N-terminal de Gp46. El clon 7a12, con señal fuerte en hibridización fue aislado y se obtuvo su mapa de restricción. El fragmento denominado BamHI contiene toda la región de codificación de Gp46 y fue subclonado en pUC19. Se realizó una nueva subclonación en M13mp19 o en pBluescript, obteniéndose fragmentos con solapamiento y el DNA fue secuenciado por el método de Sanger de terminación de cadena por desoxinucleótidos. La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína.

REGIÓN DEL PEPTIDO SEÑAL

-32 M A Q C V R R L V L A A P L A A V V A L L L C T S S A P V A R A

REGION AMINOTERMINAL PROTEINA MADURA

1 A G T S D F T G A Q Q K N T L T V L Q A F A R A I P A L G D T W
 33 T G S D F C S W E H I I C Y S S G V G V W M H N V D Y T G T L P
 65 E M P A S V D Y K D V

Figura 2.- SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA Gp46. (Lohman et al., 1990). La secuencia de inserción de la cadena de oligosacáridos se encuentra subrayada. (Ver figura 2, continuación).

SECUENCIA DE PEPTIDO REPETITIVA

75 M I L A L D F G A M G Q G L S G T L P P S W S S
 99 M K H L I V L D L E G T K V S G T L P P E W S E
 123 M T S A E A L Q L E N C G L S G S L P T S W S S
 147 M P K L R I V S L S G N H F C G C V P D S W R E

REGION RICA EN CISTEINA Y PROLINA

173 K D R L D V T I E E W H M G E D C K L A N A C R P T A A P G T T
 205 T T N P P T T T G T P A A S S T P S P G S G C E V D G C E V C E
 237 G D S A A R C A R C R R G Y S L T D E K T C L G E P R W R R G G
 269 G V E R T A G C R C C V G G C A V E R G A G G V R V R R A P L L
 301 C G A P G A C P R P R H G V V A A L S P P P A D G E T D S H T R
 333 T R T R R R A S R V L S A V V A P A R M H G H A E A C M R V R V
 365 P A L V C L S V W P A V G T R R R S N V R A A A V C R L G Q R R
 397 C G A R P S P C A S V C V S W P R E R R T E C A C P A L F D

REGION HIDROFOBICA ELIMINADA EN LA PROTEÍNA MADURA

427 G A R L R C C A L V V C A G A A P A G

Figura 2. (Continuación)

2.4.- Análisis de secuencia de Gp46.

La comparación de la secuencia de Gp46 con otras secuencias de las bases de datos de EMBL y GenBank no muestra similitudes con otras proteínas publicadas (Lohman et al., 1990).

La secuencia puede ser dividida en cuatro regiones:

a).- Extensión aminoterminal de 32 aminoácidos correspondiente al péptido señal. De acuerdo con su función de translocación a través de la membrana, dicha secuencia es fuertemente hidrofóbica, según el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982).

b).- Región de secuencias repetitivas.- Comprende la mitad de la secuencia de la proteína madura. Se encuentra formada por una secuencia de 24 aminoácidos repetida cuatro veces. La variación de la naturaleza de los aminoácidos dentro de la secuencia repetida es mayor en la región aminoterminal.

c).- Región resistente a la digestión por proteinasas y rica en Cys/Pro. La secuencia de la mitad carboxilo terminal de la proteína se encuentra

constituída en un 19% por cisteínas y prolinas. El análisis de la estructura secundaria por el método de Chou-Fasman predice la presencia de segmentos de hélice α y una abundancia de estructuras en acodamiento. El contenido en prolinas y cisteínas determinaría una estructura de la proteína muy estable y compacta, que justificaría su baja susceptibilidad al ataque proteolítico y ser la porción dominante en la respuesta inmune a Gp46. Existen motivos constituidos por cisteínas e histidinas propios de metaloproteínas, si bien hasta ahora no se posee ningún otro dato para su confirmación.

d).- Región de la extensión carboxilo-terminal.- La extensión carboxilo-terminal es eliminada en el proceso de inserción de la estructura de glucosil fosfatidilinositol. La mayor parte de las secuencias correspondientes a proteínas con GPI presentan extensiones de 7-12 aminoácidos hidrofóbicos en el carboxilo terminal, y la inserción de la estructura de GPI en la proteína se realiza a través de alanina, serina, glicocola, aspártico o asparagina (Cross, 1990). Conforme a dichas normas, la secuencia de Asp-Gly-Ala (aminoácidos 426-428) sería el punto de inserción siendo Asp 426 el aminoácido terminal de la proteína madura.

