



20^{2ej}

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

RESPUESTA *IN VITRO* POR LINFOCITOS DE RATONES
INMUNIZADOS CON *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL HERNANDEZ CANO

MEXICO, D.F. 1990



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.

INDICE

PRINCIPALES ABREVIATURAS.	
RESUMEN	1
INTRODUCCION.	2
OBJETIVOS	16
HIPOTESIS	17
MATERIALES Y SOLUCIONES.	18
1.- Material Biológico.	18
2.- Soluciones.	18
METODOS.	25
1.- Preparación de cepas bacterianas.	25
2.- Cultivo y cosecha de bacterias.	26
3.- Extracción de Proteínas de Membrana Externa.	27
4.- Separación e Identificación de Porinas.	28
5.- Cuantificación del Lipopolisacario (LPS) con taminante en las preparaciones de Porinas.	30
6.- Extracción de Lipopolisacarido de Salmonella typhi. 0901	31
8.- Método de obtención de Ganglios y Bazo de Ratones.	33
9.- Obtención de Células, Tratamiento y Cultivo.	34
10.-Determinación del número de Células y la Concentración de Concanavalina A.	35
11.-Determinación de la Dosis Optima de Porinas para la estimulación de los Linfocitos.	37
RESULTADOS.	39
1.-Estimulación de Linfocitos por con A.	39
2.-Análisis Electroforetico de las Porinas.	43
3.-Estimulación de linfocitos por Porinas.	45
DISCUSION	54
CONCLUSIONES.	58
BIBLIOGRAFIA.	59

RESUMEN.

Con la finalidad de estudiar la respuesta inmune celular hacia proteínas de membrana externa (porinas) de Salmonella typhimurium; se inmunizaron ratones NIH con la bacteria total o con porinas, siete días después se obtuvieron células de bazo y de ganglios linfáticos, las cuales se cultivaron durante 5 días en presencia de 2 a 150 µg/ml de porinas de S. typhimurium, S. typhi o E. coli E. coli. La respuesta proliferativa se determinó mediante incorporación de timidina tritiada. Las porinas de las tres cepas bacterianas estimularon de manera similar a linfocitos provenientes de ratones inmunizados tanto con la bacteria completa como con porinas de S. typhimurium. La reactividad cruzada que se observa en nuestros resultados, sugiere que la respuesta está dirigida hacia determinantes antígenicos que comparten las porinas de esas enterobacterias.

INTRODUCCION.

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa aguda, transmisible que se adquiere mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados con materia fecal proveniente de individuos enfermos. es exclusiva del ser humano y el agente causal es Salmonella typhi.

El género Salmonella comprende una gran variedad de especies patógenas para el hombre y animales. Salmonella typhi es una bacteria Gram-negativa, móvil, de la tribu Salmonellae y familia Enterobacteriaceae. La estructura antigénica de superficie está constituida por los antígenos flagelar H, somático O que de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White corresponde a los antígenos 9,12 del grupo D; al lipopolisacárido o endotoxina; y antígeno Vi exclusivo de Salmonella typhi (1-3). La fórmula 9,12 d, Vi denota a Salmonella typhi en forma abreviada.

En 1886-87 se realizaron las primeras inmunizaciones experimentales exitosas con Salmonella typhi viva en conejos, primero, y en ratones después. Para finales de 1887 se emplearon bacilos inactivados como vacunas para la inmunización de humanos entre las cuales estaba la vacuna fenolada inactivada por calor a 56°C (4) que fue probada en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica. Los resultados mostraron una disminución en la morbilidad y atenuación de los síntomas en los individuos inmunizados que enfermaron de fiebre tifoidea (5).

A partir de 1925 se emplearon vacunas a base de bacterias atenuadas y administradas por vía oral a humanos. Desafortunadamente, generó muertes entre los individuos vacunados (6). Hasta ese entonces se carecía de modelos animales en los cuales se demostrase el efecto protector real de las vacunas elaboradas con bacterias muertas.

Es hasta 1955 cuando, bajo los auspicios de la OMS, se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética con vacunas preparadas con células enteras de S. typhi inactivadas por acetona, calor y fenol o alcohol. De los resultados obtenidos, se concluyó que la vacuna inactivada con acetona, designada con la letra K, resultó ser la mejor ya que confirió una protección de mayor grado y duración. La vacuna inactivada con calor y fenol, designada con la letra L, manifestó menor protección que la K, y la inactivada con alcohol fue la menos efectiva. Se observó que la protección inducida por una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable; sin embargo con dos dosis la protección era de mayor duración (7). Mas tarde, en 1968, se demostró que la protección conferida por las vacunas K y L estaba en función de la dosis a la que el individuo inmunizado estuviese expuesto (8).

Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas, una de administración parenteral la cual está reconocida oficialmente por la OMS, que emplea la bacteria completa inactivada por el calor; la inmunidad que se induce con esta

vacuna es de corta duración por lo que se requiere de reinmunizaciones cada 2-3 años, no se puede aplicar a niños y presenta algunos efectos colaterales como fiebre, adenopatías, malestar general, etc. (5,9).

La otra y la mas reciente, es una vacuna oral elaborada con un mutante de S.typhi deficiente en UDP-4-galactosa-epimerasa (designada por Germanier como Ty21a), la cual induce una protección más prolongada que la que otorga la parenteral (protegió al 87% de los individuos inmunizados cuando la dosis de desafío fue de 10⁷ bacterias), además de eliminar los efectos adversos, sin embargo también requiere de reinmunizaciones, así como de la neutralización de la acidez gastrica previa a su administración (9). Esta vacuna indujo protección en el 95% de la población estudiada en Alejandría Egipto, sin embargo en Chile (1983) en una población infantil a razón de 3 dosis administradas en capsulas con capa entérica a intervalos de 2 o 21 días entre cada dosis, solo indujo una protección del 56 y 67% respectivamente (10).

En todos estos estudios se desconocía la naturaleza de los antígenos de S.typhi relacionados directamente con la protección y la respuesta inmune del humano a dichos antígenos.

La mayoría de los trabajos encaminados a identificar los antígenos responsables de la inmunidad protectora se han enfocado en los antígenos presentes en la superficie

bacteriana tales como el somático O, el flagelar H y el capsular Vi. Inicialmente se pensó que el antígeno somático O era tan importante en la protección que se elaboró una vacuna con el oligosacárido de repetición del lipopolisacárido (LPS). Igual que las vacunas anteriores, esta indujo una protección escasa y de corta duración (7,11).

Para el antígeno flagelar H se demostró la presencia de anticuerpos anti-H en chimpancés inmunizados con S. typhi pero que no protegían, aún en títulos elevados (12). Otro estudio demostró que ratones inmunizados con un mutante de S. typhi sin flagelos obtenían la misma protección que los inmunizados con cepas móviles (13).

Con respecto al antígeno Vi, los resultados han sido contradictorios. Se han detectado anticuerpos anti-Vi en el suero de pacientes con fiebre tifoidea (14) pero incapaces de conferir protección (15,16,17). Otros estudios señalan que el antígeno Vi es capaz de inducir protección (8,18) y es importante en la virulencia de S. typhi; tanto que se ha sugerido la necesidad de conservarlo durante la preparación de vacunas (8,16,19).

Otros antígenos relacionados con la inducción de inmunidad protectora (en ratones) estudiados por mucho tiempo fueron fracciones ribosomales de Mycobacterium tuberculosis, inicialmente, y posteriormente de bacterias Gram-negativas (20,21), incluyendo Salmonella typhimurium

(22) y S.typhi (23). Al investigar las fracciones inductoras de protección en los extractos ribosomales, se obtuvieron todos los resultados posibles; tanto el RNA ribosomal (22), como las proteínas ribosomales (24) o, inclusive, ambos, fueron propuestos como la parte inmunogénica responsable de la inmunidad protectora. Sin embargo, trabajos posteriores demostraron que las fracciones ribosomales estaban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular (20,25). En estudios subsecuentes se demostró que las proteínas de la envoltura celular de S.typhimurium protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria, en un grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales (26).

Las bacterias Gram-negativas contienen una envoltura celular compleja constituida por membrana citoplasmica, peptidoglicana y membrana externa. Esta última ha sido objeto de gran interés en años recientes y se ha estudiado el papel que desempeña en la relación hospedero-parásito.

El conocimiento de las proteínas de la membrana externa ha conducido a clasificarlas en principales y menores; las primeras representan el 80% del total e incluyen a las porinas, a la proteína modificable por el calor (OmpA en el caso de E.coli) y a la lipoproteína de Braun (1).

Las porinas son un grupo de proteínas con pesos moleculares de 30 a 40 Kd por monómero, algunas son constitutivas y otras se expresan bajo ciertas condiciones

del medio, o bien son codificadas por fagos o plásmidos. Las porinas inicialmente estudiadas fueron las de E.coli y su función biológica es la de transporte de iones y algunos nutrientes o desechos metabólicos (27), aunque también se ha descrito que algunas porinas pueden servir de sitio de reconocimiento a ciertos fagos (28). Se ha encontrado una homología entre las diferentes porinas de E. coli de 65%.

Las otras porinas estudiadas son las del género Salmonella y los trabajos realizados sugieren que las porinas de S. typhimurium son inmunogénicas en ratones (29-31) y al utilizarse ligadas covalentemente a polisacáridos, inducen una respuesta inmune que confiere protección efectiva contra la infección por la misma bacteria. También se ha sugerido que las porinas del género Salmonella tienen una gran similitud antigénica entre sí por lo que parece adecuado suponer que la inmunización con porinas de cualquiera de los miembros de este género resultaría en inmunidad contra las otras especies del mismo (32).

En el laboratorio de Inmunoquímica del IMSS se demostró que las proteínas de membrana externa (PME) de S. typhi 9.12.d.Vi generan protección en ratones (aunque éste no es su hospedero natural) de 100% al reto con 500 DL₅₀ tanto para la cepa homóloga como para S. typhi Ty2 y de 30% para S. typhimurium. En experimentos de protección pasiva, la administración de suero hiperinmune de conejo anti-PME de

S.typhi 9.12.d.Vi logró proteger en un 100% al reto con 100 DL₅₀ de la cepa homóloga y de S.typhi Ty2, pero de 80% para S.typhimurium. En este modelo murino, las porinas y la OmpA fueron las PME que jugaron el papel más importante en la inducción de protección. Además, la inmunidad cruzada entre las tres cepas de Salmonella utilizadas indico que los epítopes que participan en la protección son compartidos; el suero hiperinmune de conejo reconoció en inmunotransferencia PME de S.typhimurium, en especial al grupo de las porinas. Un resultado de mayor relevancia fue que el suero de pacientes con fiebre tifoidea producen anticuerpos de clase IgG e IgM contra PME y fundamentalmente contra las porinas de S.typhi. Estos mismos sueros reaccionaron contra porinas de S.typhimurium pero no de E.coli (34).

