

30  
20je



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**CONSTRUCCION DE UNA LINEA CELULAR MURINA PRODUCTORA DE  
GP63 DE *Leishmania mexicana*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**SARA HUERTA YEPEZ**

México D.F. 1994

**TESIS CON  
FALSA FE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dr. RUBEN MARROQUIN SEGURA
Vocal:	Dr. CESAR R. GONZALEZ BONILLA
Secretario:	I.B.Q. VICTOR CORVERA PILLADO
1er Suplente:	Q.F.B YOLANDA FLORES CABRERA
2do Suplente:	Q.F.B MA. DE LOURDES VEGA NAVARRETE

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Hospital de Especialidades, Instituto Mexicano del Seguro Social; bajo la tutoría del Dr. César R González Bonilla y cotutoría del Dr. Vianey Ortiz Navarrete.

Asesor,

-----  
Dr. CESAR R. GONZALES B.

Sustentante

-----  
SARA HUERTA VEPEZ

Con todo respeto dedico en agradecimiento éste trabajo de tesis a mi asesor, al Dr. César R González Bonilla, por su ayuda incondicional durante el desarrollo del trabajo experimental, así como también en la redacción y escritura del mismo. Pero sobre todo por la confianza y amistad que siempre me brindó.

Agradezco la valiosa colaboración, asesoría y paciencia de:

Dr. Vianney Ortiz Navarrete.  
M. en C. Jorge Paniagua Solís.  
M. en C. Manuel Carrera Camargo  
M. en C. Guillermo Ramírez Avila  
Q.F.B Constantino López Macías  
Q.F.B Natalia Martín Orozco  
Q.F.B Laura Bonifaz Alfonzo  
Q.F.B Araceli Santiago Machuca  
Q.F.B Rebeca Alvarez Córdoba

Y especialmente al Dr. Armando Isibasi Araujo por su confianza, apoyo y consejos, así como también por haberme proporcionado los medios necesario para el desarrollo de la parte experimental.

DEDICO ESTE TRABAJO A :

DIOS

Por que le debo todo lo que soy.

A mis padres: David Huerta García y Edelmira Yopez Torres, por que con su cariño y apoyo incondicional permitieron mi desarrollo profesional, "Gracias".

A mis hermanos: David Huerta Y, por que con su intenso trabajo permitió el avance de mis estudios.

Sergio Huerta Y, por su valioso ejemplo.  
Y a Marú, Israel y Ricardo, por soportarme y apoyarme todo este tiempo.

A mis abuelitas: Raquel García y Elisa Torres, por su cariño y apoyo.

A mis tíos: José Dolores Huerta y Roberto Huerta, por que siempre estuvieron pendientes de mis estudios y dispuestos a ayudarme, y a mis tías Antonia, Juana, Carmela, Amparo y Rubicelia, por su gran ayuda y cariño.

A mis primos: Por que siempre han sido muy amables conmigo y por brindarme su amistad.

A mis amigos: Georgina Cantero "Sandy", Juan Moreno, Blanca Moreno, Leticia Castellanos, Blanca Ayala, Ma Elena Bustamantes, Hector Sánchez, Lucy López, José S Delgado, Sara R Hernández, Miguel Sandoval y Alberto Campos, por enseñarme lo valioso que es contar con una verdadera amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Paty, Yola, Monica, Carmen I, Carmen II, Rosa, Aurelia, Griselda, América y Belem, por su ayuda y buenos deseos para que todo me resultara bien.

Y especialmente a la Sria Elizabeth Pérez por su amabilidad y gran ayuda con los trabajos de mecanografía. Y a Fabian, Jorge, Alejandra y Leticia Navarro, por su gran colaboración en la parte experimental.

A mis profesores: Martha Ortiz, Martha Canchas y Roberto Melendez, por animarme para seguir adelante y por sus valiosos consejos.

Con profundo cariño deseo expresar mi gratitud a la Universidad Nacional Autonoma de México.

Por último quiero agradecer y dedicar éste trabajo de tesis a la persona que estuvo conmigo en los buenos y malos momentos, que me brindó su ayuda en la parte experimental, redacción y escritura del mismo. Con la que siempre pude contar, para resolver mis problemas y para darme sus valiosas opiniones, sin esperar nada a cambio. Logrando con todo lo anterior que éste trabajo también sea suyo, no puedo describir, ni detallar lo que significa para mí, por que no existen palabras para hacerlo, pero sabe que nunca podré olvidar su apoyo, comprensión y amor.

Con sincero respeto e inmenso amor, a mi compañero y amigo;  
Mario I Vega Paredes.

## PRINCIPALES ABREVIATURAS

BHI	Infusión cerebro corazón
SFB	Suero fetal bovino
PBS	Amortiguador de fosfatos
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
BSA	Albumina serica bovina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SS	Solución salina

## INDICE DE FIGURAS.

- Figura No 1 Modelo experimental.
- Figura No 2 Mapa del plásmido pUC19::mgp63.
- Figura No 3 Mapa del Plásmido pFM92.1 .
- Figura No 4 Inmunopunto para verificar la producción de GP63 por el plásmido pUC19::mgp63.
- Figura No 5 Plásmido pUC19::mgp63 y pFM92.1 digeridos con EcoRI.
- Figura No 6 Purificación del Gene que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*
- Figura No 7 Verificación de la presencia del gene mgp63 en el plásmido pIQSHY.1.
- Figura No 8 Gene mgp63 en la orientación del promotor (+) y contraria al promotor(-).
- Figura No 9 Verificación de la orientación del gene mgp63 en el plásmido pIQSHY.1.
- Figura No 10 Southern Blot de las línea celular P815 $\Omega$ MGP63.
- Figura No 11 Inmunopunto de la línea celular P815 $\Omega$ MGP63.
- Figura No 12 Inmunoelectrotransferencia de la línea celular P815 $\Omega$ MGP63.
- Figura No 13 Inmunoelectrotrasferencia que demuestra la exxpresión de la forma madura de GP63 de *Salmonella typhi* CVD908 aroC(-), aroD(-).
- Figura No 14 Linfocitos T CD4<sup>+</sup> , Th-1 y Th-2.
- Figura No 15 Vías fundamentales de procesamiento y presentación de antígenos por el MHC.
- Figura No 16 Via de procesamiento y presentación de *Salmonella typhimurium* por el MHC.



## INDICE

RESUMEN. . . . .	1
I INTRODUCCION. . . . .	2
II FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA. . . . .	5
III OBJETIVOS . . . . .	6
IV HIPOTESIS. . . . .	7
V MODELO EXPERIMENTAL. . . . .	8
VI MATERIALES Y METODOS. . . . .	9
1. Parásitos.	
2. Cepas bacterianas.	
3. Plásmidos	
4. Líneas celulares.	
5. Ingeniería genética.	
5.1 Digestión del DNA	
5.2 Electroforesis	
5.3 Purificación del fragmento	
5.4 Ligación	
5.5 Transformación	
5.6 Identificación de colonias transformadas	
6. Construcción de la línea celular P815 $\Omega$ MGP63.	
6.1 Transfección con el DNA plasmídico	
6.2 Clonación	
7. Verificación de la presencia del gene <i>mgp63</i> en la línea P815 $\Omega$ MGP63.	
8. Expresión de GP63	
8.1 Inmunopunto	
8.2 Inmunolectrotransferencia	
9. Animales de Laboratorio	
10. Obtención de suero hiperinmune de conejo contra proteínas de <i>Leishmania</i>	
11. Obtención del antígeno de <i>Leishmania mexicana</i> .	
VII RESULTADOS . . . . .	17
1. Construcción del plásmido pIQSHY.1	
2. Construcción de la línea celular P815 $\Omega$ MGP63	
VIII DISCUSION. . . . .	29
IX CONCLUSIONES . . . . .	35
BIBLIOGRAFIA. . . . .	36

## RESUMEN.

La citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> parece estar involucrada en la generación de inmunidad protectora contra infecciones por microorganismos intracelulares. Sin embargo, no se ha definido cómo antígenos particulados son capaces de ser procesados y presentados en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I. Para aclarar el mecanismo, es necesario contar con sistemas experimentales que permitan evaluar la actividad de células citotóxicas *in vitro*. En el presente trabajo se reporta la construcción de una línea celular murina capaz de expresar de manera estable la proteína principal de la superficie del promastigote (GP63) de *Leishmania mexicana*.

El gene que codifica para la forma madura de la GP63 de *Leishmania mexicana* se obtuvo a partir del plásmido pUC19::mgp63 y se insertó en el plásmido pFM92.1. Con el plásmido resultante pIQSHY.1 se transfectaron las células murinas P815. La presencia del gene foráneo dentro de las células se confirmó mediante Southern Blot y la expresión de la GP63 recombinante de *Leishmania mexicana* se comprobó mediante inmunoelectrotransferencia.

Los resultados muestran que las células transfectadas con el plásmido pIQSHY.1 expresan de manera estable y constitutiva GP63 recombinante de *Leishmania mexicana*.

## I. INTRODUCCION.

Las Leishmaniasis son padecimientos causados por protozoarios del género *Leishmania*. Después del paludismo, ocupan el segundo lugar en importancia por su impacto en Salud Pública. Aunque su distribución es mundial, las leishmaniasis se presentan de manera endémica, preferentemente en países subdesarrollados de las zonas tropicales y subtropicales. La Organización Mundial de la Salud calcula que hay alrededor de 350 millones de personas en riesgo en el mundo, 12 millones de enfermos y 400 mil casos nuevos cada año (1).