Sólo se encuentra una secuencia de glucosilación en las posiciones 193-195: Asn-Ala-Cys. Dicha secuencia ha sido citada en la glucosilación de la proteína C bovina (Kornfeld y Kornfeld, 1985). No pertenece a los motivos Asn-X-Thr o Asn-X-Ser comunes en la N-glucosilación de otros eucariotas.

Por Northern blot sólo se ha identificado un RNA de 2.3 kilobases con codificación de la totalidad de la proteína.

El número de fragmentos de DNA de *Leishmania amazonensis* LAINSON Y SHAW identificados en Southern blot es superior al esperado, que conjuntamente a los datos de análisis de restricción con nucleasas de alta especificidad, determinan la existencia de una familia de genes o varias copias del gen en el genoma de *Leishmania* ROSS (Lohman et al., 1990).

2.5.- Vacunación en modelo murino con Gp46 purificada.

La proteína purificada ha sido empleada con éxito en experimentos de protección en ratón frente a la infección con *Leishmania amazonensis* LAINSON Y SHAW en cepas de ratón resistentes (C57B7/6) y susceptibles (BALB/c y CBA) a la infección por *Leishmania* ROSS. El antígeno fue inyectado por vía subcutánea utilizando *Corynebacterium parvum* como adyuvante con mejores resultados de protección en las tres cepas de ratón que saponina y adyuvante de Freund incompleto. Nuevamente, la extensión de la protección es dependiente de la dosis de parásito inoculado y de la cepa de ratón. Los datos se resumen en la TABLA III.

En todos los casos la proteína inyectada provoca respuesta humoral con incremento en los niveles de IgG1 e IgG2 (Champsí y McMahon-Pratt, 1988). En pacientes humanos, Gp46 es reconocida por suero de pacientes con diferentes formas de leishmaniasis así como de enfermedad de Chagas.

La proteína provoca proliferación de linfocitos T humanos obtenidos de pacientes con diferentes formas de leishmaniasis (Burns et al., 1991).

TABLA III
RESULTADOS DE INMUNIZACIÓN EN RATÓN CON GP46
PURIFICADA

(Champsy y McMahon-Pratt, 1988).

Cepa	Dosis de parásitos	Protección
CBA	10^4	Total
	10^6	Total
BALB/C	10^3	Parcial
	10^5	Parcial
C57B1/6	10^4	Total
	10^6	Nula

Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente tres veces con 3 μ g de Gp46 purificada con 50 μ g de *Corynebacterium parvum*. El intervalo entre inoculaciones fue de una semana. La infección con los promastigotes de *Leishmania amazonensis* de los parásitos se realizó cuatro semanas tras la terminación de la inmunización con Gp46.

2.6. Vacunación con virus recombinante Gp46-Vaccinia.

Las vacunas basadas en recombinantes vivos presentan sobre otros tipos de vacunas dos ventajas. a).- La consecución de una alta protección por vacunas sintéticas requiere en general varias dosis de las mismas; los estudios epidemiológicos demuestran que el número de personas que acuden a la inoculación de nuevas dosis de vacuna disminuye muy considerablemente, especialmente en países con educación e infraestructura sanitaria deficiente. La solución es la consecución de una vacuna que produzca protección en una única dosis. b).- El control del reservorio en leishmaniasis es prácticamente imposible. Sólo en los países del área septentrional de la cuenca mediterránea donde el perro es el principal reservorio, podría realizarse con cierta garantía de éxito en la población canina urbana. Sin embargo quedarían fuera de dichas medidas los otros reservorios salvajes, como el zorro y los perros asilvestrados. En consecuencia la utilización de vacunas contra la leishmaniasis sería una