En los resultados anteriores, la presencia de endotoxina como contaminante en las PME impide demostrar concluyentemente que éstas sean los antígenos protectores per se. Para eliminar este problema se decidió obtener las proteínas con un grado mayor de pureza, libre de LPS, mediante el uso de inmunoabsorbentes; para lo cual se emplearon dos métodos: anticuerpos policlonales de conejo anti-porinas de S.typhi purificadas a su vez por electroelución de geles de poliacrilamida (35); o bien inmunoabsorbentes a base de anticuerpos monoclonales anti-porinas (36). Uno de los anticuerpos monoclonales contra porinas de S.typhi 9.12.d.Vi se empleó también en

experimentos de inmunidad pasiva en ratones, en los cuales confirió protección de hasta un 60% al reto de 20 DL₅₀ de la cepa homologa. Estos resultados corroboraron la importancia de las FME en los mecanismos de protección contra la salmonelosis.

Tanto por su magnitud como por su trascendencia, la fiebre tifoidea es un problema de Salud Pública en México. Su control epidemiológico depende de aspectos sanitarios que resultan directamente del grado de desarrollo económico y social y comprenden medidas como la eliminación adecuada de desechos y excretas, el manejo higiénico de los alimentos, la detección y tratamiento oportunos de los enfermos; especialmente de los portadores asintomáticos, ya que estos últimos constituyen la piedra angular de la cadena de transmisión.

Otra alternativa es la inmunoprofilaxis, sin embargo, ninguna de las vacunas hasta hoy estudiadas ofrecen una protección efectiva y duradera, sin olvidar que además generan reacciones adversas indeseables. El objetivo general en el laboratorio de Inmuoquímica del IMSS es elaborar una vacuna contra la fiebre tifoidea a base de porinas y OmpA de S.typhi 9,12,d,Vi que supere los inconvenientes de las anteriores. Sin embargo, el estudio de la fiebre tifoidea ofrece varios problemas a nivel experimental.

El primero se refiere a los mecanismos patogénicos de esta enfermedad, los cuales no están totalmente dilucidados.

Salmonella typhi penetra al organismo a través de la boca, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, penetra a la membrana basal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por macrófagos y transportada a los linfáticos regionales donde se multiplica activamente; después de una fase de bacteremia, se distribuye en el sistema reticuloendotelial donde se reproduce y es liberada nuevamente al sistema circulatorio. La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con escasos fagocitos mononucleares, dentro de los cuales es capaz de proliferar (37). Gran parte de las manifestaciones clínicas son causadas por la liberación de endotoxina (38), la cual tiene diversos efectos biológicos incluyendo: fiebre (39), hipotensión arterial (40), cambios en la cuenta leucocitaria (41) y estimulación policlonal de linfocitos B entre otros (41).

El otro problema se refiere a los pocos estudios realizados sobre inmunidad celular. La mayor parte de ellos con múltiples problemas de metodología, incluyendo la selección del antígeno y el método de análisis para valorar la respuesta inmune. La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando extractos crudos de S.typhi que contienen, además de una gran variedad de antígenos, diversos componentes con actividad mitogénica inespecífica para linfocitos B y posiblemente para linfocitos T (42). El método utilizado hasta ahora ha sido la inhibición de la migración de leucocitos, que depende de la secreción de

linfocinas mal caracterizadas, lo que hace aún más difícil su interpretación. Otros estudios han sido en relación a la respuesta proliferativa inducida por la bacteria o sus fracciones, método más confiable desde el punto de vista experimental, pero los resultados están influenciados por la presencia de endotoxina y otros contaminantes en los preparados antigénicos (43-45).

Un problema mas, es la ausencia de un modelo experimental adecuado, ya que el hombre es el único hospedero específico de S.typhi . Por lo tanto, es necesario obtener correlación de estudios experimentales realizados en ratones infectados con S. typhimurium que desarrollan un padecimiento de patogenia muy similar a la fiebre tifoidea en el humano (46). Por esta razón la salmonelosis murina constituye el único modelo experimental para el estudio de la patogenia de la fiebre tifoidea.

En el desarrollo de la infección por S.typhimurium en ratones, existe la influencia de un gene de susceptibilidad, denominado Ity^s, codificado en el cromosoma 1, mientras que el alelo que confiere resistencia se llama Ity^r. Este gene es importante en la fase inicial del padecimiento y determina una mayor habilidad de los macrófagos de ratones resistentes para eliminar a la Salmonella intracelularmente. Se ha demostrado que los linfocitos T no juegan un papel importante en la actividad de este gene (47).

Otro gen que participa es el de respuesta a lipopolisacárido, *Lps*^a confiriendo susceptibilidad a la diseminación inicial y a la progresión del proceso infeccioso, de manera similar a lo que ocurre en presencia de *Ity*^a(48). En la fase tardía de la infección participan otros factores como son la producción de anticuerpos específicos (49), y el desarrollo de inmunidad celular contra la bacteria (41,50); su importancia se demuestra en el caso de ratones con inmunodeficiencia humoral ligada al cromosoma X y en los ratones desnudos (ratones atímicos con deficiencia de inmunidad celular mediada por linfocitos T); ya que ambos tipos de inmunodeficiencia se asocian a una susceptibilidad a la enfermedad en fase tardía (47,49,50). Finalmente otro estudio sugiere que otro factor de resistencia natural a *S.typhimurium* se da a nivel de células similares a las asesinas naturales (51).

El resultado de la presencia de uno o más genes de susceptibilidad o resistencia a la infección por *S.typhimurium* es el desarrollo de enfermedad con inóculos de diferente magnitud. Las cepas *Ity*^a(BALB/c, C57BL/6) enferman con 10 bacterias, en tanto que las cepas resistentes (CBA, A/J) requieren de un inóculo de 10 mil (47,52,53).

La inmunidad celular es primordial en el control de la infección de microorganismos intracelulares, incluyendo a *S.typhi* en humanos y de *S.typhimurium* en ratones. Los

estudios sobre inmunidad humoral sugieren que ésta es insuficiente para el control de estos padecimientos. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas de S.typhi, no correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones, a excepción de algunos estudios aislados que sugieren que los anticuerpos contra el antígeno H son un indicador de resistencia a la fiebre tifoidea (1,8,37). Tampoco se ha encontrado correlación con la presencia de anticuerpos sericos contra los antígenos O y Vi a pesar de que en ratones, los anticuerpos contra Vi confieren protección contra S.typhi (aunque dicha especie no es el hospedero natural de este,37). Por otro lado, se ha descrito que los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de S.typhi a la pared intestinal; sin embargo son protectores solo ante inóculos pequeños de la bacteria. La inmunidad celular contra la bacteria depende de linfocitos T específicos los cuales al reconocer a los antígenos bacterianos secretan diversos factores denominadas linfocinas, responsables de la inducción de inmunidad humoral y celular incluyendo la activación de macrófagos. Esta última es de primordial importancia ya que la activación permite a los fagocitos mononucleares eliminar a microorganismos que en otras circunstancias son parásitos intracelulares dentro de los mismos macrófagos. En base a lo anterior y al hecho de que contra la invasión por microorganismos intracelulares, solamente la inmunidad

celular es eficiente; podemos suponer que frente a la invasión por grandes cantidades de ésta, los mecanismos de inmunidad celular, fundamentalmente la activación de macrófagos, son indispensables para el control de la infección (54).

Para el caso de la infección en ratones por S.typhimurium se ha demostrado que el grado de hipersensibilidad tardía contra antígenos protéicos o polisacarídicos de la bacteria está en relación directa con el nivel de protección (29-31). La transferencia pasiva de linfocitos específicos contra antígenos de S.typhimurium confiere resistencia a ratones no inmunizados (54), la protección es efectiva aún empleando antígenos irrelevantes, siempre que se incluya un refuerzo de inmunización contra el antígeno al momento de retar con la bacteria viva (55). También es posible transferir inmunidad pasiva mediante sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con Concanavalina A. Estos resultados, en conjunto, sugieren que lo más importante en la protección contra el desarrollo de salmonelosis murina es la presencia de un evento que resulte en la activación de macrófagos que finalmente lleve a la eliminación de las bacterias fagocitadas.

Contar con porciones antigénicas purificadas de S.typhimurium permitirá estudiar de manera independiente cada uno de los elementos que componen la respuesta inmune en esta enfermedad. La generación de inmunidad activa y la

transferencia de inmunidad mediante anticuerpos heterólogos han dado resultados alentadores; no obstante es necesario un análisis más detallado sobre el papel que desempeñan los distintos elementos del sistema inmune, sobre todo en relación a la rama efectora celular.

El presente trabajo es el inicio de un proyecto que pretende describir la capacidad de las proteínas de membrana externa para inducir respuesta inmune celular específica, medida in vitro a través de la incorporación de timidina radiactiva, en células provenientes de ratones inmunizados ya sea con la bacteria total o con porinas, lo que permitirá estudiar la respuesta celular hacia un antígeno purificado, evaluar su utilidad como inmunógeno y utilizarlo para activar linfocitos en modelos de transferencia adoptiva de inmunidad lo que eventualmente contribuirá al desarrollo y obtención de vacunas más eficaces.

OBJETIVOS

A) INTERMEDIOS.

1. Purificar las porinas de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Escherichia coli.

2. Obtener y cultivar células de ganglios linfáticos y de bazo de ratones NIH.

3. Determinar las condiciones óptimas para la estimulación de linfocitos con concanavalina A y porinas en los cultivos celulares, así como las concentraciones adecuadas de ambas para lograr una proliferación celular óptima.

B) GENERAL.

4. Determinar la capacidad de las porinas de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Escherichia coli para estimular la proliferación de linfocitos murinos in vitro.

HIPOTESIS

1. Las porinas de Salmonella typhimurium contienen determinantes antigénicos capaces de activar linfocitos provenientes de ratones inmunizados con la bacteria total.

2. Debido a la homología entre las porinas de las diferentes enterobacterias, la inmunización con Salmonella typhimurium induce reactividad cruzada contra porinas de diferentes bacterias Gram negativas.

MATERIALES Y SOLUCIONES.

1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

A) Cepas de bacterias.

Se utilizaron las siguientes cepas: Salmonella typhimurium y Escherichia coli donadas por el Instituto Nacional de Higiene y Salmonella typhi aislada de un paciente con diagnóstico de fiebre tifoidea.

B) Ratones.

Se usaron ratones de la cepa NIH con pesos de 18 a 20 g de ambos sexos. Se emplearon para obtener bazo y ganglios de los cuales se obtuvieron células que se cultivaron para determinar la respuesta a concanavalina A.