La enfermedad se adquiere a través de la picadura de un mosquito hematófago del género *Lutzomia*. En México existen por lo menos 38 especies distintas, pero sólo *Lutzomia olmeca* ha sido capaz de transmitir a *Leishmania mexicana* en voluntarios humanos. Los reservorios son mamíferos domésticos y silvestres. En México, los reservorios silvestres deben ser los mismos roedores arbóreos descritos para centroamérica, pero solo se ha comprobado que pueden transmitirla *Carinis familiaris* en Oaxaca y *Nassua narica* en Chiapas (2). En México, el principal agente causal es la subespecie *Leishmania mexicana mexicana* que ocasiona cuatro formas clínicas diferentes: La leishmaniasis cutánea localizada (LCL), o úlcera de los chichleros, esta es la forma mas frecuente y se caracteriza por la presencia lesiones en la piel que pueden tardar meses o años en sanar y que pueden dejar cicatrices permanentes, altamente desfigurantes. Sin embargo, la enfermedad natural habitualmente confiere protección contra infecciones subsecuentes por especies relacionadas (1). La leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), que se inicia con un nódulo no ulcerado en el sitio de la picadura del mosquito, a partir del cual se disemina el parásito por vía linfática, causando una afección generalizada grave. La leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia, que se caracteriza por lesiones metastásicas mutilantes en las mucosas nasal y orofaríngea, que se presentan meses después de una lesión cutánea, no curan espontáneamente y son muy resistentes a la quimioterapia. Por último, aunque rara en nuestro país, se encuentra la leishmaniasis visceral o kala-azar, que es la variedad clínica más grave, pues tiene una alta letalidad y afecta principalmente a niños menores de diez años de edad en zonas altamente endémicas (3). En esta variedad, el parásito se disemina al hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. En Europa y Asia esta forma clínica es causada por *Leishmania donovani*.

El ciclo biológico de *Leishmania* comprende dos estadios: el de promastigote, que se encuentra en el vector y el de amastigote que se presenta en los tejidos de vertebrados. Una característica central en la patogenicidad del parásito es que en el huésped vertebrado, el amastigote es intracelular. Por tanto, la inmunidad

protectora contra la Leishmaniasis, depende de linfocitos T específicos y no de anticuerpos (4,5,6,7). Mas aún, se ha comprobado que la resolución o progresión de la enfermedad en el ratón, y muy probablemente también en el humano, depende de la estimulación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o cooperadores (8), pues se requiere de la inducción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina que producen los linfocitos Th-1, para que las lesiones curen apropiadamente (6,9,10). En tanto que la producción de IL-4 e IL-3, no solo por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th-2 sino por células cebadas (11) exacerban las lesiones (7,10). Los macrófagos, por su parte, al ser activados por citocinas como el IFN $\gamma$  (12) o el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)(13), adquieren *in vitro* habilidad citotóxica contra *Leishmania*. Además, la resistencia a la diseminación del parásito parece estar controlada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (14). Se ha demostrado que la administración de IL-12 causa una reducción mayor al 75% del parásito en el sitio de infección en ratones altamente susceptibles BALB/C, mostrándose un aumento de INF- $\gamma$  y una disminución en la producción de IL-4 (15). La IL-12 suprime las células Th-2 y promueve la respuesta de Th-1, en una forma de Leishmaniasis murina dependiente de INF- $\gamma$  (16).

El control epidemiológico de la Leishmaniasis depende de la eliminación de los vectores y reservorios, así como de la detección y tratamiento de enfermos. Sin embargo, como existen razones tanto de orden técnico como social, que dificultan el adoptar medidas efectivas que rompan la cadena de transmisión en estos aspectos, se considera que una vacuna representa la única alternativa práctica de prevención en algunos casos (17). En el oriente medio, los programas de vacunación contra la Leishmaniasis, han consistido en la inoculación de cepas atenuadas de *Leishmania* en lugares del cuerpo no visibles, para evitar que la infección natural deje cicatrices desfigurantes, sobre todo en la cara. Esta clase de inmunización, llamada leishmanización, es una infección controlada, que sin embargo, puede ser tan severa como la infección natural en algunos individuos(18). Aunque se han logrado avances importantes en el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis, todavía no hay un inmunógeno cuya aceptación sea general(19). Las vacunas de parásitos muertos se tienen que administrar por vía intramuscular y han dado resultados muy variables (20).

La glicoproteína principal del promastigote (GP63) que pesa de 63 a 68 kDa, es una endopeptidasa dependiente de Zinc que es inhibida por el 1.10 fenantrolina y iones de metales pesados, recientes estudios indican que la GP63 presenta un pH ácido (21, 22). Esta proteína es expresada como una proteasa de superficie anfifílica, en el promastigote comprende cerca del 1% de la proteína celular.

Recientemente se ha demostrado que el cDNA de la GP63 de *Leishmania mexicana* se divide en tres clases: C1, C2 y C3. (23). Siendo de gran importancia el hecho de que los genes de C1 presentan una regulación selectiva en el estadio de amastigote y estos codifican para una proteína con un carboxilo terminal el cual carece de sitio de anclaje a la membrana (23). La glicoproteína GP63 se encuentra presente en los dos estadios del ciclo vital del parásito en todas las especies de *Leishmania* que se han estudiado hasta la fecha (24,25,26). Inicialmente, esta proteína se logró purificar de la superficie de promastigotes de *Leishmania major* mediante extracción con Tritón X-114 y cromatografía de intercambio iónico (21). El gene ha sido clonado y se ha logrado producir la proteína recombinante (27). Actualmente, se conoce la estructura primaria de GP63 en diversa especies de *Leishmania* y se sabe que existe gran homología entre ellas.

Esta proteína tiene propiedades biológicas posiblemente relacionadas con los mecanismos patogénicos del parásito, como son su actividad proteolítica (22) y la capacidad de unirse al receptor de C3 en el macrófago (CD11b/18) (28). Se ha comprobado que GP63 es necesaria para que el parásito se adhiera al macrófago cuando los mosquitos inyectan los promastigotes al huésped (29), pues se sabe que los anticuerpos contra GP63 son capaces de bloquear este proceso y se considera que este paso es esencial para la internalización del parásito (30). Una vez dentro del macrófago, la actividad proteolítica de GP63 protege al parásito de la acción de las enzimas lisosomales, ya que se ha demostrado que liposomas que contienen GP63 activa no son destruidos por los macrófagos (31, 32). Por otro lado se ha demostrado que las GP63 de *Leishmania major* y *Leishmania donovani* son capaces de romper a la molécula CD4<sup>+</sup> de linfocitos T (33). Esta proteína es además, uno de los blancos principales de la respuesta inmune del huésped, pues es la principalmente reconocida por humanos, hámsteres y ratones infectados (26).

Estas observaciones sugieren que GP63 es capaz de inducir respuesta inmune protectora, y por tanto es candidato a formar parte de una vacuna (34). En el modelo murino, se ha logrado inducir protección al administrar GP63 incluida en liposomas (32) y esta protección puede ser transferida a través de linfocitos T específicos a ratones susceptibles. Sin embargo, para lograr protección es necesaria la administración intravenosa o intraperitoneal de los liposomas y la proteína recombinante soluble ha dado resultados contradictorios (35).

Por último, se han identificado epítomos de células T en GP63 de *Leishmania major* (36) y se sabe que la respuesta inmune a esta proteína en el ratón se encuentra controlada genéticamente (37) y también en el modelo murino, ha sido posible inducir protección, utilizando *Salmonella typhimurium aroA* como acarreador de GP63 de *Leishmania major* (38).

## II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.

No se conoce con exactitud la magnitud del problema de la Leishmaniasis en México. Sin embargo, se supone que se encuentra ampliamente distribuida en el país, si se considera que el vector *Lutzomyia olmeca*, sobrevive en una amplia proporción del territorio nacional. Se calcula que en México puede haber hasta 10 mil casos nuevos cada año, muchos de los cuales tendrán cicatrices desfigurantes permanentes y difícilmente recibirán tratamiento adecuado, pues los medicamentos antiparasitarios son caros y en general no están disponibles. Por otro lado, el control de los vectores y reservorios es poco factible. Una alternativa a este problema, es la obtención de una vacuna utilizando *Salmonella typhi* como acarreador de antígenos, pues ofrece ventajas teóricas contra la infección por microorganismos intracelulares, ya que induce respuesta inmune celular capaz de activar los mecanismos de eliminación de los parásitos. En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMI), en colaboración con el Centro para Desarrollo de Vacunas (CVD) de la Universidad de Maryland en Baltimore, se construyó una cepa de *Salmonella typhi* atenuada que expresa constitutivamente a la GP63 de *Leishmania mexicana* (39). Resultados preliminares muestran que este candidato a vacuna confiere protección en ratones contra el reto del parásito, en ausencia de anticuerpos (40). El mecanismo por medio del cual la cepa vacunal es capaz de conferir protección no ha sido aclarado, pero parece involucrar mecanismos de inmunidad celular.

Actualmente, se sabe que existen dos vías para el procesamiento y presentación de antígenos: La vía exógena, donde los antígenos (fundamentalmente bacterias) son fagocitadas y procesados en el fagolisosoma y presentados en el contexto de moléculas del MHC de clase II; y la vía endógena donde el antígeno se procesa en el citosol y se transporta al sistema retículo endotelial y se presenta en el contexto de moléculas del MHC de clase I. Existen evidencias de que algunos antígenos recombinantes expresados en bacterias pueden ser presentados en el contexto de moléculas del MHC de clase I (20). Este mecanismo es muy importante en el caso de la Leishmaniasis pues se sabe que la inmunidad protectora no depende de anticuerpos, sin embargo esto no se ha estudiado todavía. Para evaluar la capacidad de *Leishmania mexicana* y de la cepa vacunal *Salmonella typhi* CVD9082MGP63 para generar inmunidad mediada por células citotóxicas es necesario contar primero con una línea celular que exprese de manera constitutiva los antígenos del parásito.