posible solución. Dos son los microorganismos que han sido empleados hasta la fecha; la infección en ratón con recombinantes de *Salmonella typhimurium* con el gen de la proteína Gp63 de *Leishmania major* BRAY, ASHFORD y BRAY, ha conseguido una protección parcial frente al parásito (Yang et al., 1990). El virus Vaccinia presenta la ventaja de infectar a un amplio espectro de especies animales y puede ser empleado para la vacunación de dichos reservorios salvajes, mediante cebos infectados con virus recombinante de Vaccinia. Los virus que el animal toma por vía respiratoria son suficientes para la consecución de inmunidad, demostrado en experimentos de campo con virus Vaccinia recombinante con genes del virus de la rabia (Tolson et al., 1988). Se ha conseguido la inserción y posterior expresión del gen de Gp46 en Vaccinia, tanto en la cepa salvaje como en un virus mutante con una patogenicidad muy reducida respecto a la cepa salvaje (McMahon-Pratt et al. 1992b). La construcción del vector del virus Vaccinia recombinante se esquematiza en la Figura 3.

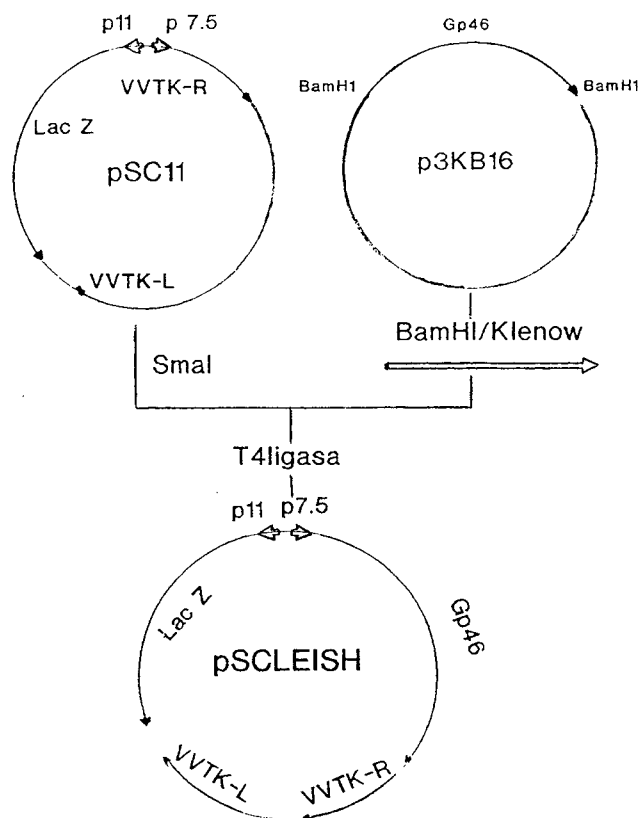


Figura 3.- CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO pSCLEISH (Modificado de McMahon-Pratt et al., 1992b).