A otro lote de ratones se inmunizaron con Salmonella typhimurium acetonzada y porinas de la misma para determinar la estimulación de linfocitos por porinas.

2.- SOLUCIONES.

A) Medio mínimo A 10 X.

Fosfato monobásico	30 g/l
Fosfato dibásico	70 g/l
Citrato de sodio dihidratado	5 g/l
Sulfato de amonio	10 g/l
Sulfato de magnesio	1 g/l

Esta solución se diluyó 1:10 y se esterilizó a 121°C, 15 libras por 15 min. Por otro lado se esterilizó glucosa al 12% y extracto de levadura al 5% a 121°C, 10 libras por 10 min. Por cada 150 ml de medio mínimo se adicionaron 6 ml de glucosa y 3 ml de extracto.

B) RPMI- 1640 (Gibco).

Un sobre de este medio en polvo se disolvió en 1 litro de agua desionizada, junto con 2 g de bicarbonato de sodio. Se ajustó el pH a 7.2 y se esterilizó por filtración en filtros Millipore de 0.2 μ m en campana de flujo laminar. Como prueba de esterilidad se inocularon alícuotas del medio filtrado en BHI. El medio se mantuvo a 4°C y al momento de usarlo se suplementó con: suero fetal bovino al 10% (Sigma), gentamicina 100 μ g/ml, penicilina 100 U/ml, L-glutamina 2×10^{-3} M, y 2-mercaptoetanol 5×10^{-3} M. Este medio se utilizó en los cultivos con el nombre de medio completo.

C) SOLUCION BALANCEADA DE SALES DE HANK'S (HBSS, Sigma).

Un sobre de este medio se disolvió en 1 litro de agua bidestilada junto con 2 g de bicarbonato de sodio (Sigma). Se ajustó el pH a 7.2 (pH metro 12 Corning Scientific Instruments) y se filtró de la misma forma que el medio anterior. Esta solución se usó para lavar las células de bazo y ganglios en todos los experimentos.

D) PREPARACION DE CONCAVALINA A (CmA) (type IV-S, Sigma).

Un frasco con 5 mg de con A liofilizada se disolvió con 5 ml de solución de Hanks' para tener 1 mg/ml y de esta se realizaron todas las diluciones empleadas en los cultivos celulares. Las concentraciones originales fueron: 1 mg/ml, 500 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml y 50 µg/ml; de estas se tomaron 20 µl que se depositaron en cada pozo de microcultivo para tener las concentraciones finales que fueron: 100, 50, 20, 10 y 5 µg/ml. De cada dilución, antes de ser empleadas, se inocularon 5 µl en medio BHI incubando por 5 días a 37°C.

E) PREPARACION DE PORINAS PARA LOS CULTIVOS CELULARES.

Para las porinas de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Escherichia coli se realizó un esquema de diluciones similar al de con A. Las concentraciones originales fueron: 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml y 20 µg/ml; de cada una de estas se tomaron 20 µl/pozo para tener las concentraciones finales: 150, 100, 50, 20, 10, 5 y 2 µg/ml. Se les realizó prueba de esterilidad igual que para con A.

F) REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS.

1.- Solución de Acrilamida-bis: Se mezclaron 30 g de Acrilamida (Bio-Rad) con 0.8 g de N'-N acrilamida bis metileno (Bio-Rad) y se aforaron a 100 ml con agua

desionizada, se filtro en papel Whatman # 3 y se mantuvo en frasco ambar en la oscuridad a 4°C.

2.- Tris-HCl 1.5M pH:8.8: Se pesaron 18.15 g de Tris base (Merck) y se disolvieron en 80 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.8 con HCl concentrado, se agitó por 1 hora y despues de que este se estabilizo se aforó a 100 ml. Se mantuvo a 4°C.

3.- Tris-HCl 0.5M pH:6.8. Se pesaron 6 g de Tris base, se disolvieron en 80 ml de agua desionizada, el pH se ajusto a 6.8, se agito por una hora y finalmente se aforo a 100 ml. También se mantuvo a 4°C.

4.- SDS al 10%. Se disolvio 1 g de dodecil sulfato de sodio (Sigma) en 10 ml de agua desionizada y se mantuvo a temperatura ambiente.

5.- Persulfato de amonio (APS). Se disolvieron 100 µg de persulfato de amonio (Sigma) en 1 ml de agua desionizada y se guardó a 4°C.

6.- TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etiléndiamina Sigma). Esta solución se empleó directamente de la botella y se mantuvo a 4°C.

7.- Amortiguador de corrimiento. Se mezclaron las siguientes compuestos: 24 g de Tris-base, 115.2 g de glicina (Merck) y 1 g de SDS. Cada compuesto se disolvió por separado en un volúmen mínimo de agua desionizada y después

se juntaron para llevarlas a 8 litros. Este amortiguador ya tenía un pH de 8.3, requerido para el corrimiento electroforético.

8.- Amortiguador de muestra 1X para muestras líquidas. Esta solución contenía 1 ml de Tris pH 6.8, 1 ml de SDS al 10%, 1 ml de glicerol, 1.8 ml de agua, 200 µl de azul de bromofenol al 0.1% y 2 µl de 2-mercaptoetanol.

Con las soluciones anteriores se prepararon los geles para la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Gel Separador al 11.5%. Solución de acrilamida-bis (11.5 ml), Tris-HCl 1.5M (7.5 ml), agua desionizada (10.5 ml), SDS al 10% (0.6 ml), Temed (10 µl) y APS (50 µl).

Gel espaciador al 5%. Solución de acrilamida-bis (1.25 ml), Tris-HCl 0.5M (1.82 ml), agua desionizada (4.22 ml), SDS al 10 % (75 µl), Temed (3.25 µl) y APS al 10 % (25 µl).

Todos los volúmenes para los dos tipos de geles eran para una placa de 14 x 16 cm.

6) SOLUCIONES PARA LA TINCION DE COOMASSIE.

1.- Reactivo para tefir. Se disolvieron 1.25 g de azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad) en 45 ml de ácido acético (Merck) y 454 ml de metanol (Merck) al 50%. Esta solución se mantuvo a temperatura ambiente y se filtró cada vez que se usó. Los geles fueron teñidos con esta solución

durante una hora sin agitación en un volúmen que los cubrió completamente.

2.- Reactivo para desteñir. Se mezclaron 25 ml de alcohol isopropílico (Baker) con 37 ml de ácido acético y se llevaron a 500 ml con agua destilada. Los geles fueron desteñidos en agitación continua con esta solución haciendo cambios continuos y filtrando despues de esto en filtro con carbón activado.

H) SOLUCIONES PARA LA TINCION DE PLATA.

1.-Reactivo para prefijación. Se mezclaron 5 ml de etanol (Merck) con 7 ml de ácido acético y esto se llevó a 100 ml con agua desionizada.

2.- Reactivo para fijar. Se mezclaron 40 ml de glutaraldehído al 25% (Sigma) con 60 ml de agua desionizada para tener una solución al 10%.

3.- Solución de nitrato de plata. Esta solución se preparó, en el momento de teñir los geles, de la siguiente manera: a 21 ml de NaOH 0.1N (Baker) se le adicionó 1.4 ml de hidróxido de amonio (Baker) en forma rápida y agitando. A continuación, a esta solución se le agregaron, 4.1 ml de nitrato de plata (Baker), gota a gota. Finalmente, se adicionaron 75 ml de agua desionizada.

4.- Solución reveladora. También esta solución se preparó en el momento de utilizarse. Se mezclaron 25 mg de ácido cítrico (Baker) con 1 litro de agua desionizada y a esta solución se le adicionaron 500 μ l de formaldehído en solución al 37% (Baker).

5.- Solución de lavado final. Se mezclaron 1 ml de ácido acético en 99 ml de agua desionizada y esta se utilizó para lavar el gel después de ser revelado.

MÉTODOS.

1.- PREPARACION DE CEPAS BACTERIANAS.

Para confirmar la pureza e identidad de los cultivos de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Escherichia coli se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

A partir de los cultivos en agar BHI se procedió a inocular, por el método de estria cruzada, cada cepa en medios diferenciales y selectivos: EMB (eosina azul de metileno), MacConkey, Sulfito de bismuto y Verde brillante. Con el fin de observar la morfología y seleccionar las colonias redondas (lisas) se realizó una resiembra en agar base para sangre (BAB). Se picaron de 3-5 de éstas y se inocularon en los medios para pruebas bioquímicas: MIO (Movilidad Índol Ornitina), LIA (Agar de hierro y Lisina) y TSI (agar de tres azúcares y hierro) inoculando por "picadura" "picadura y estria", y "picadura y estria" respectivamente.

Del cultivo crecido en agar TSI recientemente incubado (18-24 horas) se realizaron las pruebas de aglutinación con antisueros específicos para cada microorganismo. Se recogió parte del cultivo con asa recta y se emulsificó con 50µl de SSF en un portaobjetos, se mezcló con movimiento circular durante 30 seg y se observó si la suspensión era uniforme. Cuando la cepa autoaglutina (formación de grumos) no puede serotipificarse.

A continuación, un inóculo igual de bacteria se mezcló (usando el asa) con antisuero específico y se observó durante un minuto sobre un fondo oscuro si había o no aglutinación. La reacción era positiva si se formaban grumos en 30 a 60 seg.

Finalmente, las colonias con la mayor aglutinación se inocularon en BAB por zonas hasta tener un crecimiento confluyente y entonces se inocularó todo el cultivo en los medios de conservación: Dorset, BAB, glicerina-TS caldo y sangre. Los dos primeros se refrigeraron, y los otros se congelaron a -70°C . De esta forma se conservaron los cultivos bacterianos para la posterior obtención de proteínas de membrana externa durante todo el trabajo (56).

INOCULACION PARA LA IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS Salmonella y Escherichia coli .

Cultivo en BHI

		estria cruzada
Agar Mac-Conkey		
EMB		
Verde brillante		Sulfito de bismuto
BAB		
37°C/24 h		37°C/48 h

Picar colonias y montar pruebas bioquímicas	
MIO, LIA, TSI	
	37°C/18-24 h
Leer	

Aglutinar con los antisueros
D, d y Vi para S. typhi .
B, i para Salmonella typhimurium .
O17 para Escherichia coli .

2.- CULTIVO Y COSECHA DE BACTERIAS.

Cada una de las cepas de bacterias se inoculó mediante cultivo estacionario en medio mínimo A por 4 horas a 37°C, 100 µl de bacteria concentrada por cada 150 ml de medio. Después se pasaron a un botellón con 1 500 ml del mismo medio y se cultivaron en agitación (New Brunswick Scientific Co., INC U.S.A.) a 200 rpm a 37°C durante 8 horas.