### III. OBJETIVOS.

#### 1. Objetivo general.

Construir una línea celular murina capaz de expresar de manera estable GP63 de *Leishmania mexicana*.

#### 2. Objetivos particulares.

Construir el vector de expresión pIQSHY.1 que permita la transfección de las células P815, para que produzcan de manera estable, la proteína GP63 de *Leishmania mexicana*.

Verificar la expresión de la GP63 de *Leishmania mexicana* en la línea celular murina, transfectados con dicha proteína.

#### IV. HIPOTESIS.

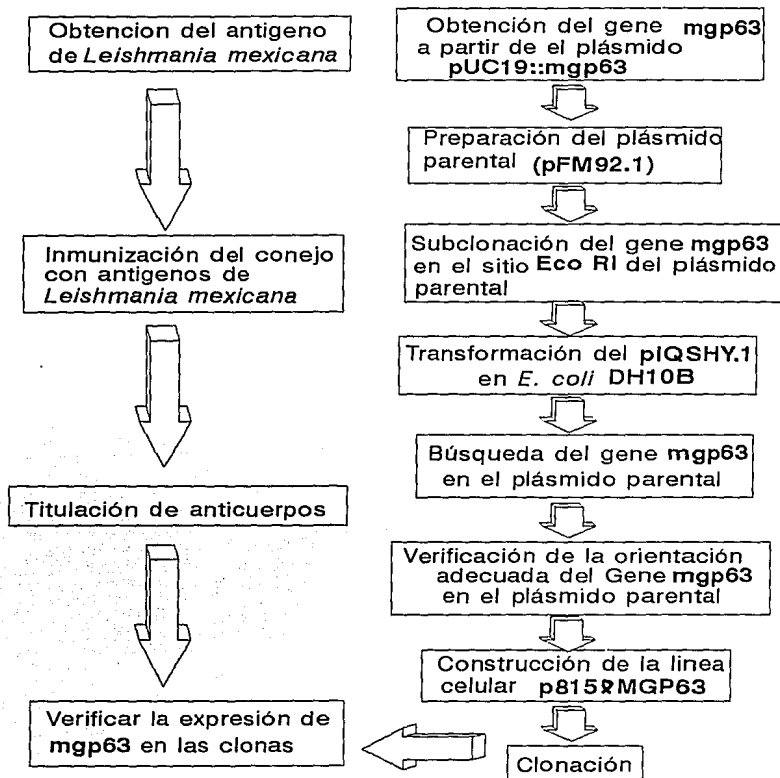
La línea celular murina P815 transfectada con el pIQSHY.1 que conteniendo el gene *mgp63* será capaz de producir una forma citosólica recombinante de GP63 no tóxica y estable.



## V. MODELO EXPERIMENTAL.

El modelo experimental se presenta en la Figura No. 1. Brevemente, a partir del plásmido pUC19::mgp63 se purificó el gene que codifica para una forma troncada de GP63 de *Leishmania mexicana* y se subclonó en el plásmido pFM92.1. Con el plásmido resultante se transfectó la línea celular P815. La producción de la proteína recombinante se verificó mediante inmunoelectrotransferencia.

### Figura No.1



## VI. MATERIALES Y METODOS.

### 1. Parásitos.

La cepa de *Leishmania mexicana mexicana* fue donada por el CVD, Universidad de Maryland en Baltimore (UMAB).

Se cultivó en medio de Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino, a temperatura ambiente, durante tres semanas.

### 2. Cepas bacterianas.

a) *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . De la colección de la UIMI.

b) *Escherichia coli* DH10B (GIBCO, BRL).

c) *Salmonella typhi* CVD908. Donado por el CVD (41).

d) *Salmonella typhi* CVD908 $\Delta$ mgp63 (Construida en la UIMI en colaboración con el CVD).

Se cultivaron en caldo BHI, durante 24 hrs a 37°C. En caso de las células transformadas con plásmidos, se agregaron 75  $\mu$ g/ml de ampicilina (Sector Salud).

### 3. Plásmidos

a) pUC19. De la colección de la UIMI

b) pKK223-3. De la colección de la UIMI

c) pKK223::gp63 Construido por la UIMI en colaboración con el CVD

d) pUC19::mgp63. Construido por la UIMI en colaboración con el CVD. Contiene el gene que codifica para la forma madura de gp63 (1.5 Kb) (Figura No. 1).

e) pH $\beta$ actinPri1-Neo-XB (pFM92.1). Donado por el Dr. Frank Momburg, Instituto de Inmunología y genética del Centro Alemán de Investigación en Oncología, Alemania. (Figura No. 2).

f) pFM92.1::mgp63 (pIQSHY.1) Se reporta en este trabajo.

FIGURA No 2. Mapa del plásmido pUC19::mgp63

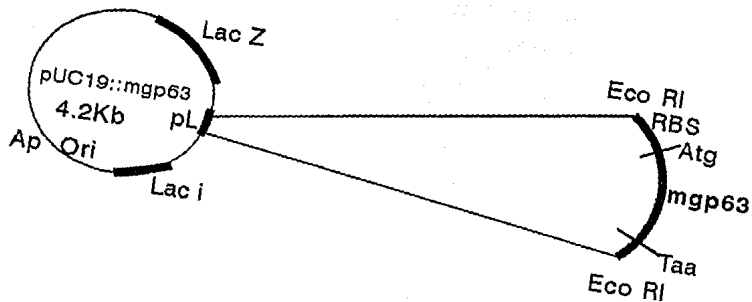
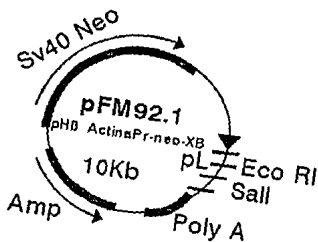


FIGURA No 3. Mapa del plásmido pFM92.1



#### 4. Líneas celulares.

P815. (ATCC TIB 64) Mastocitoma de ratón, se cultiva a partir de un tumor DBA/2 de ratón, se utiliza como una línea celular para ensayos de citotoxicidad en células T. Estas células no presentan una actividad efectora en un sistema de citotoxicidad mediado por células dependientes de anticuerpos.

P815CΩMGP63. Se reporta en el presente trabajo.

Fueron cultivadas en medio RPMI, suplementado con L-glutamina, piruvato, penicilina, gentamicina y complementado con SFB al 10%.

#### 5. Ingeniería genética.

La manipulación del DNA se realizó de acuerdo a los métodos y procedimientos recomendados por Sambrook (42).

##### 5.1 Digestión de DNA.

La concentración del DNA utilizado fue estimada mediante la comparación de un estándar de 1 Kb DNA Ladder (GIBCO, BRL). Aproximadamente 10 µg de DNA plasmídico fueron depositados en tubos Eppendorf. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 50 µl, durante dos horas, adicionando 1 µl de la enzima de restricción, 5 µl de amortiguador y 45 µl de agua estéril inyectable.

##### 5.2. Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en agarosa (Ultra pure, GIBCO, BRL) al 1 %, en una cámara horizontal (Horizon 5-8, BRL), con 5 µl de DNA a 75 V (15V/cm<sup>3</sup>), durante 45 min utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). La agarosa contenía 1 µg de bromuro de etidio, al terminar el corrimiento el gel se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta para ser fotografiado.

##### 5.3. Purificación de fragmentos.

Los fragmentos fueron cortados de los geles de agarosa y depositados en tubos Eppendorf para su purificación mediante GeneClean<sup>R</sup> (43). Brevemente, se agregaron 800 µl de NaI 6 M, incubándose a 56°C hasta que la agarosa se disolvió, se le agregó 5 µl de perlas de vidrio, se incubó en hielo durante 1/2 hr (agitando el tubo frecuentemente), enseguida se centrifugó 1 min 6,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, las perlas de vidrio se lavaron tres veces con una solución amortiguadora (NaCl 50 mM, y Etanol al 50% ), se resuspendieron después en 50 µl de agua estéril, se dejaron 20 min a 56°C, se centrifugó de nuevo y el

sobrenadante se trasladó a un tubo limpio. Las perlas fueron mezcladas en 20  $\mu$ l de agua inyectable e incubadas 20 min más a 56°C, el sobrenadante se recuperó. Por último se realizó una electroforesis en gel de agarosa, para verificar la presencia de DNA.

#### 5.4. Ligación.

En un tubo Eppendorf se mezclaron 15  $\mu$ l de el plásmido pFM92.1 linearizado mediante digestión con enzimas de restricción, mas 30  $\mu$ l del gene mgp63 (1.5 Kb) purificado por GeneClean<sup>R</sup>, se agregaron 4  $\mu$ l de amortiguador para enzima T<sub>4</sub> ligasa (GIBCO, BRL), 1  $\mu$ l de dicha enzima y 60  $\mu$ l de agua estéril y se incubó a 15 °C toda la noche.