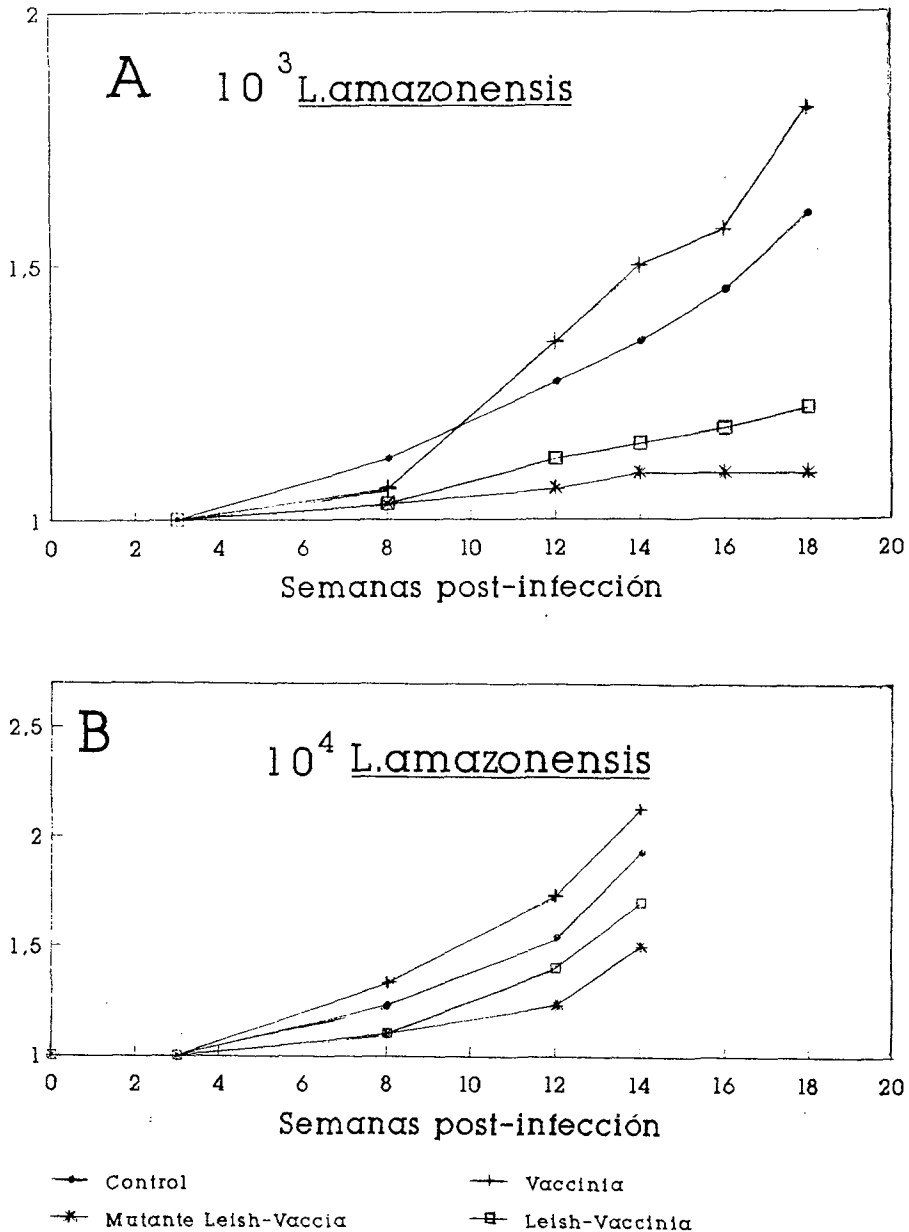


Figura 4.- EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN CON *Leishmania amazonensis* en RATONES BALB/C INMUNIZADOS CON VIRUS Vaccinia. Grupos de cinco ratones son inmunizados por vía intraperitoneal con 10^7 unidades formadoras de placa de los virus recombinantes Mutante Leish-Vaccinia y Leish-Vaccinia o 4×10^6 del virus salvaje Vaccinia. Cuatro semanas más tarde, se realiza una nueva infección con 10^8 Mutante Leish-Vaccinia y Leish-Vaccinia o 10^7 de cepa salvaje de Vaccinia. Los ratones son infectados once semanas más tarde con 10^3 o 10^4 promastigotes de *Leishmania amazonensis* por inoculación en la pata posterior derecha. La lesión se mide mediante el cociente grosor pata derecha/pata izquierda.

El gen de Gp46 de *Leishmania* ROSS queda bajo el control del promotor 7.5, válido para expresión de proteínas tempranas y tardías del virus. El plásmido que contiene el gen de Gp46 (pscLeish) es introducido en el genoma de ambas cepas de *Vaccinia* por recombinación homóloga en el lugar de la timidilato quinasa.

Los resultados de la inmunización en ratón son resumidos en la Figura 4.

Las principales consecuencias extraídas de dichos experimentos son, en primer lugar, la dependencia de la protección conseguida con la infección por el virus *Vaccinia* de la dosis de parásitos empleados para la infección; en el caso de una inoculación de 1000 promastigotes la protección es total; si la dosis es diez veces superior, sólo se consigue retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad. En ambos casos la dosis de parásitos utilizada para la infección es superior a la inoculación por flebotomo infectado. El virus mutante, cuya diferencia consiste en la delección de una porción del brazo izquierdo de DNA y defectos en la proteína de fusión de 14Kd (Rodríguez et al., 1989), consigue una protección mayor y a la vez una patogenicidad muy inferior a la cepa salvaje, lo cual abre amplias perspectivas para una posible vacunación en humanos.