Al final del cultivo, cada una de las cepas se cosechó de la siguiente manera: se centrifugaron a 6 000 rpm por 15 min a 4°C en una centrifuga Sorvall RC5C (Sorvall Instruments Du Pont), las pastillas se juntaron y el sobrenadante se desechó (esterilizó). Se lavaron las pastillas dos veces con Tris-HCl 10mM pH:7.7 centrifugando bajo las mismas condiciones. Finalmente se resuspendieron en el mínimo volumen del mismo amortiguador. Cada lote de bacterias se congeló para ser sonificado posteriormente.

3.- EXTRACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Se descongelaron lotes de bacterias y se diluyeron en la solución amortiguadora de Hepes 10mM pH:7.7 ajustando la densidad óptica entre 1 y 1.5 a 660 nm (Espectrofotómetro Beckman DU-7). Se hicieron alícuotas de 80 ml y se sonicaron (Lab line Ultratip Labsonic System) a 180 watts (190 decibels), ciclos de dos minutos, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 660 nm. Siempre se sonificó en baño de hielo.

Las bacterias intactas se eliminaron por centrifugación a 6 000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante que contenía las membranas celulares y el citosol, se trató con DNasa y RNasa (Sigma) 25 µg/ml, adicionando una gota de cloruro de magnesio por cada 10 ml, incubando a 35°C durante 45 min.

Se colectaron las membranas celulares por ultracentrifugación a 140 000 xg (45 000 rpm) durante 45 min a 5°C (Ultracentrifuga Beckman LB-M) para sedimentar la envoltura celular; la pastilla resultante se resuspendió en Hepes 10mM pH:7.4 volviéndose a ultracentrifugar bajo las mismas condiciones. La envoltura celular contenida en la pastilla se resuspendió en una solución de Tritón X-100 al 2% en Hepes 10mM pH:7.4 y con el objeto de solubilizar y eliminar la membrana citoplasmica se centrifugó a 100 000 xg durante 45 min a 5°C. La pastilla resultante se solubilizó en una solución de Tritón X-100 al 2% en Tris 50mM EDTA 5mM pH:7.8 y se incubó a 37°C. De esta forma el sobrenadante contenía principalmente a las proteínas de membrana externa.

4.- SEPARACION E IDENTIFICACION DE PORINAS.

Las proteínas de membrana externa extraídas por el método anterior fueron pasadas por una columna de filtración en gel (26mm x 95cm, LKB 2137) con Sephacryl S-200 (Pharmacia), equilibrada con el buffer siguiente: Tris-HCl 50mM pH:7.7 conteniendo NaCl 0.4M, SDS al 1%, EDTA 5mM y 2-

mercaptoetanol al 0.05%; a una velocidad de 9 ml por hora, a temperatura ambiente, colectando 3 ml por tubo. Se leyó la densidad óptica de cada tubo a 280 nm y se colectó el volumen que eluyó aproximadamente a los 250 ml donde se encontraban las porinas. Para confirmar que se tenían porinas y que sólo se recolectaban éstas, a los tubos que contenían el volumen con la absorbancia máxima en el pico de porinas, se les realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 11.5% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras y un sistema de amortiguador discontinuo. Se tomaron 100 µl de cada uno de los tubos seleccionados y se mezclaron con un volumen igual de amortiguador de muestra. Esta solución se hirvió 5 min y se pusieron de ésta 30 µl por carril en un sistema de electroforesis vertical (LKB Bromma) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (57).

Como marcadores de pesos moleculares (todos de Bio-Rad) se emplearon Fosforilasa B (92.5 Kd), Albúmina sérica bovina (66.2), Ovoalbúmina (45), Anhidrasa carbonica (31), Inhibidor de tripsina (21.5) y Lisozima (14.4).

El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 10°C con una corriente de 20 mA por placa y un voltaje libre de 500, durante 6 horas aproximadamente (34). Al finalizar la electroforesis (esto es cuando el frente de corrimiento se encontró a 1 cm del final de la placa), unos geles se tñieron con azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad) y otros con nitrato de plata. Los primeros se destñieron

exhaustivamente con la solución decolorante hasta que las bandas de proteínas revelaron claramente. Para los geles teñidos con nitrato de plata se siguió el método de Oakley (58) y algunas recomendaciones (59,60).

Los tubos que solo contenían las bandas de las porinas se juntaron y se sometieron a diálisis exhaustiva contra una solución amortiguadora de Hepes 10mM pH:7.4, haciendo cambios de ésta diariamente. Al final de la diálisis las muestras se concentraron por aereación a 4°C a una cuarta parte del volumen original y se volvieron a dializar con el mismo buffer para bajar la concentración de sales.

A continuación, se midió la absorbancia de las porinas y enseguida se pasaron por filtros (HA Millipore) desde 0.8 hasta 0.2 μ m bajo una campana de flujo laminar (VECO). Como pruebas de esterilidad se inocularon, tanto los filtros como la solución, en BHI y RPMI-1640, a 37°C durante 5 días.

A las muestras ya filtradas se les determinó la concentración protéica por el método de Lowry modificado (62), usando albúmina sérica bovina (Sigma) 1 mg/ml para la curva patrón.

5.- CUANTIFICACION DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS) CONTAMINANTE EN LAS PREPARACIONES DE PORINAS.

También a las muestras ya filtradas se les determinó el LPS en forma indirecta a través del contenido de KDO, empleando como curva patrón KDO (Sigma) 100 μ g/ml y preparando la muestra problema de la siguiente forma:

A 20 µl de muestra de proteína (por duplicado) se le añadió 980 µl de ácido sulfúrico 0.2N y se calentó a 100°C (en un horno) durante 30 min, se dejó enfriar la mezcla y posteriormente se centrifugó a 2 000 rpm por 5 min, se tomó entonces 500 µl de esta muestra y se le añadió 250 µl de una solución de ácido peryódico 0.04N en H₂SO₄ 0.125N, dejándola reposar 20 min a temperatura ambiente. Se añadieron 250 µl de arsenito de sodio al 2.6% en HCl 0.5N, hasta desaparecer el color café formado, enseguida se adicionaron 500 µl de ácido tiobarbitúrico al 0.6% y esta solución se dejó a 100°C por 15 min; por último se añadió 1 ml de dimetilsulfóxido en caliente y se leyó a 548 nm (63).

6.- EXTRACCION DE LIPOPOLISACARIDO DE *Salmonella typhi* D901

Como para los cultivos celulares fue necesario tener un testigo de LPS, se realizó la extracción de éste por el método de Westphal-Fann (fenol-agua) de la siguiente forma (64).

Se inoculó *Salmonella typhi* en matraces con 100 ml de caldo soya tripticasa por 4 horas a 37°C. Después se pasó a un botellón con 1 500 ml de este mismo medio y se cultivó en agitación por 6 horas a 37°C a 2 000 rpm. Al final se cosechó centrifugando a 6 000 rpm por 10 min, lavando dos veces con SSF. Se juntaron las pastillas y estas se colocaron en una caja de Petri a la cual se le adicionó acetona al ras de la caja, se dejó evaporar completamente (3

días) quedando así listas las bacterias para la extracción de LPS.

A 20 g de bacteria desecada se adicionaron 360 ml de agua y se calentó a 68°C en baño María. Se agregó, entonces, el mismo volumen de fenol al 90% precalentado a la misma temperatura, adicionándolo lentamente y agitando vigorosamente por 15 min.

Después de agregar todo el fenol, la solución se dejó de 10-15 min a esa temperatura. Enseguida, se enfrió a 10°C en baño de hielo; se centrifugó a 3 000 rpm por 30 min formándose así tres fases: una acuosa, una fenólica y un residuo insoluble. Se recolectó la fase acuosa y al resto de la solución se le adicionó el mismo volumen de agua inicial, repitiendo el procedimiento de extracción fenol-agua dos veces más. Las fases acuosas se juntaron para dializarlas contra agua destilada a 37°C por 4 días con cambios constantes. La solución dializada se ultracentrifugó a 80 000 xg por 3 horas. La pastilla que se formó y que contenía LPS se resuspendió en buffer de bicarbonatos.

El contenido de LPS se determinó por el método de KDO, de la misma forma que para las porinas.

Se inoculó Salmonella en cultivo estacionario durante 4 horas a 37°C en medio mínimo, se transfirió a cultivo agitado por 6 horas a 37°C, se cosechó por centrifugación a 6 000 rpm a 4°C por 15 min y se lavó dos veces con una

solución amortiguadora de TRIS 10 mM pH:7.7 mediante centrifugación. La pastilla se resuspendió en seis volúmenes de acetona, se dejó a temperatura ambiente por dos horas, se centrifugó y la pastilla se transfirió a una caja de Petri hasta que se evaporó la acetona. Las bacterias secas se recolectaron con una espátula y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Se resuspendieron una o dos asadas de la bacteria en solución salina fisiológica (SSF), ajustando la absorbancia entre 0.51 y 0.61 a 660 nm, con lo que se obtuvieron 10⁹ millones de bacterias/ml; se hicieron diluciones para obtener 5, 25, 50, 100 y 200 mil bacterias por mililitro con SSF estéril.

B.- METODO DE OBTENCION DE GANGLIOS Y BAZO DE RATONES.

Se sacrificaron ratones por dislocación cervical, hasta perder los últimos reflejos (movimiento de las patas traseras) y entonces se introdujeron en etanol al 70% por 1 min. A continuación, se fijaron con alfileres, en un campo estéril, por las 4 patas, se hizo un corte en la piel y se disecó ésta del resto hasta dejar al descubierto los músculos de las patas traseras y delanteras así como el cuello.

Con nuevo material estéril, se localizaron los ganglios: poplíteos, ciáticos, inguinales, axilares, braquiales, mediastinales y cervicales; se disecaron y se colocaron en una caja de Petri con RPMI completo con gentamicina 100

$\mu\text{g/ml}$ adicionada al momento (100 μl por cada 10 ml de medio).

Para la obtención de bazo, se colocó al ratón de costado, se hizo un pequeño corte en el hipocondrio izquierdo y se introdujeron unas pinzas hasta el bazo, se cortó ahí y se separó, teniendo cuidado de no tocar los intestinos al momento de cortar. Se colocó en RPMI igual que como se hizo para ganglios.

9.- OBTENCION DE CELULAS, TRATAMIENTO Y CULTIVO.

En una campana de flujo laminar, los órganos obtenidos se pasaron a otra caja de Petri que contenía un tamiz de organdi de 4 x 4 cm, con poro de aproximadamente 100 μm , embebido en 8 ml de solución de Hanks' a la cual se le adicionó gentamicina al momento (100 $\mu\text{l}/10$ ml de Hanks'). Se envolvieron los ganglios y los bazos en el tamiz y se sellaron con unas pinzas; a continuación, con un émbolo de jeringa de 10 ml se frotó sobre el tamiz para disgregar el tejido y liberar las células al medio, dejando dentro del tamiz detritus y tejido estructural.