#### 5.5. Transformación.

Se cultivó *Escherichia coli* DH10B en 50 ml de medio BHI, hasta fase logarítmica. Se cosechó la bacteria por centrifugación a 6,000 rpm durante 10 min y se lavó dos veces con la mezcla de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, glucosa 50 mM, y Tris-HCl 10mM (pH 7.5) fría. La pastilla bacteriana resultante fue resuspendida en 1 ml de la mezcla anterior e incubada toda la noche a 4°C. Posteriormente 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana se depositaron en un tubo Eppendorf y se les adicionó 30  $\mu$ l de la mezcla de ligación la mezcla se dejó 20 min en hielo. Posteriormente, se sumergió se incubó la mezcla a 42°C durante 1 min y se dejó 5 min en hielo, se le agregó 1 ml de medio SOC (250 mM de KCl, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, triptona 2 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 20 mM para un litro), se agitó y se incubó durante 45 min a 37°C. Por último, 100  $\mu$ l del cultivo anterior se sembró en una placa de medio BHI que contenía 75  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubó a 37°C durante 24 hrs.

#### 5.6. Identificación de las colonias transformadas.

Las colonias transformantes se seleccionaron por su crecimiento en BHI conteniendo ampicilina. Las colonias resistentes se sembraron en placas y se crecieron por separado en 3 ml de caldo BHI, se cosecharon y lavaron 1 vez con PBS Tween. Posteriormente, se realizó una minipreparación para extracción de DNA plasmídico. Brevemente, a la pastilla bacteriana se le adicionaron 200  $\mu$ l de TELT (Triton X100, EDTA 65 mM y LiCl 2.5 M) y 20  $\mu$ g de lizosima, la mezcla se agitó vigorosamente y se sometió a ebullición durante 1 min, se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 100  $\mu$ l de isopropanol frío, se mezcló y se centrifugó nuevamente a 6,000 rpm a 4°C durante 10 min, la pastilla resultante que corresponde al DNA plasmídico se lavó 1 vez con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua.

## 6. Construcción de la línea celular P815ΩMGP63.

### 6.1. Transfección con el DNA plasmídico.

El plásmido pIQSHY.1 se introdujo en la línea celular Ltk-(H-2k) P815 mediante electroporación, utilizando un aparato Cell-Porator, GIBCO, BRL. Brevemente, aproximadamente  $5 \times 10^6$  células fueron cosechadas a 1200 rpm durante 10 min lavadas dos veces con D-PBS y resuspendidas en 3 ml de RPMI sin suero, dichas células fueron mezcladas con aproximadamente 500  $\mu$ g de pIQSHY.1 y la mezcla se depositó en celdas para electroporar, las condiciones fueron 800  $\mu$ f y 200 V durante 1 seg. Después de recibir el choque eléctrico, las células se incubaron 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se transfirieron a botellas de cultivo (Nunc) en 6 ml de medio RPMI complementado con SFB al 10% y se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 hrs. Las células transfectantes se seleccionaron por su resistencia a la neomicina (G-418, 800  $\mu$ g/ml GIBCO, BRL).

### 6.2. Clonación

Se realizó por el método de dilución limitante para tener 0.3 células por pozo utilizando placas de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo (Nunc), el crecimiento celular se evaluó a las tres semanas. Posterior a esto se evaluó la capacidad de producir la proteína recombinante de las clonas, mediante inmunopunto. Se seleccionaron las clonas positivas, se expandieron y congelaron. Posteriormente se verificó la presencia del gene mgp63 mediante Southern Blot, utilizando como control negativo las células P815 no transfectadas y se evaluó nuevamente la capacidad para expresar la proteína recombinante, mediante inmunopunto e inmunoelectrotransferencia.

## 7. Verificación de la presencia del gene mgp63 en la línea P815ΩMGP63.

### 7.1. Extracción de DNA genómico.

La extracción se realizó a partir de  $3 \times 10^6$  células cosechadas y lavadas dos veces con D-PBS. Se resuspendieron en 500  $\mu$ l de amortiguador TAIL (Tris 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS 1%), se les adicionó 40  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml), incubándose a 56°C, toda la noche. Posteriormente se les adicionó 20  $\mu$ l de RNAasa (1 mg/ml) incubando 2 hrs a 37°C con agitación. Después se adicionó a la mezcla 500  $\mu$ l de fenol puro y se agitó durante 20 min lentamente y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm, transfiriendo la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionó 500  $\mu$ l de fenol/cloroformo (24:23) se agitó nuevamente durante 20 min y se centrifugó, se recuperó la fase acuosa pasándose a un tubo nuevo al que se

le agregó 500  $\mu$ l de cloroformo, agitando 20 min y se centrifugó como ya se indicó. Posteriormente se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío, se agitó vigorosamente hasta obtener un agregado de DNA, se centrifugó durante 5 min a 10,000 rpm y se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua estéril.

## 7.2. Hibridación de DNA.

Se realizó mediante el método descrito por Southern (44). El DNA genómico de la línea P815 $\Omega$ MGP63 se digirió toda la noche con la enzima de restricción EcoRI. Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% a 25 V en una cámara Horizon 11-14 (BRL) durante 20 hrs en amortiguador TAE 1X (la agarosa contenía 0.5  $\mu$ g de bromuro de etidio). Después de esto el gel se sumergió en amortiguador desnaturante (NaOH 0.5 M, NaCl 1 M), durante 30 min, se enjuagó con agua desionizada y se sumergió en amortiguador neutralizante (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 3 M pH= 7.4), por 30 min. El DNA se transfirió a papel de nitrocelulosa y se fijó mediante la utilización de luz UV.

La sonda empleada en la hibridación se preparó de acuerdo al método de iniciador al azar ("Random Primer"), de la manera siguiente: Aproximadamente 100  $\mu$ g de DNA que corresponde al gene *mgp63*, se desnaturizó por ebullición durante 10 min y se transfirió a hielo por 5 min, posteriormente se le adicionó 3  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos (sin CTP), 2  $\mu$ l de amortiguador para la polimerasa Klenow (Fragmento largo de la DNA polimerasa I), 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -CTP marcada con  $P^{32}$ , 1  $\mu$ l de dicha enzima y se llevó a 20  $\mu$ l de reacción con agua estéril. Se incubó 2 hrs a 37°C. Después de lo anterior la sonda marcada se purificó mediante una columna de Sephadex G-50 (Sigma).

La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X (20 X se disolvió 175.3 g de NaCl, 27.6 g de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  y 7.4 g de EDTA en 800 ml de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se llevó a un litro, esterilizando en autoclave), DENHARDT 10% (Ficoll 10 g, Pup 10 g, BSA (fracción V) 10 g en un litro de agua estéril), SDS 20%), y la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada) incubando toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana tres veces durante 15 min. a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se dejó exponer ante una película (Kodak), durante 24 hrs.

## 8. Expresión de GP63

La expresión de GP63 recombinante se verificó por inmunopunto e inmunolectrotransferencia.

### 8.1 Inmunopunto.

Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células transfectantes P815 $\Omega$ MGP63 fueron centrifugadas y la pastilla se disolvió en 100  $\mu$ l de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, aprotinina 2  $\mu$ g/ml, leucopetina 2  $\mu$ g/ml y pepstatina 1  $\mu$ g/ml), y se transfirió a membranas de nitrocelulosa mediante un aparato de vacío. El papel se bloqueó con PBS-gelatina al 2 % durante 2 hrs a 37°C y se incubó con el suero IQ-L01 (se define mas adelante) durante 1 hr, y por último se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para revelar la presencia de la GP63 recombinante. Revelando la reacción inmunológica con  $\alpha$ -4-Cloro Naftol- $H_2O_2$  (Sigma), realizándose lavados entre las incubaciones con PBS-Tween 20 al 0.01 % a 37°C

### 8.2 Inmunolectrotransferencia.

Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células P815 $\Omega$ MGP63 fueron centrifugadas y la pastilla celular fue disuelta en 40  $\mu$ l de amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS al 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005 %), y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (45). Como controles se incluyeron P815 no transfectada, cultivos de pKK22-3::mgp63 y cultivo de pKK22-3 sin GP63 y antígeno crudo de *Leishmania mexicana*. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin (46). El papel se bloqueó con PBS-SFB 5% por 2 horas. Posteriormente se incubó con el suero IQ-L01, enseguida se incubó con anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma). La reacción inmunológica se reveló con  $\alpha$  4-Cloro Naftol- $H_2O_2$ . Entre las incubaciones se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0.01 %. Todo lo anterior se realizó a una temperatura de 37°C.

## 9. Animales de laboratorio

Se utilizó un conejo de la cepa Nueva Zelanda, de aproximadamente 3 Kg de peso, el cual se mantuvo en el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.



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

El conejo se inmunizó por vía interescapulovertebral con un extracto crudo de *Leishmania mexicana*, 1 mg/ml en 500  $\mu$ l de SS, mezclados con 500  $\mu$ l de adyuvante completo de Freund, recibiendo una dosis cada semana durante 12 semanas, sangrándose el día cero para obtener el suero control (preinmune). La titulación de anticuerpos se realizó en la semana número 12, mediante el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) (47). Brevemente, se titularon los anticuerpos contra antígeno crudo de *Leishmania mexicana* en el suero del conejo el día cero, veinte y treinta. Se sensibilizaron placas de microcultivo de 96 pozos con 10  $\mu$ g/ml de antígeno en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6 1 hr a 37°C. La placa se bloqueó con PBS-SFB al 5 % por 2 hrs a 37°C. El suero del conejo se agregó por duplicado a cinco diluciones (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, y 1:8100), y se incubó a 37°C por 2 hrs. Finalmente, se incubó la placa con el suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa durante 1 hr a 37°C. Posteriormente se agregó el sustrato OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se estabilizó el color con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y se leyó la D.O. a 490 nm. Entre las incubaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01 %.