Las células BSC infectadas con el virus de *Vaccinia* expresan Gp46 en la superficie de las células infectadas, de acuerdo a los patrones de inmunofluorescencia indirecta utilizando un suero policlonal contra Gp46.

La infección en ratón induce respuesta inmune tanto humoral, con aumento de los títulos de inmunoglobulinas capaces de reconocer la proteína, como respuesta celular con proliferación de linfocitos aislados de ratones infectados en presencia de Gp46 purificada.

3.- Perspectivas futuras de la vacunación en leishmaniasis.

En experimentos piloto, como los aquí presentados, Gp46 es un firme candidato a la posible consecución de una vacuna de alta eficacia contra la leishmaniasis. Quedan diversas incógnitas por responder, tales como las posibles diferencias entre inmunizaciones que empleen la proteína nativa y la proteína en forma soluble con carencia de la porción de glucosil fosfatidilinositol. En otro componente de *Leishmania*, el lípidofosfoglicano, la eliminación de glucosil fosfatidilinositol y utilización del oligosacárido soluble como antígeno cambia radicalmente el curso de la infección, con fuerte exacerbación de la carga de parásitos y, consecuentemente de los efectos de la enfermedad (Handman y Mitchell, 1985). El mecanismo, presumiblemente complejo, es muy probable que se realice a nivel del procesamiento de antígeno por los macrófagos. Otra posibilidad, actualmente en desarrollo, es la utilización de vacunas sintéticas basadas en la secuencia de epitopos protectores de la proteína Gp46, a semejanza de la vacuna contra malaria (Patarroyo et al., 1988).

El sistema de vacunación basada en recombinantes vivos y más concretamente *Vaccinia* presenta las ventajas anteriormente citadas, de la

posibilidad de vacunar reservorios salvajes y de lograr protección con una sola dosis; el principal problema con que se enfrenta *Vaccinia* es la patogenicidad del virus en el hospedador infectado. Si bien el problema no puede ser eliminado totalmente, se pueden apuntar nuevas soluciones, tales como la utilización de virus con reducida patogenicidad (Rodríguez et al., 1989), y mejora de la expresión de las proteínas recombinantes bajo promotores más potentes y específicos (Hruby, 1990; Davidson y Moss, 1990) que o bien reducen la patogenicidad intrínseca del virus, o por la mayor expresión de la proteína recombinante, precisarían una dosis menor del virus; por otro lado y debido a la gran capacidad del genoma de *Vaccinia* para albergar diversos genes, se puede introducir genes que codifiquen para moléculas capaces de limitar la expansión del virus, como IL-2 (Ramshaw et al., 1987) o TNF (Shambi et al., 1991), especialmente útil en pacientes con inmunodepresión.

Otra línea de investigación activa es la definición de nuevos antígenos capaces de producir una respuesta inmune protectora; la consecución de líneas axénicas de amastigotes que permiten la obtención masiva en cultivo de la forma intracelular, posibilitan la definición bioquímica de sus componentes (Pan, 1984; Eperon y McMahon-Pratt, 1988). Dicha vacuna tendería por sí sola a limitar la extensión de la enfermedad, y sería preciso su combinación con otra para el promastigote para una prevención del comienzo de la enfermedad.

Uno de los inconvenientes en el desarrollo de nuevas vacunas experimentales en leishmaniasis es el largo período requerido por la infección para que sus síntomas sean cuantificados. La solución más común es titular la carga de parásitos de un tejido por aparición de promastigotes a partir de diferentes diluciones de una muestra pesada del tejido de la lesión (Titus et al., 1985). Otra solución alternativa, que puede ser empleada como diagnóstico rápido "in vitro" de antígenos candidatos a una vacuna es la técnica conocida como "T cell blot"; consistente en la incubación de linfocitos T periféricos en presencia de células presentadoras de antígeno con diferentes porciones de una tira de nitrocelulosa donde se han transferido los antígenos de la muestra tras su separación electroforética (Young y Lamb, 1986). El antígeno capaz de inducir proliferación de linfocitos CD4⁺ Th1, medido por las linfocinas secretadas al medio, es teóricamente un buen candidato para la vacunación. La aplicación de dicha técnica a la leishmaniasis ha permitido definir nuevos antígenos para vacunas (Scott et al., 1987; Scott et al., 1990), así como los fragmentos de un antígeno capaces de provocar inmunidad protectora en el huésped (Jardim et al., 1990; Liew et al., 1990; Yang et al., 1991).