Al finalizar de tamizar, con otras pinzas se exprimió el tamiz al máximo y se desechó. El contenido celular se colectó con una pipeta Pasteur en tubos de plástico de 10 ml (Costar). A la caja de Petri se le adicionó 1 ml mas de Hanks' para lavar y recoger las células restantes. Hecho esto se centrifugaron células de ganglio y bazo, de la misma forma, a 2 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente; se

decantó el sobrenadante (se flameó antes y después de hacer esto) y la pastilla de células de ganglios se resuspendió con 8 ml de Hanks' y se centrifugó de nuevo como antes. Para la pastilla de células de bazo, se resuspendió en 1 ml de una solución de cloruro de amonio-Tris para lisar eritrocitos, se dejó reposar por 1 minuto y se adicionaron 7 ml de Hanks' para seguir el mismo procedimiento de lavado que con las células de ganglio.

Finalizados los lavados, las pastillas se resuspendieron en 3 ml de RPMI completo, se tomaron 10 μ l y se diluyeron con 90 μ l de azul tripano. De esta mezcla se tomaron 10 μ l y se colocaron en una cámara de Neubauer para contar las células (66).

10.- DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS Y LA CONCENTRACION DE CONCAVALINA A.

Para determinar tanto la concentración óptima de estimulación de concanavalina A como el número adecuado de células por pozo de microcultivo se emplearon ratones NIH normales, sin inmunizar, de los cuales se obtuvieron los ganglios y el bazo y las células fueron extraídas como se describió antes.

Inicialmente se hicieron diluciones de la suspensión celular en RPMI completo para tener 10^5 , 2×10^5 y 5×10^5 células por pozo (180 μ l de volumen por pozo).

Se llenaron pozos con estas cantidades de células y se adicionó concanavalina A a las siguientes concentraciones:

5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (en un volúmen de 20 μl), todos por sextuplicado. Así, cada pozo contenía un volumen final de 200 μl . Se sellaron las placas de microcultivo (Nunc) y se incubaron en una incubadora con CO_2 al 5% y 95% de aire (Forma Scientific 3157) a 37°C durante periodos de 72 y 120 horas. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo, se adiciono a cada pozo 1 μCi de timidina tritiada [CEN SACLAY actividad específica: 6.7 Ci mMole (en un volúmen de 20 μl)].

Al final del último día de cultivo, el volumen de cada pozo de microcultivo se aspiró utilizando un cosechador semiautomático (Mini-Mash II M.A. Bioproducts) reteniendo las células en filtros de fibra de vidrio (#23 M.A. Bioproducts). Se lavaron los pozos por 4 o 5 veces con agua desionizada y después de que se secaron los filtros, estos se mezclaron con 1.5 ml de líquido de centelleo (INSTA-GEL Packard), para determinar indirectamente la radiactividad incorporada en el DNA de las células que proliferaron, en un contador de centelleo (Beckman LS 5801) utilizando como parametro el número de cuentas por minuto.

Se calcularon los promedios de los resultados obtenidos, así como los errores estandar y se graficó cuentas por minuto contra concentración de concanavalina A tanto para ganglios como para bazo a 72 y a 120 horas.

11.- DETERMINACION DE LA DOSIS OPTIMA DE PORINAS PARA LA ESTIMULACION DE LOS LINFOCITOS.

En este experimento se usaron ademas de ratones normales, ratones inmunizados (lotes de 3 animales) con Salmonella typhimurium acetonzada en las cantidades: 5 mil, 25 mil, 50 mil, 100 mil y 200 mil bacterias por mililitro (en un volúmen de 0.5 ml) o con porinas (lotes de 2 animales) de la misma bacteria en Adyuvante Completo de Freund a una concentración de 100 µg/ml; la bacteria completa vía intraperitoneal mientras que las porinas en los cojinetes plantares de las patas traseras y delanteras.

Otros lotes de ratones fueron inoculados con SSF estéril como testigos de Salmonella typhimurium y SSF-adyuvante como testigo de porinas.

Después de 7 días de inmunización, se sacrificó (de la forma ya mencionada) un animal de cada lote y se hizo el mismo procedimiento de obtención de células de bazo y ganglios.

Las células fueron cultivadas en presencia de porinas de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Escherichia coli a las siguientes concentraciones (igual para las 3 cepas): 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 150 µg/ml. Se incluyó el control positivo de con A. También se incluyeron cultivos con LPS de Salmonella typhi 0901 a concentraciones equivalentes al porcentaje de contaminación de los preparados de porinas. De esta forma, se manejaron las siguientes variables: número de

bacterias, células de bazo inmune y testigo, células de ganglio inmune y testigo, concentración de porinas de tres bacterias y concentración de LPS.

Los cultivos se mantuvieron por 120 horas (5 días) y la adición de timidina tritiada, así como la cosecha se realizaron igual que como en el experimento anterior. La activación de los linfocitos se determinó como la proporción de cuentas por minuto obtenidas en los cultivos estimulados con porinas comparadas con los cultivos sin estímulo. Así mismo, se comparó el nivel de estimulación logrado con las porinas de las tres cepas utilizadas, teniendo como referencia que los ratones inmunes fueron inoculados solo con Salmonella typhimurium.

RESULTADOS.

1.-ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR CON A.

En el cuadro 1 se presentan los resultados de la estimulación de linfocitos de ganglio y bazo por con A. El mayor número de cuentas por minuto se encontró con 5 $\mu\text{g/ml}$ de con A para 200 y 500 mil células, aunque para células de bazo no fue tan claro. Este cultivo se mantuvo por 72 horas.

En el cuadro 2 se presentan los resultados cambiando únicamente el tiempo de cultivo. Con 100 mil células por pozo no se presenta estimulación sobresaliente, pero con 200 o con 500 mil células por pozo hay una estimulación con 5 $\mu\text{g/ml}$ que se diferencia del resto.

En el cuadro 3 se presentan los resultados de la estimulación con las concentraciones de concanavalina A reducidas a 0 a 20 $\mu\text{g/ml}$ y con un lapso de cultivo de 120 horas. Las concentraciones de con A más eficientes fueron 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ en los cultivos con 200 mil y 500 mil células por pozo. En los cultivos con 100 mil células por pozo, definitivamente, la estimulación fue muy baja para cualquiera de las concentraciones de con A estudiadas.

CUADRO 1
ESTIMULACION DE LINFOCITOS DE RATON NIH POR CONCAVALINA A
CELULAS DE GANGLIO

CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)						
NUMERO DE CELULAS POR POZO	0	5	25	50	100	
	(Incorporación de H-TDR, CPM)					
100,000	342 $\pm$ 65	234 $\pm$ 76	453 $\pm$ 242	655 $\pm$ 248	149 $\pm$ 44	
200,000	2,309 $\pm$ 1,726	4,416 $\pm$ 1,889	213 $\pm$ 55	610 $\pm$ 319	196 $\pm$ 67	
500,000	578 $\pm$ 251	3,984 $\pm$ 887	532 $\pm$ 317	218 $\pm$ 58	377 $\pm$ 78	

CELULAS DE BAZO

CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)						
NUMERO DE CELULAS POR POZO	0	5	25	50	100	
	(Incorporación de H-TDR, CPM)					
100,000	115 $\pm$ 23	1,099 $\pm$ 215	1,293 $\pm$ 509	750 $\pm$ 209	1,351 $\pm$ 217	
200,000	211 $\pm$ 38	282 $\pm$ 170	228 $\pm$ 36	3,338 $\pm$ 91	216 $\pm$ 31	
500,000	765 $\pm$ 276	1,661 $\pm$ 1,390	2,670 $\pm$ 1,600	290 $\pm$ 49	296 $\pm$ 99	

Se obtuvieron ganglios linfáticos y bazo de ratones NIH normales de 10 a 12 semanas de edad. Se cultivaron de 200 a 500 mil células en pozos de microcultivo, por sextuplicado adicionand distintas concentraciones de concavalina A. El cultivo se dió por terminado a las 96 horas, 18 horas antes se agregó 1 μCi de $^3\text{HTdr}$ por pozo, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleno. Los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto $\pm$ error estandar.

CUADRO 2
ESTIMULACION DE CELULAS LINFÓCIDES DE RATON NIH CON CONCAVALINA A
CELULAS DE GANGLIO

CONCENTRACION DE CONCAVALINA A (ug/ml)						
NUMERO DE CELULAS	0	5	25	50	100	
POR POZO		(Incorporación de H-TDR, CPM)				
100,000	244 ± 376	3,833 ± 2,129	695 ± 258	416 ± 154	327 ± 115	
200,000	1,120 ± 346	29,425 ± 5,052	237 ± 120	102 ± 6	839 ± 690	
500,000	1,371 ± 665	53,678 ± 3,672	153 ± 22	136 ± 11	1,685 ± 1,552	

CELULAS DE BAZO						
CONCENTRACION DE CONCAVALINA A (ug/ml)						
NUMERO DE CELULAS	0	5	25	50	100	
POR POZO		(Incorporación de H-TDR, CPM)				
100,000	114 ± 23	241 ± 76	167 ± 22	299 ± 93	206 ± 26	
200,000	1,912 ± 1,218	5,964 ± 2,068	228 ± 36	173 ± 23	158 ± 16	
500,000	3,417 ± 2,171	41,433 ± 3,850	357 ± 68	7,701 ± 6,178	198 ± 33	

Se obtuvieron ganglios linfáticos y bazo de ratones NIH normales de 10 a 12 semanas de edad. Se cultivaron de 100 a 500 mil células en pozos de microcultivo, por sextuplicado adicionando distintas concentraciones de concanavalina A. El cultivo se dió por terminado a las 120 horas, 18 horas antes se agregó 1 μ Ci de ³H-Tdr por pozo, la incorporación del material radioactivo se determinó en un contador de centelleo. Los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto $\pm$ el error estandar.

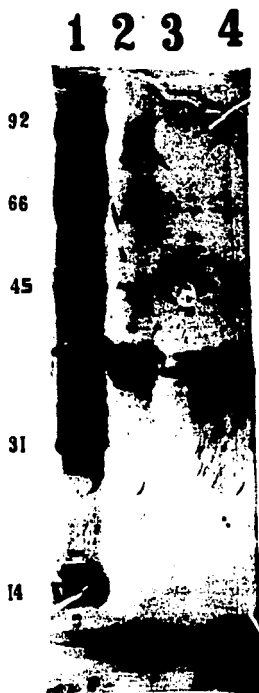
CUADRO 3
ESTIMULACION DE CELULAS LINFÓIDES DE RATON NIH CON CONCAVALINA A
CELULAS DE GANGLIO

NUMERO DE CELULAS POR POZO	CONCENTRACION DE CONCAVALINA A (µg/ml)				
	0	1	5	10	20
		(Incorporación de H-TOR, CPM)			
100,000	331 ± 180	486 ± 112	1,874 ± 325	3,644 ± 359	16,835 ± 15,508
200,000	2,201 ± 1,771	1,229 ± 363	6,903 ± 622	12,090 ± 1,406	10,140 ± 1,001
500,000	1,260 ± 231	4,685 ± 1,837	36,661 ± 12,072	52,917 ± 5,847	55,265 ± 3,696

Se obtuvieron ganglios linfáticos de ratones NIH normales de 10 a 12 semanas de edad. Se cultivaron de 100 a 500 mil células en pozos de microcultivo, por sextuplicado adicionando distintas concentraciones de concanavalina A. El cultivo se dió por terminado a las 120 horas, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³H-TdR por pozo, la incorporación de material radioactivo se determinó en un contador de centelleo. Los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto ± el error estandar.