Al suero hiperinmune de conejo contra el extracto crudo de conejo se le denominó suero IQ-L01.

11. Obtención del antígeno de *Leishmania mexicana*.

Se obtuvo un antígeno crudo de *Leishmania* modificando el método de Bouvier (21). Un cultivo de *Leishmania mexicana* en fase logarítmica se cosechó por centrifugación y se lavó dos veces en un amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 7.4. Los parásitos fueron sometidos a sonicación y las membranas fueron colectadas por ultracentrifugación a 60000 rpm por 45 minutos. La pastilla conteniendo las membranas, se solubilizó con Tritón X-114 a 4°C (48), y finalmente, fue sometida a un gradiente de sacarosa. La composición del antígeno crudo se verificó por SDS-PAGE.

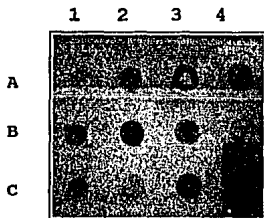
## 1. Construcción del plásmido pIQSHY.1

El plásmido pUC19::m<sub>gp63</sub> contiene el gene sintético que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*. La capacidad de este plásmido para producir una forma madura recombinante de GP63 se verificó mediante inmunopunto (Figura No. 4). Este plásmido fue digerido con la enzima de restricción EcoRI a 37°C durante 2 hrs. La digestión completa, que se observa en la Figura No. 5 (carril 2), generó dos bandas, la banda de 2.8 Kb corresponde al plásmido pUC19 y la banda de 1.5 Kb corresponde al gene m<sub>gp63</sub>. Esta última banda se cortó del gel y fue purificada mediante GeneClean<sup>R</sup>. En la Figura No. 6 se muestra un gel del cual se extrajo la banda de 1.5 Kb. Por otro lado, el plásmido pFM92.1 se linearizó con la enzima EcoRI. En la Figura No. 5, carril 3, se muestra una digestión completa, la cual resulta en un fragmento de 10 Kb. Ambos fragmentos se ligaron y se transformaron en *Escherichia coli* DH10B. Las colonias transformantes resistentes a la ampicilina se aislaron en agar BHI y se crecieron en 3 ml de caldo BHI, del cual se extrajo DNA mediante lisis con TELT-lizosima y posterior precipitación con etanol. La presencia del inserto de 1.5 Kb se verificó al digerir estas colonias con EcoRI. En la Figura No. 7, carril 2 se muestra una colonia con el inserto de 1.5 Kb, el carril 3 muestra el aumento de tamaño (de 10 a 11.5 Kb) en DNA plasmídico linearizado proveniente de una colonia que contiene el inserto, cuando se compara con el plásmido sin el inserto. Para verificar la orientación del inserto de 1.5 Kb las colonias transformantes se digirieron con la enzima SallI. Esta digestión puede dar como resultado dos patrones de restricción; cuando el inserto se incorpora en la orientación contraria al promotor (-) resultan dos bandas, una de 0.4 Kb y otra de 11.1 Kb. Cuando el inserto se incorpora en la orientación del promotor (+), se originan dos bandas una de 1.2 y otra de 10.3 Kb (Figura No 8). En la Figura No. 9 se presentan tres colonias; una contiene al inserto en la orientación (-) (carril 2) y las otras dos en la orientación (+) (carril 3 y 9). Al plásmido pFM92.1 con el inserto m<sub>gp63</sub> en la orientación (+) se le denominó pIQSHY.1.

Mediante inmunopunto no se detectó producción de GP63 por la *Escherichia coli* DH10B transformada con el plásmido pIQSHY.1. (Figura No. 4) debido a que este plásmido contiene el promotor del virus SV40, por tanto no se expresa en células procarióticas.

INMUNOPUNTO QUE VERIFICA LA PRODUCCION DE  
GP63 DE *Leishmania mexicana* POR EL PLASMIDO

pUC19::mgp63.



Carril 1A, *E. coli* DH5apUC19. Carril 2A, *E. coli* DH5apUC19::mgp63.

Carril 3A, *E. coli* DH5apKKK223. Carril 4A, *E. coli* DH5apKKK223::mgp63

Carril 1B, *S. typhi* CVD908. Carril 2B, *S. typhi* CVD908::mgp63.

Carril 3B, *E. coli* DH10B pFM92.1. Carril 4B, *E. coli* DH10B pFM92.1::mgp63

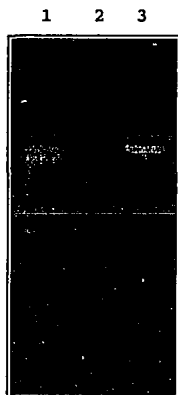
Carril 1C, *E. coli* DH10B. Carril 2C, *E. coli* DH5a

Carril 3C, *E. coli* DH5a pUC19::CSP

En esta figura se muestra la capacidad del plásmido pUC19:: mgp63 para producir la forma madura recombinante de GP63.

FIGURA No 5.

PLASMIDOS pUC19::mgp63 Y pFM92.1 DIGERIDOS CON EcoRI

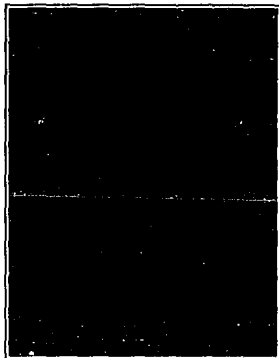


Carril 1, Indicador de 1 Kb. La figura muestra la digestión completa del pUC19::mgp63 con EcoRI que genero dos bandas, la banda de 2.8 Kb corresponde al plásmido pUC19 y la banda de 1.5 Kb corresponde al gene mgp63, carril 2. Y también nos muestra la digestión con EcoRI del pFM92.1 que originó una banda de 10 Kb carril 3.

FIGURA No 6.

PURIFICACION DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA FORMA MADURA DE GP63 DE *Leishmani mexicana*

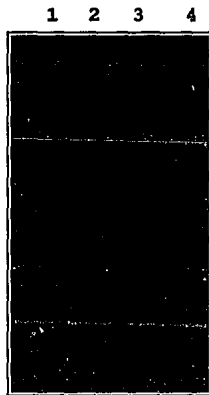
1 2 3 4 5 6



Carril 1. Indicador de 1 Kb. Carriles 2 a 6, pUC19::mgp63 digerido con Eco RI, en donde la banda de 1.5Kb que corresponde al gene mgp63 fue cortado del gel de agarosa para su purificación.

FIGURA No 7.

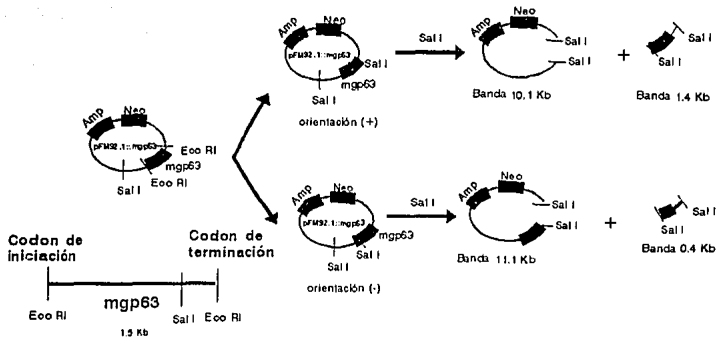
VERIFICACION DE LA PRESENCIA DEL GENE *mgp63* EN EL PLASMIDO *pIQSHY.1*.



Carril 1, Indicador de 1 Kb. Carril 2, *pIQSHY.1* digerido con *EcoRI*. Carril 3, *pFM92.1* digerido con *NdeI*. Carril 4, *pIQSHY.1* digerido con *NdeI*.

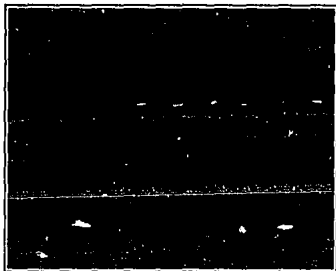
La figura nos muestra la presencia del gene *mgp63*, dentro del plásmido *pFM92.1*, despues de haber digerido una clona con la enzima de restricción *EcoRI*.

FIGURA No 8



Esta figura nos muestra las dos direcciones en las que el inserto *mgp63*, puede entrar en el plásmido parental.

VERIFICACION DE LA ORIENTACION DEL GENE mgP63 EN EL PLASMIDO pIQSHY.1



Carril 1, Indicador de 1 Kb. Carril 2, Clona 19 digerida con SallI. Carril 3, Clona 43 digerida con SallI. Carril 4-8, pFM92.1 digerido con SallI. Carril 9, Clona 44 digerido con SallI.

En esta figura se muestra una colonia, que contiene el inserto en la orientación contraria del promotor (-) carril 2. Y dos colonias que contienen el inserto en la orientación del promotor (+) carril 3 y 9.



## 2. Construcción de la línea celular P815ΩMGP63.

El plásmido pIQSHY.1 se introdujo en la línea celular P815 mediante electroporación y las células transfectantes se seleccionaron por su resistencia a G418, pues el plásmido pIQSHY.1 contiene esta resistencia. Las células fueron clonadas mediante el método de dilución limitante.

La presencia del gene *mgp63* en las células P815 se demostró mediante Southern Blot, utilizando como sonda marcando con  $P^{32}$  el fragmento de 1.5 Kb que resulta de la digestión del plásmido pUC19::*mgp63* con *EcoRI*, que corresponde al gene *mgp63*. En la Figura No. 10 se presentan dos clonas de células transfectadas. En los dos primeros carriles se observan dos clonas y en el último carril se observa el plásmido pIQSHY.1 como testigo positivo. Cabe mencionar que el DNA genómico de las líneas transfectadas fue digerido con *EcoRI* por lo que la hibridación muestra la banda esperada de 1.5 Kb que corresponde al gene *mgp63*. A la línea celular que contiene el gene que codifica para la forma madura de GP63 se le denominó P815ΩMGP63.