AGRADECIMIENTOS.- Mi iniciación a la *Leishmania* fue realizado en el laboratorio de la Dra. Diane McMahon-Pratt (Yale University School of Medicine), donde tuve la suerte de realizar mi etapa postdoctoral con una beca OTAN. El autor ha recibido subvención de los proyectos CICyT BIO88-0229-CO2-01 y CEE STD II 630/631.

Bibliografía

- ALEXANDER, J. (1982): *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 246.
- ALEXANDER, J. y PHILLIPS, R.S. (1978): *Exp. Parasitol.* 45, 93.
- ALVAR, J., BLÁZQUEZ, J., y NÁJERA, R. (1989): *J. Infect. Dis* 160, 560.
- ANDERSON, S., DAVID, J.R., y McMAHON-PRATT, D. (1983): *J. Immunol.* 36, 502.
- BERMAN, J.D. (1988): *Rev. Infec. Dis.* 10, 560.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., y SOLBACH, W. (1990): *Parasitol. Today* 6, 183.
- BORDIER, C. (1981): *J. Biol. Chem.* 256, 1604.
- BOUVIER, J., ETGES, R.E., y BORDIER, C. (1985): *J.Biol. Chem.* 260, 15504.
- BRYCESSON, A.D.M., BRAY, R.S., WOLSENCROFT, R.A., y DUMONDE, D.C. (1970): *Clin. Exp. Immunol.* 7, 301.
- BURNS, J.M., SCOTT, J.M., CARVALHO, E.M., RUSSO, D.M., MARCH, C.J., VAN NESS, K.P., y REED, S.G. (1991): *J. Immunol.* 146,742.
- CROSS, G.A.M. (1990): *Annu. Rev. Cell Biol.* 6,1.
- CHAMPSI, J., y McMAHON-PRATT, D. (1988): *Infect. Immun.* 52, 3272.
- CHANG, K.P., FONG, D. y R.S. BRAY. (1985); *Leishmaniasis*, eds. K.P. Chang y R.S.Bray (Amsterdam: Elsevier), p 1.
- DAVIDSON, A.J., y MOSS,B. (1990): *Nucl. Acid. Res.* 18, 4285.
- EPERON, s., y McMAHON-PRATT, D. (1989): *J. Protozool.* 36, 502.
- ETGES, R., BOUVIER, J., y BORDIER, C. (1986): *EMBO J.* 5, 597.
- FENTON-HALL, B., y JOINER, K.A. (1991): *Immunol. today* 122, A22.
- GREENBLATT, C.L., SPIRA, D.T., MONTILIO, B., y GERICHTER, T. (1980): *J. Biol. Stand.* 8, 227.
- GUNDERS, A.E. (1987): *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, eds. W. Peters y R. Killick-Kendrick (London: Academic Press) p 933.
- HANDMAN, E., y GODING, J.W. (1985): *EMBO J.* 4, 329.
- HANDMAN, E., y MITCHELL, G.F. (1985): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5910.
- HELENIUS, A., y SIMONS, K. (1977): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 529.
- HRUBY, D.E. (1991): *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 153.
- JARDIM, A., ALEXANDER, J., TEH, H.S., OU, D., y OLAFSON, R.W. (1990): *J. Exp. Med.* 172, 645.
- KAHL, L.P., y McMAHON-PRATT, D. (1987): *J. Immunol.* 138, 1587.
- KORNFELD, R., y KORNFELD, S. (1985): *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631.
- KYTE, J., y DOOLITTLE, R.F. (1982): *J. Mol. Biol.* 157, 105.
- LIEW, F.Y., PARKINSON, C., MILLOTT, S., SEVERN, A., y CARRIER, M. (1990): *Immunology* 69, 570.