2.-ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PORINAS.

En la figura anexa se muestra el corrimiento electroforético de las porinas obtenidas de las tres bacterias empleadas, después de ser separadas del resto de proteínas de membrana externa por filtración en gel. Se observa que corrieron entre los marcadores de peso molecular de 31 y 45 Kd, manifestadas como un conjunto de tres bandas, aunque mucho más visibles las porinas de Salmonella typhimurium. Empleando la tinción de plata, que es 500 veces más sensible que la tinción de Coomassie, se observo otra banda de proteína (en los carriles de las porinas de las tres cepas), muy tenue que solo fue visible dejando revelar por tiempo prolongado con lo que las bandas de las porinas se intensificaron aún más.



Electroforesis en gel de poliacrilamina -SDS- en condiciones reductoras.

Carril 1.- Marcadores de peso molecular estándar.

Carril 2.- Porinas de Salmonella typhimurium

Carril 3.- Porinas de Salmonella typhi

Carril 4.- Porinas de Escherichia coli

El gel fue revelado con la tinción de Plata para proteínas.

3.-ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR PORINAS.

En el cuadro 4 se muestran los resultados de los cultivos de células de ganglios linfáticos en presencia de porinas de Salmonella typhimurium, Salmonella typhi y Escherichia coli. En este experimento los ratones fueron inmunizados con Salmonella typhimurium acetonicada, habiendo determinado previamente 50 mil bacterias por vía intraperitoneal como la dosis inmunogénica óptima. En el cuadro 5 se incluyen los testigos de con A y LPS.

Para las porinas de las tres cepas de bacterias, los valores de estimulación no presentan ninguna tendencia de una concentración óptima (máxima) de porinas, como sucede con el mitógeno con A. Los valores de estimulación obtenidos entre 2 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de porinas de las tres cepas fueron muy similares. Sin embargo, arriba de 50 $\mu\text{g/ml}$ los resultados fueron inconsistentes.

A pesar de que los ratones fueron inmunizados con Salmonella typhimurium, la proliferación en respuesta a las porinas de las tres cepas fue muy similar. En el cuadro 6 se presentan los resultados de la estimulación de células de bazo con porinas de las tres cepas bacterianas, de la misma forma que el experimento anterior. Los valores en cuentas por minuto son mucho más elevados en todas las concentraciones con las tres cepas, comparadas con las células de ganglios.

Las porinas de las 3 cepas estimularon la proliferación celular a todas las concentraciones en forma muy similar. Asimismo, la dosis óptima para las tres cepas fue de 20 $\mu\text{g/ml}$.

En el cuadro 7 se muestran los resultados de la estimulación de linfocitos de bazo con porinas de las tres cepas de bacterias.

CUADRO 4

RESPUESTA DE LINFOCITOS POR PORINAS (GANGLIOS)

PORINAS	SALMONELLA TYPHIMURIVM		SALMONELLA TYPHI		ESCHERICHIA COLI	
	IMMUNE	CONTROL	IMMUNE	CONTROL	IMMUNE	CONTROL
($\mu\text{g/ml}$)						
2	3,800 $\pm$ 777	1,450 $\pm$ 189	4,197 $\pm$ 223	1,223 $\pm$ 531	5,099 $\pm$ 1,243	723 $\pm$ 213
5	5,056 $\pm$ 542	2,283 $\pm$ 716	3,845 $\pm$ 395	2,247 $\pm$ 712	2,640 $\pm$ 791	1,516 $\pm$ 182
10	3,167 $\pm$ 704	2,113 $\pm$ 747	3,800 $\pm$ 560	2,300 $\pm$ 475	1,747 $\pm$ 238	1,006 $\pm$ 423
20	4,093 $\pm$ 704	1,060 $\pm$ 338	5,363 $\pm$ 137	2,173 $\pm$ 1,435	1,887 $\pm$ 411	910 $\pm$ 223
50	1,797 $\pm$ 714	836 $\pm$ 359	6,643 $\pm$ 658	2,170 $\pm$ 669	596 $\pm$ 226	1,720 $\pm$ 803
100	6,263 $\pm$ 1,943	1,500 $\pm$ 665	9,183 $\pm$ 2,660	7,076 $\pm$ 4,801	3,505 $\pm$ 2,332	13,020 $\pm$ 8,303
150	770 $\pm$ 283	2,220 $\pm$ 913	6,917 $\pm$ 2,309	3,643 $\pm$ 1,274	915 $\pm$ 364	1,076 $\pm$ 404

RESPUESTA DE LINFOCITOS POR PORINAS (BAZO)

PORINAS	SALMONELLA TYPHIMURIVM		SALMONELLA TYPHI		ESCHERICHIA COLI	
	IMMUNE	CONTROL	IMMUNE	CONTROL	IMMUNE	CONTROL
($\mu\text{g/ml}$)						
2	8,803 $\pm$ 186	4,793 $\pm$ 776	6,060 $\pm$ 588	4,660 $\pm$ 976	6,773 $\pm$ 408	5,220 $\pm$ 195
5	11,107 $\pm$ 413	3,443 $\pm$ 740	6,404 $\pm$ 534	3,592 $\pm$ 990	7,252 $\pm$ 379	3,576 $\pm$ 216
10	12,907 $\pm$ 993	4,440 $\pm$ 1,051	10,183 $\pm$ 2,352	3,350 $\pm$ 808	5,610 $\pm$ 1,095	3,460 $\pm$ 405
20	13,503 $\pm$ 483	4,483 $\pm$ 1,175	8,237 $\pm$ 1,339	7,760 $\pm$ 428	3,503 $\pm$ 434	2,110 $\pm$ 130
50	9,737 $\pm$ 868	1,357 $\pm$ 464	9,460 $\pm$ 360	9,457 $\pm$ 915	10,663 $\pm$ 2,940	1,493 $\pm$ 487
100	12,617 $\pm$ 3,895	6,257 $\pm$ 4,486	26,414 $\pm$ 5,354	26,843 $\pm$ 10,207	30,443 $\pm$ 13,954	19,330 $\pm$ 7,752
150	5,068 $\pm$ 1,863	14,536 $\pm$ 14,164	10,967 $\pm$ 604	2,875 $\pm$ 690	2,867 $\pm$ 947	14,823 $\pm$ 12,649

Se inmunizó un ratón de 10 semanas de edad con *Salmonella typhimurium*, 50,000 bacterias inactivadas por acetona, por vía intraperitoneal sin adyuvante, 7 días después se obtuvieron los ganglios linfáticos y bazo y se cultivaron 200,000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como control células de ratones no inmunizados. Los resultados están expresados en CPM promedio $\pm$ el error estándar.

CUADRO 5

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA A

CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)					
TIPO DE CELULA	1	5	10	20	30
	(Incorporación de H-TOR, CPM)				
BAZO NORMAL	40,646 $\pm$ 6,160	88,027 $\pm$ 31,363	131,220 $\pm$ 12,637	2,257 $\pm$ 1,008	1,227 $\pm$ 247
BAZO IMMUNE	14,195 $\pm$ 2,854	46,500 $\pm$ 960	104,257 $\pm$ 4,661	21,720 $\pm$ 1,948	2,597 $\pm$ 257
BAZO NORMAL	7,527 $\pm$ 1,081	63,777 $\pm$ 801	127,370 $\pm$ 5,989	1,940 $\pm$ 671	2,320 $\pm$ 442
BAZO IMMUNE	13,160 $\pm$ 784	45,047 $\pm$ 3,041	71,423 $\pm$ 6,838	4,210 $\pm$ 625	327 $\pm$ 115

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR LIPOPOLISACARIDO

CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.001	0.01	0.1	1	10
	(Incorporación de H-TOR, CPM)				
BAZO NORMAL	3,597 $\pm$ 308	3,880 $\pm$	102	33,887 $\pm$ 5,304	3,593 $\pm$ 96
657 $\pm$ 118					1,693 $\pm$ 525
BAZO IMMUNE	7,587 $\pm$ 612	6,680 $\pm$ 1,178	4,473 $\pm$ 1,297	7,557 $\pm$ 1,956	2,997 $\pm$ 355
891 $\pm$ 122					837 $\pm$ 249
BAZO NORMAL	3,003 $\pm$ 487	1,467 $\pm$	226	1,070 $\pm$ 357	1,407 $\pm$ 202
2,313 $\pm$ 780					1,687 $\pm$ 361
BAZO IMMUNE	4,560 $\pm$ 413	2,303 $\pm$	72	3,803 $\pm$ 1,075	4,016 $\pm$ 114
1,729 $\pm$ 345					473 $\pm$ 136
					1,843 $\pm$ 706

Se inmunizó un ratón NIH con *Salmonella typhimurium* tratada con acetona, 50 mil bacterias por vía intraperitoneal sin adyuvante, con el objeto de evaluar la respuesta proliferativa contra porinas. Para establecer la viabilidad y el efecto del lipopolisacárido contaminante en las muestras de proteínas de membrana externa, se cultivaron 200 mil células de ganglio o bazo adicionando concentraciones mitogénicas de concavalina A o lipopolisacárido de *Salmonella typhi*. El cultivo se suspendió al quinto día, dieciocho horas antes se agregó 1 μCi de ^3H Tdr por pozo y la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo, los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto $\pm$ el error estándar. Se incluyen controles de ratones no inmunizados con *Salmonella typhimurium*, cuyas células se cultivaron frente a distintas concentraciones de porinas.