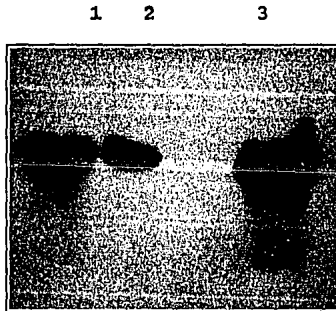
## 3. Expresión de GP63 en la línea P815ΩMGP63.

La expresión de la proteína GP63 en las línea P815ΩMGP63 se demostró mediante inmunopunto. En la Figura No. 11 se muestran varias clonas que reconoce el suero IQ-L01, como testigos positivos se emplearon proteínas de *Leishmania mexicana* y el plásmido pKK223::*gp63*, el testigo negativo fue la línea celular P815 no transfectada.

En la Figura No. 12 se presenta una inmunoelectrotransferencia de extractos crudos de proteínas provenientes de varias clonas de la línea P815ΩMGP63. Se observa que el suero IQ-L01 reconoce en la línea transfectada una banda en la región de 60 kDa y otras dos en la región de 40 kDa (carriles 1, 2 y 3) las cuales no están presentes en línea P815 (carriles 4 y 5). Estas proteínas corresponden a la forma madura de GP63 y probablemente a variantes que resultan de su actividad catalítica.

FIGURA No 10

SOUTHERN BLOT DE LA LINEA CELULAR P815ΩMGP63.

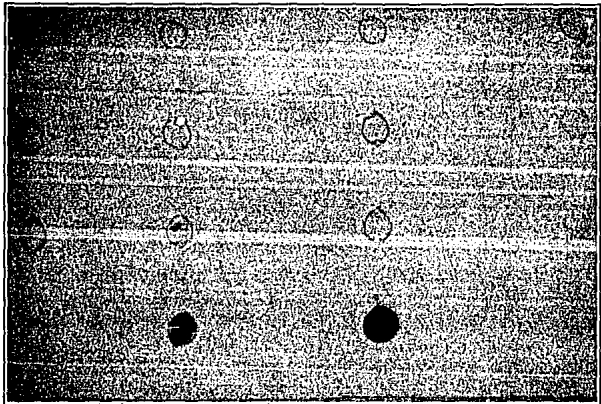


Carril 1 y 2, P815 transfectadas con el gene mgp63.

Carril 3, Plásmido pIQSHY.1 (testigo positivo).

La figura nos muestra la presencia del gene foráneo dentro de las células transfectadas con el plásmido pIQSHY.1

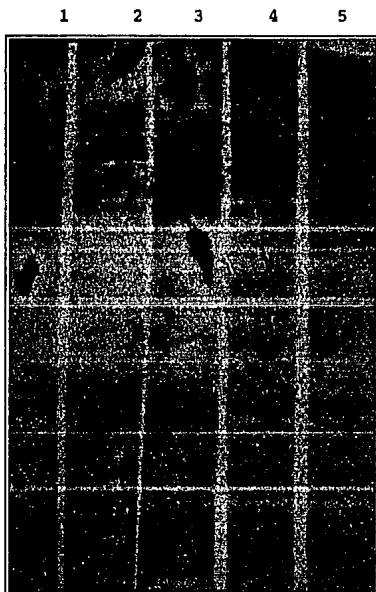
INMUNOPUNTO DE LA LINEA CELULAR P815ΩMGP63.



Se presentan diversas clonas que expresan la GP63 de *Leishmania mexicana*. Utilizando como control positivo proteínas de *Leishmania* y la bacteria que contiene el plásmido pKK223::mgp63, que corresponden a los puntos más visibles.

FIGURA No 12.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LA LINEA CELULAR P815ΩMGP63



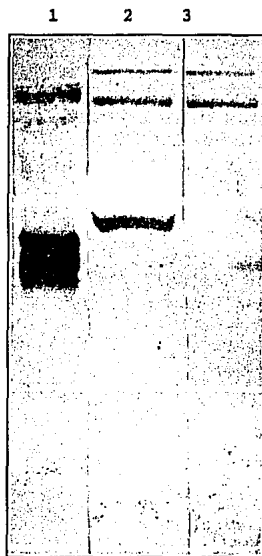
Carril 1 a 3. Tres diferentes clones de P815 transfectadas con el Gene que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*. Carril 4 y 5 células P815 no transfectadas.

La figura nos muestra la expresión de la proteína GP63, por las células P815ΩMGP63.

FIGURA No 13.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA QUE DE MUESTRA LA

EXPRESION DE LA FORMA MADURA DE GP63 EN *Salmonella typhi* aroC(-), aroD(-)



Carril 1, Proteínas de *Leishmania mexicana*. Carril 2, *Salmonella typhi* CVD908. Carril 3, *Salmonella typhi* CVD908 $\Omega$ mgp63.

En esta figura se muestra la exxpresión de la GP63 por la *Salmonel typhi* CVD908 $\Omega$ MGP63, carril 3.

## VIII. DISCUSION.

El gene que codifica para la GP63 de *Leishmania mexicana* fue originalmente proporcionado por el Dr. David Russel (Universidad de Washington) en el plásmido pSKC1. A partir de este plásmido, se obtuvo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) una forma madura de GP63 que comprende de la base 507 a la 2060, eliminando las regiones que codifican para los primeros 102 aminoácidos de la preproteína (23). El gene sintético, denominado *mgp63*, contiene sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en ambos extremos, así como su propio sitio de unión a ribosomas y codones de iniciación y terminación. Este gene sintético fue insertado en los plásmidos pUC19 y pKK223-3. Posteriormente, con el propósito de construir un candidato a vacuna contra la Leishmaniasis, en unión del promotor *tac* se integró en el cromosoma de *Salmonella typhi* CDV908 (*aroC*, *aroD*). Esta cepa bacteriana contiene mutaciones definidas que causan la dependencia nutricional de la bacteria por metabolitos que no se encuentran en los tejidos de los mamíferos, por lo que no es capaz de sobrevivir en ellos. La expresión de la forma madura de GP63 en *Salmonella typhi* CVD908RMGP63 se presenta en la inmunoelectrotransferencia de la Figura No. 13. El patrón electroforético muestra una proteína de aproximadamente 40 KDa, este comportamiento ha sido reportado anteriormente y se atribuye a la actividad catalítica de la GP63 (33). En la UIMI, sin embargo, aún no se ha evaluado esta actividad biológica en la proteína madura recombinante. Para disminuir el riesgo de toxicidad de esta proteína recombinante se diseñó de tal modo que permanezca en el citosol, pues se eliminó la secuencia que codifica para el péptido líder.

Resultados preliminares de experimentos realizados en la UIMI, muestran que el candidato a vacuna *Salmonella typhi* CVD908RMGP63 confiere protección a ratones contra el reto de promastigotes de *Leishmania mexicana* (40). La protección debe estar asociada a dos posibles mecanismos; la estimulación de inmunidad celular (activación de macrófagos) o bien con la generación de citotoxicidad mediada por linfocitos T porque no ha sido posible demostrar que los ratones producen anticuerpos contra *Leishmania mexicana*.

El empleo de *Salmonella typhi*, como acarreador de antígenos recombinantes, tiene un gran potencial en la protección contra aquellos patógenos, que como *Leishmania*, ganan rápidamente un habitat intracelular en los fagocitos profesionales mononucleares, donde generalmente viven por largos periodos de tiempo escapando de la acción de los anticuerpos y del complemento. En estos casos, es deseable una vacuna que genere linfocitos T capaces de reconocer y destruir al parásito dentro del macrófago, o bien induzca linfocitos T, que a su vez activen a los macrófagos.

El uso de *Salmonella* como vector vivo tiene un potencial extraordinario en el campo de las vacunas. Entre las ventajas que representa su uso, se encuentra el hecho de que puede ser administrada por vía oral, lo cual es especialmente conveniente en los países subdesarrollados donde las condiciones de refrigeración, equipo, jeringas y personal entrenado suele ser deficiente. Por otro lado, *Salmonella typhi* estimula una amplia gama de respuesta inmune entre ellas la mediada por células, incluyendo aquella dirigida contra los antígenos heterólogos que acarrea. Además utilizar esta bacteria como acarreador de antígenos, ofrece la oportunidad de generar vacunas polivalentes pues es posible integrar diferentes antígenos en otros loci del cromosoma (49).

Las vacunas recombinantes en vectores, generalmente se construyen de tal manera que los epitopos de interés se expresen en la superficie microbiana, donde sean accesibles a las células del sistema inmune. Sin embargo, se ha demostrado que la distinta compartimentalización de los antígenos no resulta en grandes diferencias en la eficiencia como los antígenos son procesados y presentados. Siendo un parámetro más importante la disponibilidad del antígeno. Es decir la cantidad de proteína recombinante que el vector bacteriano es capaz de producir (50). Por ello, se espera que la proteína mGP63 diseñada para que permanezca en el citosol sea tan inmunogénica como la proteína original que se presenta en la superficie del promastigote de *Leishmania mexicana*.