- LOCKSLEY, R.M., y SCOTT, P. (1991): *Immunol. Today* 12, A58.
- LOHMAN, K.L., LANGER, P., y McMAHON-PRATT, D. (1990): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8393.
- MARVA, E. y GREENBLATT, C.L. (1979): *J. Protozool.* 26, 46A.
- MAYRINK, W., DA COSTA, C.A., MAGALHAES, P.A., MELO, N.N., DIAS, M., OLIVEIRA-LIMA, A., MICHALICK, M.S. y WILLIAMS, P. (1979): *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 385.
- McMAHON-PRATT, D., JAFFE, L., KAHL, L., LANGER, P., LOHMAN, K., PAN, A., y RIVAS, L. (1987): *Host-parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections*. NATO ASI series H 11, eds. K.P. Chang y D. Snary. (Heidelberg: Springer-Verlag) P 123.
- McMAHON-PRATT, D., RODRÍGUEZ, D., RODRÍGUEZ, J.R., ZHANG, Y., MANSON, K., BERGMAN, C., RIVAS, L., RODRÍGUEZ, J.F., LOHMAN, K.L., RUDDLE, N.H., y ESTEBAN, M. (1992b): *J. Immunol.* (en prensa).
- McMAHON-PRATT, D., TRAUB-CSEKO, Y., LOHMAN, K.L., ROGERS, D.D., y BEVERLEY, S. (1992a): *Mol. Biochem. Parasitol.* (en prensa).
- MOSMANN, T.R. (1991): *Res. Immunol.* 142, 9.
- NICOLLE, M.M.C., y MANCEAUX, L. (1910): *Ann. Inst. Pasteur* 24, 673.
- O.M.S. (1990): *Control of Leishamiasis. Technical Report Series N° 793* (Ginebra. O.M.S.).
- O.M.S. (1991): *Tropical Diseases. Progress in Research 1989-1990* (Ginebra. O.M.S.) p 72.
- PATARROYO, M.E., AMADOR, R., CLAVIJO, P., MORENO, A., GUZMAN, F., MURILLO, L.A., PONTON, G., y TRUJILLO, G. (1988): *Nature* 332; 158.
- RAMSHAW, I.A., ANDREW, M.E., PHILLIPS, S.M., BOYLE, D.B., y COUPAR, P. (1987): *Nature* 329, 545.
- RIVAS, L., KAHL, L., MANSON, K., y McMAHON-PRATT, D. (1991): *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 235.
- RODRÍGUEZ, D., RODRÍGUEZ, J.R., RODRÍGUEZ, J.F., TRAUBER, D., y ESTEBAN, M. (1989): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1287.
- RUSSELL, D.G., y ALEXANDER, J. (1988): *J. Immunol.* 140, 1274.
- RUSSELL, D.G., y TALAMÁS-ROHANA, P. (1989): *Immunol. Today* 10, 328.
- SAMBHI, S.K., KOHONEN-CORISH, M.R.J., y RAMSHAW, I.A. (1991): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4025.
- SCOTT, P., CASPAR, P., y SHER, A. (1990): *J. Immunol.* 144, 1075.
- SCOTT, P., PEARCE, E., NATOVITZ, P., y SHER, A. (1987): *J. Immunol.* 139, 221.
- TALAMÁS-ROHANA, P., WRIGHT, S., LENNARTZ, M.R. y RUSSEL, D.G. (1990): *J. Immunol.* 144, 4817.
- TITUS, R.G., MARCHAND, M., BOON, T., y LOUIS, J.A. (1985): *Parasite Immunol.* 7, 545.
- TOLSON, N.D., CHARLTON, K.M., CASEY, G.A., KNOWLES, M.K., RUPPRECHT, C.E., LAWSON, K.F., y CAMPBELL, J.B. (1988): *Arch. Virol.* 102, 297.
- YANG, D.M., FAIRWEATHER, N., BUTTON, L.L., McMASTER, W.R., KAHL, L.P., y LIEW, F.Y. (1990): *J. Immunol.* 145, 2281.

YANG, D.M., ROGERS, M.V., y LIEW, F.Y. (1991): *Immunology* 72, 3.

YOUNG, D.B. y LAMB, J.R. (1986) *Immunology* 59, 167.

ZAMZE, S.E., FERGUSON, M.A.J., DWEK, R.A. y RADEMACHER, T.W. (1988): *Eur. J. Biochem.* 176, 527.