CUADRO 6
RESPUESTA DE LINFOCITOS POR PORINAS (BAZO)

PORINAS ($\mu\text{g/ml}$)	SALMONELLA TYPHIMURIUM		SALMONELLA TYPHI		ESCHERICHIA COLI	
	INMUNE	CONTROL	INMUNE	CONTROL	INMUNE	CONTROL
2	42,903 $\pm$ 7,673	7,116 $\pm$ 675	51,340 $\pm$ 10,300	5,133 $\pm$ 795	87,576 $\pm$ 23,803	777 $\pm$ 191
5	28,370 $\pm$ 4,463	7,736 $\pm$ 1,454	99,870 $\pm$ 18,898	1,600 $\pm$ 621	119,976 $\pm$ 10,894	337 $\pm$ 38
10	20,385 $\pm$ 945	11,959 $\pm$ 6,801	43,357 $\pm$ 2,193	876 $\pm$ 409	74,381 $\pm$ 2,613	733 $\pm$ 43
20	64,230 $\pm$ 13,535	3,964 $\pm$ 1,655	118,953 $\pm$ 11,998	2,763 $\pm$ 693	136,947 $\pm$ 17,809	606 $\pm$ 178
50	53,770 $\pm$ 4,198	1,476 $\pm$ 740	92,407 $\pm$ 8,432	6,143 $\pm$ 300	112,723 $\pm$ 11,449	522 $\pm$ 318
100	49,761 $\pm$ 5,031	877 $\pm$ 387	64,268 $\pm$ 8,105	10,173 $\pm$ 923	75,023 $\pm$ 6,213	350 $\pm$ 245

Se inmunizó un ratón NIH de 10 semanas de edad con *Salmonella typhimurium*, 50,000 bacterias inactivadas por acetona, por vía intraperitoneal sin adyuvante, 7 días después se obtuvo el bazo y se cultivaron 200,000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como controles células de ratones no inmunizados. Los resultados están expresados en CFM promedio $\pm$ el error estándar.

CUADRO 6

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)

		CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)				
TIPO DE CELULA		0	1	5	10	20
30						
(Incorporación de H-TOR, CPM)						
BAZO NORMAL	2,092 $\pm$ 1,079	87,454 $\pm$ 30,387	112,508 $\pm$ 38,406	99,144 $\pm$ 19,732	101,603 $\pm$ 9,716	59,407 $\pm$ 12
BAZO INMUNE	1,120 $\pm$ 430	16,143 $\pm$ 1,533	38,843 $\pm$ 1,453	46,267 $\pm$ 7,868	32,808 $\pm$ 12,189	1,993 $\pm$ 331

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA A

		CONCENTRACION DE LIPOLISACARIDO ($\mu\text{g/ml}$)					
TIPO DE CELULA		0.001	0.01	0.1	1	5	10
							20
(Incorporación de H-TOR, CPM)							
BAZO NORMAL	109,617 $\pm$ 4,391	83,263 $\pm$ 10,535	72,628 $\pm$ 15,705	83,003 $\pm$ 14,649	73,847 $\pm$ 31,358	112,007 $\pm$ 76,005	111,473 $\pm$ 1,108
BAZO INMUNE	2,417 $\pm$ 565	2,417 $\pm$ 565	5,143 $\pm$ 1,980	5,100 $\pm$ 2,054	8,953 $\pm$ 5,165	6,107 $\pm$ 356	72

Se inmunizó un ratón NIH con Salmonella typhimurium tratada con acetona, 50 mil bacterias por vía intraperitoneal sin adyuvante, con el objetivo de evaluar la respuesta proliferativa contra porinas. Para establecer la viabilidad y el efecto del lipopolisacárido contaminante en las muestras de proteínas de membrana externa, se cultivaron 200 mil células de ganglio o bazo adicionando concentraciones mitogénicas de concavalina A o lipopolisacárido de Salmonella typhi. El cultivo se suspendió al quinto día, dieciocho horas antes se agregó 1 μCi de ^3H Tdr por pozo y la incorporación del material radioactivo se determinó en un contador de centelles, los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto. Se incluyeron controles de ratones no inmunizados con Salmonella typhimurium, cuyas células se cultivaron también frente a distintas concentraciones de porinas.

CUADRO 7

RESPUESTA DE LINFOCITOS POR PORINAS (BAZO)

PORINAS ($\mu\text{g/ml}$)	SALMONELLA TYPHIMURIUM		SALMONELLA TYPHI		ESCHERICHIA COLI	
	INMUNE	CONTROL	INMUNE	CONTROL	INMUNE	CONTROL
2	35,333 $\pm$ 2,229	9,271 $\pm$ 744	27,160 $\pm$ 2,316	6,913 $\pm$ 1,181	24,643 $\pm$ 3,354	5,153 $\pm$ 584
5	30,493 $\pm$ 1,637	8,513 $\pm$ 297	26,767 $\pm$ 1,779	5,977 $\pm$ 347	15,853 $\pm$ 917	5,130 $\pm$ 142
10	31,294 $\pm$ 985	13,427 $\pm$ 672	30,073 $\pm$ 7,621	11,693 $\pm$ 3,611	19,507 $\pm$ 527	6,877 $\pm$ 792
20	32,773 $\pm$ 2,748	14,075 $\pm$ 1,723	30,873 $\pm$ 1,568	10,083 $\pm$ 1,341	16,640 $\pm$ 916	6,225 $\pm$ 503
50	16,672 $\pm$ 3,385	10,007 $\pm$ 301	30,194 $\pm$ 612	9,130 $\pm$ 641	19,984 $\pm$ 945	6,913 $\pm$ 1,031
100	39,917 $\pm$ 1,436	17,163 $\pm$ 298	31,390 $\pm$ 5,281	23,770 $\pm$ 4,711	35,625 $\pm$ 3,387	12,740 $\pm$ 5,256
150	21,617 $\pm$ 492	7,736 $\pm$ 524	21,977 $\pm$ 303	7,203 $\pm$ 488	37,395 $\pm$ 2,025	15,013 $\pm$ 1,092

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR PORINAS (GANGLIOS)

PORINAS ($\mu\text{g/ml}$)	SALMONELLA TYPHIMURIUM		SALMONELLA TYPHI		ESCHERICHIA COLI	
	INMUNE	CONTROL	INMUNE	CONTROL	INMUNE	CONTROL
2	14,997 $\pm$ 1,703	9,268 $\pm$ 1,741	10,740 $\pm$ 192	9,127 $\pm$ 801	9,717 $\pm$ 1,998	7,355 $\pm$ 145
5	12,570 $\pm$ 1,189	10,529 $\pm$ 2,124	10,226 $\pm$ 904	8,313 $\pm$ 1,391	5,727 $\pm$ 1,125	8,253 $\pm$ 184
10	12,177 $\pm$ 1,732	-----	10,990 $\pm$ 1,264	-----	6,717 $\pm$ 734	-----
20	13,413 $\pm$ 1,539	21,346 $\pm$ 1,004	13,088 $\pm$ 1,106	14,293 $\pm$ 396	4,397 $\pm$ 454	8,540 $\pm$ 306
50	2,237 $\pm$ 109	3,548 $\pm$ 1,016	19,172 $\pm$ 1,938	18,273 $\pm$ 223	5,327 $\pm$ 327	10,577 $\pm$ 5,113
100	2,267 $\pm$ 289	-----	8,510 $\pm$ 1,660	-----	3,910 $\pm$ 832	-----
150	2,443 $\pm$ 338	3,385 $\pm$ 639	5,983 $\pm$ 688	12,756 $\pm$ 2,645	6,230 $\pm$ 2,605	6,087 $\pm$ 4,898

Se inmunizó un ratón NIH de 10 semanas de edad con porinas de *Salmonella typhimurium*, 100 μg en adyuvante completo, en los cojinetes plantares, 7 días después se obtuvieron los ganglios linfáticos y el bazo y se cultivaron 200,000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como testigos células de ratones que recibieron ACI y SST. Los resultados están expresados en CPM promedio $\pm$ el error estándar.

CUADRO 8

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA A

TIPO DE CELULA	CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)		
	0	10	20
	(Incorporación de H-TDR, CPM)		
BAZO NORMAL	5,357 $\pm$ 1,672	24,373 $\pm$ 2,954	55,640 $\pm$ 5,078
BAZO INMUNE	21,240 $\pm$ 2,570	40,847 $\pm$ 968	58,947 $\pm$ 3,589
GANGLIO NORMAL	5,253 $\pm$ 1,632	41,917 $\pm$ 637	57,793 $\pm$ 1,880
GANGLIO INMUNE	2,403 $\pm$ 525	85,233 $\pm$ 5,331	14,950 $\pm$ 7,292

ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR LIPOLISACARIDO

TIPO DE CELULA	CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	1	5	10	20
	(Incorporación de H-TDR, CPM)				
BAZO NORMAL	5,357 $\pm$ 1,672	4,533 $\pm$ 1,445	6,493 $\pm$ 286	3,607 $\pm$ 341	797 $\pm$ 148
BAZO INMUNE	21,240 $\pm$ 2,570	21,090 $\pm$ 6,520	25,440 $\pm$ 3,025	16,837 $\pm$ 372	11,090 $\pm$ 2,713
GANGLIO NORMAL	5,253 $\pm$ 1,632	11,227 $\pm$ 734	6,597 $\pm$ 547	713 $\pm$ 115	237 $\pm$ 49
GANGLIO INMUNE	2,403 $\pm$ 525	2,979 $\pm$ 1,280	1,323 $\pm$ 160	330 $\pm$ 64	355 $\pm$ 55

Se inmunizó un ratón NIH con porinas de *Salmonella typhimurium*, 100 μg en ACF, en los coñetes plantares con el fin de evaluar la respuesta proliferativa de células linfoides. Para evaluar la viabilidad celular y el efecto del lipopolisacárido contaminante, se cultivaron 200 mil células de bazo o ganglio por pozo, adicionando concentraciones alógenas de concavalina A o lipopolisacárido *Salmonella typhi* 0901. El cultivo se suspendió al quinto día, dieciocho horas antes se agregó 1 μCi de $^3\text{H-Tdr}$ por pozo y la incorporación del material radioactivo se determinó en un contador de centelleo, los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto $\pm$ al error estándar. Se incluyeron testigos de ratones que recibieron SSF en ACF, cuyas células se cultivaron también frente a distintas concentraciones de porinas.

La diferencia en este experimento es que los ratones fueron inmunizados con porinas y no con la bacteria completa.

Todas las concentraciones de porinas de las tres cepas bacterianas estimularon la proliferación de linfocitos. Hasta 20 $\mu\text{g/ml}$, para las tres cepas, cualquier concentración estimula la proliferación celular en el orden descendente: S.typhimurium, S. typhi y E.coli. Arriba de 50 $\mu\text{g/ml}$ la estimulación mayor se invierte.

DISCUSION

El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de analizar la capacidad de las porinas de S. typhimurium de inducir una respuesta inmune de tipo celular específica. Para ello se emplearon porinas de S. typhimurium obtenidas por el método de Nikaido y cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel).

Se analizó la respuesta proliferativa de células linfoides derivadas del bazo y de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y de grupos testigo.

Los principales resultados son:

1.- Las porinas son capaces de inducir la proliferación in vitro de linfocitos murinos de los ratones inmunizados (tanto con la bacteria completa como con porinas), pero no en aquellos de los grupos testigo.