El hecho de que se haya logrado inducir protección en ratones inmunizados con la bacteria acarreadora de GP63, sin que se pudiesen detectar anticuerpos, es consecuente con el conocimiento actual de la respuesta inmune contra *Leishmania*. Se han descrito dos subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, o cooperadores, con funciones mutuamente reguladoras y que producen diferentes linfocinas. Los linfocitos Th-1, secretan preferentemente IL-2 e IFN- $\gamma$ , las cuales estimulan la inmunidad mediada por células (activación de macrófagos); en tanto que los linfocitos Th-2, producen IL-4, IL-5 e IL-6, linfocinas que juegan un papel muy importante en la producción de anticuerpos (Figura No. 14) (51). En el caso de la Leishmaniasis, se sabe que las líneas celulares que transfieren protección pertenecen a la subclase Th-1, en tanto que las que exacerban la enfermedad son Th-2 (7). Además, en los ratones susceptibles BALB/C responden a la infección con *Leishmania* preferentemente con linfocitos Th-1, lo cual deriva en la progresión de la enfermedad. En tanto que los ratones resistentes C57Bl/6 presentan inmunidad protectora mediada por linfocitos CD4<sup>+</sup> Th-2 (5). Por ello, resulta atractivo pensar que el candidato a vacuna *Salmonella typhi* CVD908 $\Omega$ mGP63 induce protección porque activa preferentemente una clase de respuesta inmune que lleva a la activación de macrófagos, los que a su vez son capaces de controlar la infección intracelular por el parásito. Si bien, no existen aún en la UIMI evidencias experimentales que prueben esta hipótesis, otros autores han

demostrado que una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* acarreadora de GP63 induce protección en ratones mediante la estimulación preferente de linfocitos CD4<sup>+</sup> Th-1 (38).

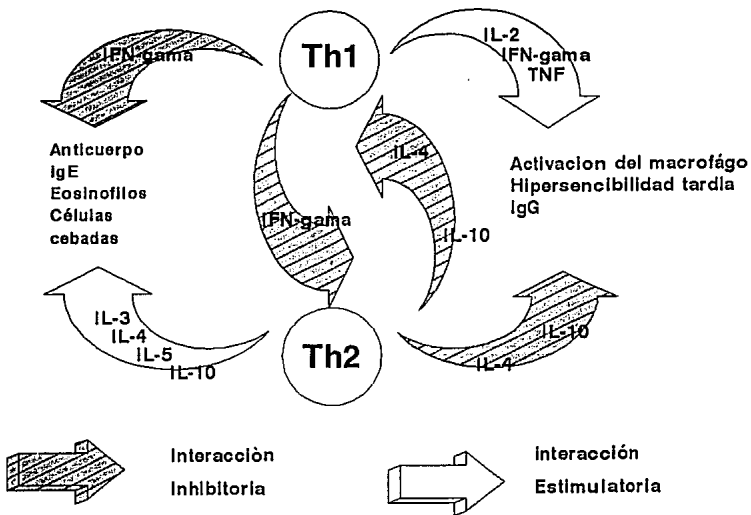
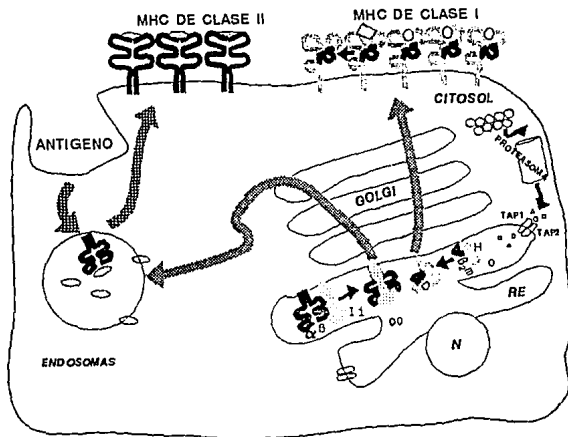


FIGURA No 14. Los linfocitos Th-1, secretan preferentemente IL-2 e IFN- $\gamma$ , las cuales estimulan la inmunidad mediada por células; en tanto que los linfocitos Th-2, producen IL-4, IL-5 e IL-6, linfocinas que juegan un papel muy importante en la producción de anticuerpos.



El mecanismo efector mediado por CTL es mas difícil de explicar. Se sabe que existen dos vías fundamentales a través de las cuales antígenos protéicos son procesados y presentados (52). Los antígenos exógenos, como *Salmonella* y los antígenos solubles, son fagocitados, ingresan a la vía metabólica endosomal y los péptidos resultantes son presentados en la membrana celular en asociación a moléculas del MHC de clase II, por lo que son capaces de activar a células CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, los antígenos sintetizados de manera endógena, principalmente las proteínas provenientes de infecciones virales, se procesan en el citosol, se transportan al retículo endoplásmico y se presentan en la membrana celular asociados a moléculas de clase I y consecuentemente activan a células CD8<sup>+</sup>, que tienen función citotóxica y son el principal mecanismo de defensa contra infecciones virales (Figura No. 15) (53).



**FIGURA No 15.** Vías fundamentales de procesamiento y presentación de antígeno por el complejo principal de histocompatibilidad.

En diversos modelos experimentales se ha tratado de generar células citotóxicas contra antígenos solubles, los resultados demuestran que es difícil inducir este tipo de respuestas de manera reproducible y que son necesarias múltiples inmunizaciones con altas concentraciones de antígeno para obtener respuestas débiles. Además, no se conoce la duración o memoria en estos casos y no se sabe si tienen alguna relevancia *in vivo* (54). Sin embargo, los antígenos protéicos solubles incluidos en liposomas sensibles a ácido, pueden entrar al citosol y ser procesados por la vía endógena y ser presentados en el contexto de moléculas de clase I (55).

La capacidad de bacterias para generar respuestas de CTL también es controversial. Mientras que algunos autores reportan evidencias de que ciertos antígenos recombinantes, expresados en bacterias pueden ser presentados en el contexto de moléculas de clase I y por tanto, generar CTL (56, 57). Otros no han logrado inducir este tipo de respuestas contra los antígenos acarreados por *Salmonella* (58) y otros más han demostrado que la inducción de CTL parece estar asociada con la cantidad de proteína recombinante que se produce y, en su caso, con la estabilidad de los plásmidos (59).

Varias son las posibles vías que pudiesen seguir los péptidos inmunogénicos provenientes de *Salmonella* para alcanzar a moléculas del MHC de clase I. La bacteria, o sus productos pudiesen escapar de los fagolisosomas y las proteínas ser procesadas en el citosol. Por otro lado, las proteínas pudiesen ser degradadas hasta péptidos en el fagolisosoma y posteriormente secretadas a la membrana celular donde se unirían a moléculas del MHC de clase I vacías o conteniendo péptidos de menor afinidad (Figura No. 16). Esta última hipótesis ha sido evaluada en la UIMI, en experimentos preliminares se ha observado que los macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* secretan al medio péptidos que pueden unirse a moléculas de clase I vacías (60).

Para evaluar la capacidad de *Salmonella typhi* CVD908MGP63 para inducir CTL contra antígenos de *Leishmania mexicana*, se requiere de una línea celular que exprese de manera constitutiva epitopos de GP63 que se presenten en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I y que sirva como blanco de CTL. El propósito de este trabajo fue construir esta línea celular, la cual será una herramienta muy importante para aclarar algunos mecanismos en la protección que confiere una cepa atenuada de *Salmonella typhi* que acarrea antígenos de *Leishmania mexicana*.

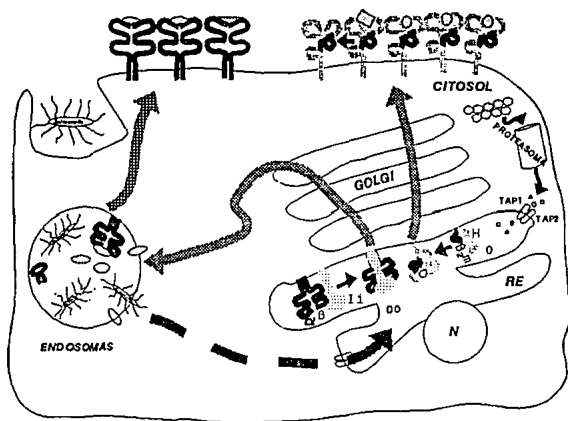


FIGURA No 16. Vía propuesta de procesamiento y presentación de *Salmonella typhimurium* por el complejo principal de histocompatibilidad.

## IX. CONCLUSIONES.

Se construyó el plásmido pIQSHY.1 que contiene el gene que codifica para una forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*.

Se transfectó a la línea celular P815 con el plásmido pIQSHY.1, obteniéndose así una línea celular murina que contiene el gene que codifica para la forma madura de GP63 de *Leishmania mexicana*.

Las células transfectantes ( P815MGP63 ) expresan de manera constitutiva GP63 de *Leishmania mexicana*. Sin embargo, aún queda por demostrar que los péptidos que se originen del procesamiento endógeno de la proteína GP63 recombinante serán captados y presentados por moléculas del MHC de clase I. Para ello, es necesario purificar moléculas de clase I de la línea transfectada, eluir los péptidos, secuenciarlos y demostrar que corresponden a regiones provenientes de la GP63.

## BIBLIOGRAFIA.

1. The Leishmaniasis. WHO Tech. Rep. Ser. p. 701, 1984.
2. Velasco O. 1991. La magnitud de una infección endémica: Las Leishmaniasis. En: La seroepidemiología en México. Vol. I. Pub Tec. No. 9. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud, México. pp.67-76.
3. Chang K P, Fong D and Bray R S. 1985. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: Leishmaniasis, human parasitic diseases, Vol. I. Chang, K.P. and Bray, R.S., eds. Elsevier Science Publishers pp. 1-30.
4. Howard J G. 1985. Host immunity to Leishmaniasis. In: Leishmaniasis. human parasitic diseases. Vol. 1. K.P Chang and R.S Amsterdam eds. Elsevier Science Publishers, pp. 140-162
5. Muller I, Pedrazzini T, Farrell J P and Louis J. 1989. T-cell responses and immunity to experimental infection with *Leishmania major* Ann. Rev. Immunol. Vol 7:561-578.
6. Sadick M D, Locksley R M, Tubbs C and Raff H V. 1986. Murine cutaneous Leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to *Leishmania* antigens *in vitro*. J. Immunol. vol.136:655-661.
7. Scott O, Natovitz P, Coffman R L, Pearce E and Sher A. 1988. Immunoregulation of cutaneous Leishmaniasis: T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J. Exp. Med. vol. 169:1675.
8. Heinzel R P, Sadick M D, Holaday B J, Coffman R L and Locksley. 1989. Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine Leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J. Exp. Med. vol. 168:59.
9. Manuel J and Behin R. 1987. Immunity: clinical and experimental. In: The Leishmaniasis in biology and Medicine. Vol. 1 W. Peters and R. Killick-Kendrick eds. Academic Press, New York, pp. 731-792.
10. Liew F Y. 1989. Functional heterogeneity of CD4<sup>+</sup> T cells in Leishmaniasis. Immunol. Today. 10: 40-45.
11. Wershil B K, Theodos C M, Galli S P and Titus R G. 1994. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. J. Immunology. vol. 152:4563-4570.
12. Liew F Y and Dhaliwal J S. 1987. Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from *Leishmania major* infection or after subcutaneous immunization with killed parasites. J. Immunol. vol. 1138:4450-4456.
13. Weiser W Y. 1987. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular Killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages J. Exp. Med. vol. 166: 1436-1446

14. Hill J O, Award M and North R J. 1989. Elimination of CD4<sup>+</sup> suppressor T cells from susceptible BALB/c mice release CD8<sup>+</sup> T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. J. Exp. Med. vol. 169:1819-1827
15. Heinzl F P, Schoenhaut D S, Rerko R M and Gately M K. 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. J. Exp. Med. vol. 177:1505-1509.
16. Sypek J P, Chung Ch L, Mayor E H, Subramanyam J M, Goldman S J, Sieburth D C and Schaub R G. 1993. Resolution of cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. J. Exp. Med. vol. 177:1797-1802.
17. Modabber F. 1990. Development of vaccines against Leishmaniasis. Scand. J. Infect. Dis. 76(Suppl):72-78.
18. Greenblatt C L. 1980. The present and future of vaccination for cutaneous Leishmaniasis. New developments with human and veterinary vaccines. Prog. Clin. Biolog. Res. vol. 47:259.
19. Modabber F. 1989. Experiences with vaccines against cutaneous Leishmaniasis: of men and mice. Parasitology. vol. 98:S49-S60.
20. Mayrink W, Williams P and daCosta C A. 1985. An experimental vaccine against American dermal Leishmaniasis: experience in the state of Espirito Santo, Brazil. Ann. Trop. Med. Parasitol. vol. 79:259-269.
21. Bouvier J, Etges R J and Bordier C. 1985. Identification and purification of membrane and soluble forms of the Major Surface Protein of *Leishmania* promastigotes. J. Biol. Chem. vol. 260:15504-15509.
22. Ip H S, Orn A, Russell D G and Cross, G.A.M. 1990. *Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase. Mol. Biochem. Parasitol. vol. 40:163.
23. Medina-Acosta E, Karess R E and Rusell D G. 1993. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. Mol. Biochem. Parasitol. vol. 57:31.
24. Bouvier J R, Etges R J and Bordier C. 1987. Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. vol. 24:73.
25. Etges R J, Bouvier J and Hoffman R. 1985. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. Mol. Biochem. Parasitol. vol. 14:141.
26. Colomer-Gould V, Quintao L G, Keithly J and Nogueira N. 1985. A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. J. Exp. Med. vol. 162:902-916.
27. Button L and McMaster W R. 1988. Molecular cloning of the surface antigen of *Leishmania*. J. Exp. Med. vol. 167: 724-729.
28. Handman E and Goding J W. 1985. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. EMBO J. vol. 4: 329.

29. Russel D G and Wilhelm H. 1986. The involvement of a major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* vol. 136: 2613-2620.
30. Chang C S and Chang K P. 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 83: 100-104.
31. Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A and Chang K P. 1989. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* vol. 264:7483-7489.
32. Russell D G and Alexander J. 1988. Effective immunization against cutaneous Leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.* vol. 140:1274-1279.
33. Hey A S, Theander T G, Hviid L, Hazrati S M, Kemp M and Kharazmi A. 1994. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. *J. Immunol.* vol. 152:4542-4548.
34. Liew F Y. 1989. Leishmaniasis. In: *Vaccination Strategies of Tropical Diseases*. Liew, F., Y. ed. CRC Press, Inc. Florida, USA. pp. 239-253.
35. Handman E, Button L L and McMaster R W. 1990. *Leishmania major*: Production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Experimen. Parasitol.* vol. 70:427-435.
36. Yang D M, Rogers M V and Liew F Y. 1991. Identification and characterization of host protective T cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*. *Immunol.* vol. 72:3-9.
37. López J A, Reins H A, Etges R J, Button L, McMaster W R, Overath P and Klein J. 1991. Genetic control of the immune response in mice to *Leishmania mexicana* surface protease. *J. Immunol.* vol. 146:1328-1334.
38. Yang D M, Fairweather N, Button L L, McMaster W R, Kahal L P and Liew F Y. 1990. Oral *Salmonella typhimurium* (Aro A') vaccine expressing a major Leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against Leishmaniasis. *J. Immunol.* vol. 145:2281-2285.
39. González C, Noriega F, Fouts T, Harris A, Hone D and Levine M M. 1992. Construction and characterization of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Leishmania mexicana* GP63. Abs. No.946. 32nd. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. Anaheim, Cal. USA.
40. González C R, Noreiga F, Hone D, Santiago A, Levine M M, Kumate J and Isibasi A. 1994. Construction of a candidate vaccine strain against Leishmaniasis using *Salmonella typhi* as live carrier of *Leishmania mexicana* GP63. *Arch. Med. Res.* vol. 25:49.
41. Hone D, Harris A, Chatfield S, Dougan G and Levine M M. 1991. Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine.* vol. 9:810-816.
42. Sambrook K J, Fritsch E F and Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. pp. 1.42-1.46.

43. Wilson V G. 1988. A rapid method for removal of excess linkers. *Biotechniques* vol. 6: 733-738.
44. Southern E M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* vol. 98:503-517.
45. Laemmli U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* vol. 227:680-685.
46. Towbin H T, Staehlin T and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 76:4350-4354.
47. Engvall E and Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Immunochemistry.* vol. 8:874-979.
48. Ganong B R and Delmore J P. 1991. Phase separation temperatures of mixtures of Triton X-114 and Triton X-45: Application to protein separation. *Anal. Biochem.* vol. 193:35-37.
49. Curtis R. 1990. Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In: *New Generation Vaccines.* Woodrow, G.C., Levine, M.M. eds. Marcel Dekker, Inc. New York, pp.161-188.
50. Wick M J, Pfeifer J D, Findlay K A, Harding C V and Normark S. 1993. Compartmentalization of defined epitopes expressed in *Escherichia coli* has only minor influence on efficiency of phagocytic processing for presentation by class I and class II Major Histocompatibility Complex molecules to T cells. *Infect. Immun.* vol. 61:4848-4856.
51. Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A and Coffman R L. 1986. Two types of murine helper clone: I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* vol. 136: 2348-2357.
52. Germain R M. 1986. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature (Lond.).* vol. 322:687-689.
53. Paul W E. 1993. The Immune system: An introduction. In: *Fundamental Immunology.* W.E. Pau53.22  
1, ed. Raven Press, New York, pp. 10.
54. Raychaudhuri S and Morrow W J W. 1993. Can soluble antigens induce CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell responses? A paradox revisited. *Immunology Today.* vol. 14:344-438.
55. Harding C V, Collins D S, Kanagawa O and Unanue E. 1991. Liposome-encapsulated antigens engender lysosomal processing for class II MHC presentation and cytosolic processing for class I presentation. *J. Immunol.* vol. 147:2860-2863.
56. Flynn J L, Weiss W R, Norris K A, Seifert H S, Kumar S and So M. 1990. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Mol. Microbiol.* vol. 4:2111-2118.
57. Aggarwal A, Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M and Sadoff J. 1990. Oral *Salmonella*: Malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* vol. 172:1083-1090.



58. Brett S J, Rhodes J, Liew J Y and Tite J. 1993. Comparison of antigen presentation of influenza A nucleoprotein expressed in attenuated *aroA*<sup>-</sup> *Salmonella typhimurium* with that of live virus. *J. Immunol.* vol. 150:2869-2884.

59. Turner S J, Carbone F R and Strunnell R A. 1993. *Salmonella typhimurium* *AaroA AaroD* mutants expressing a foreign recombinant protein induce specific major histocompatibility complex class I. restricted cytotoxic T lymphocytes in mice. *Infect. Immun.* vol. 61:5374-5380.

60. Ortiz-Navarrete V, Ochoa I, Martin N, and Isibasi A. 1994. Loading of empty class I molecules with peptides secreted by macrophages infected with *Salmonella*. Abstract: W43/14. Twelveth European Immunology Meeting. Barcelona, España.