2.- El LPS contaminante en las porinas no influyó importantemente en esta respuesta.

3.- Las porinas derivadas de otras bacterias Gram-negativas (S. typhi y E. coli) indujeron una respuesta proliferativa por los linfocitos de ratones inmunizados con S. typhimurium

Estudios previos han demostrado que la transferencia pasiva de linfocitos contra antígenos de S. typhimurium confiere resistencia a ratones no inmunizados (54). Nuestros

resultados indican que las porinas inducen proliferación celular. No obstante el rango amplio de concentraciones de porinas, todas mostraron un nivel semejante de estimulación.

A pesar de tener estimulación de linfocitos con LPS purificado, este efecto no fue aparente en los cultivos estimulados con PME-LPS, el cual, sin duda, generó proliferación celular de linfocitos totales, in vitro con valores de CPM mayores que los generados por LPS solo. Lo anterior, indica que la proliferación observada dependió predominantemente de linfocitos T, ya que estos no proliferan *in vitro* en respuesta al LPS, a diferencia de lo que ocurre con los linfocitos B. La obtención de PME por el método de Schnaitman contienen de 7-10% de contaminación con LPS. Por el método de Nikaido la contaminación disminuye a menos del 0.05%. Sin embargo, aún con esta concentración ínfima de LPS, el sistema humoral del ratón genera anticuerpos específicos contra dicha molécula (36).

Los perfiles electroforéticos de las porinas de las 3 cepas confirman las semejanzas bioquímica e inmunogénica encontradas entre estas, sugiriendo un origen ancestral común (34). Tokunaga (67) y Lee (68) encontraron secuencias de aminoácidos en común entre las porinas de E.coli y S.typhimurium. El análisis de sus secuencias de nucleótidos en donde hay una similitud de hasta 50%, confirmó dichos hallazgos.

Coincidente con lo anterior, se encuentra similitud antigénica, demostrada en los experimentos de protección activa y pasiva en el ratón, donde los anticuerpos generados contra porinas de S. typhi, que protegen al reto con la bacteria homóloga, fueron también protectores al reto con S. typhimurium. En los experimentos de estimulación in vitro, los linfocitos de ratones inmunizados con S. typhimurium respondieron contra las porinas derivadas de las tres cepas en forma muy similar.

La similitud antigénica ha sido demostrada en experimentos de protección activa y pasiva en el ratón, donde los anticuerpos generados contra porinas de Salmonella typhi que protegen al reto con la bacteria homóloga, fueron también protectores al reto con Salmonella typhimurium. Sin embargo, mediante el método de inmunotransferencia se demostró que tales anticuerpos no reconocen a las porinas de Escherichia coli (34). Lo anterior sugiere que a pesar de haber similitud en el reconocimiento de las porinas de las tres cepas por linfocitos T, esto no ocurre en el caso de los linfocitos B, en los cuales la respuesta parece ser más selectiva. Dichos resultados están de acuerdo con las observaciones de que los epítopes en un antígeno reconocidos por un linfocito T no son los mismos que aquellos reconocidos por linfocitos B.

En base a los resultados del presente estudio, es evidente que las PME inducen una respuesta específica por

linfocitos (aparentemente linfocitos T) de ratones inmunizados con la bacteria total. Los hallazgos no indican, sin embargo, la capacidad protectora de dicha respuesta. Para ello, se requiere de estudios adicionales, mediante transferencia de linfocitos T derivados de ratones inmunizados a animales singénicos sin inmunizar. La respuesta cruzada contra porinas derivadas de otros Gram-negativos, sugiere que la inmunización con una de ellas podría conferir protección cruzada contra otras bacterias relacionadas.

CONCLUSIONES.

10. Las porinas de Salmonella typhimurium, S.typhi y Escherichia coli contaminadas con LPS estimulan la proliferación celular de linfocitos, in vitro, en un grado similar, no obstante que los linfocitos provienen de ratones inmunizados con S. typhimurium o con porinas de esta.

20. La estimulación cruzada demuestra que existen determinantes antigénicos similares en las porinas de las 3 enterobacterias, reconocidos no solo por el sistema humoral sino también por el celular, aunque con un patrón diferente de reactividad.

BIBLIOGRAFIA.

1. B. Jann, y Westphal, O. Microbial polysaccharides. In The antigens vol.III Ed. by M. Sela. Academic Press, New York, pp.1-125.
2. Edelman, R., y Levine, M.M. Summary of an international workshop on typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 8: 329, (1986)
3. Felix, A. y Pitt, R.M. The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation its antigenic constituents. J. Hyg. (Camb) 49:92, (1975).
4. Pfeiffer, R. y Kolle, V. Ober die spezifische immunitats reaktion der Typhusbazillen. Z. Hyg Infekt-kr 21: 202-206, (1896).
5. Pérez, M.A. y Cabrera, R. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoidea. Rev. Salud Pública de México. XV: 185-194, (1974)
6. Kumate, J. Inmunidad inmunización y vacunas. Primera edición, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp.227-247.
7. Joo, I. Present status and perspectives of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b diseases mediated by monoclonal antibody direct against a *Haemophilus* outer membrane protein. Lancet 1: 366-368, (1982).
8. Hornick, R.B., Dupont, H.L., Dawkins, A.T., Snyder, M.J. y Woodward, T.E. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Simposio Series in immunological standarization. 15: 143-150, (1968).
9. Germainier, R. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Boletín de la oficina sanitaria panamericana. Abril 1977.
10. Germainier, R. The live oral typhoid vaccine Ty21a: recent field trial result. Sclavo international conference on Bacterial vaccines and local immunity. Stowa, Italy pp.10-12, (1986).
11. Kumate, J. Inmunidad, inmunizaciones y vacunas. segunda edición. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México. pp 227-247, (1979).
12. Tully, J.G., Saines, S. y Tigertt, V.D. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. J. Infect. Dis. 112: 118-124, (1963).
13. Anderson, E.S. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio series in immunobiological standarization. 15: 79-86, (1968).
14. Felix, A., Krikorian, K.S. y Reitter, R. The ocurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in the sera. J. Hyg. 35: 451- 472, (1935).
15. Hornick, K. B., Greisman, S.E., Woodward, T.E., Dupont, H.L., Dawkins, A.T. y Snyder, M.J. Typhoid fever. Pathogenesis and immunological control. Engl. J. Med. 283: 686-691, 739-743, (1970).
16. Robbins, J.D. y Robbins, J.B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis. 150: 436-449, (1984).
17. Warren, J.W. y Hornick, R.B. Immunization against typhoid fever. Ann. Rev. Med. 30: 457-472, (1979).
18. Chen Szu, S., Stone, A.L., Robbins, J.D., Schneerson, R. y Robbins, J.B. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for the prevention of typhoid fever. J. Exp. Med. 166: 1510-1524, (1987).
19. Pittan, M. y Bohner, H.J. Laboratory assays of different types of field trial typhoid vaccines and relationship to efficacy in man. J. Bacteriol. 14: 652-659, (1966).
20. Mifeld, M.L. y Johnson, V. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 14: 652-659, (1976).
21. Youmans, A.S. y Youmans, G.P. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 99: 42-50, (1965).
22. Venneman, W.R., Brigle, M.J. y Berry, L.J. Immunogenicity of nucleic acid preparation obtained from *Salmonellatyphimurium*. Infect. Immun. 1: 574-582, (1970).

23. Molinari, J.L. y Cabrera, R. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 199-204, (1974).
24. Bragg, P.D. y Hov, C. Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta. 274: 478-488, (1972).
25. Eisenstein, T.K. Evidence for O antigen as the antigenic in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 12: 364-377, (1973).
26. Misfeldt, M.L. y Johnson. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 24: 808-816, (1976).
27. Rosenbuch, J.P. Characterization of the major envelope protein from *E. coli*. Regular rearrangement of the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. J. Biol. Chem. 249: 8019, (1984).
28. Lugtenberg, B. y Van Alphen, L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *E. coli* and other Gram-negative bacteria. Biochem. Biophys. Acta. 737: 51, (1983).
29. Svenson, S.B., Nurménen, M. y Linberg, C.A. Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immunol. 34: 328, (1981).
30. Kussi, N., Nurménen, M. y Saven, H. Immunization with major outer membrane proteins (porin) in experimental murine salmonellosis; effect of lipopolysaccharide. Infect. Immunol. 34: 328, (1981).
31. Kussi, N., Nurménen, M. y Saven, H. Immunization with outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice. Immunol. 25: 863, (1979).
32. Smith, C.J. Immunology of outer membrane proteins of Gram-negative bacteria. In immunology of bacterial cell envelope. Ed. by Stewart-Tull D.E.S. and Davies. John Wiley & sons, Chichester, 1985.
33. Vargas, M. y Teller-G, J. Evaluación de la actividad protectora de las proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* en un modelo experimental murino. Tesis. UNAM, FES-Cuautitlán, 1987.
34. Favela, F.J. Aislamiento y caracterización de proteínas de membrana externa de diferentes cepas de *Salmonella typhi*. Tesis. UNAM, FES-Cuautitlán, 1987.
35. Pavón, S.L. y Pelayo, R. Elaboración de un inmuoadsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi*. Tesis. UNAM, Facultad de Química, 1988.
36. Paniagua, J.F. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-porinas de *Salmonella typhi*. Tesis. UNAM, Facultad de Química, 1988.
37. Germainier, R. Typhoid fever, in Bacterial Vaccines. Ed. by René Germainier. Academic Press, New York. pp. 137-165.
38. Hornick, R.B. et al. Typhoid fever: pathogenesis and immunological control. Partes I y II. New. Engl. J. Med. 283: 686 y 739, (1970).
39. McCartney, A.C. y Wardlaw, A.C. Endotoxic activities of lipopolysaccharides. In immunology of bacterial envelope. Ed. by D.E.S. Stewart-Tull and M. Davies. John Wiley & sons, Chichester, 1970.
40. Gery, I., Kruger, J. y Spiesel, S.Z. Stimulation of B lymphocytes by endotoxin. Reaction of thymus deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T6T6 thymus graft. J. Immunol. 108: 1088, (1972).
41. Ziegler, E.K. y Unanue, E.R. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associates with inhibition of antigen presentation to T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 175, (1982).
42. Moreno, J. y Lipsky, P.E. Functional heterogeneity of human antigen-presenting cells: presentation of soluble antigen but not self Ia by monocytes. J. Clin. Immunol. 6: 9, (1986).
43. Smith, K.A. Interleukin 2. Ann. Rev. Immunol. 2: 283, (1984).
44. Kumar, R., Malaviya, A.N., y Murthy, R.G.S. Immunological study of typhoid: immunoglobulins, C3, antibodies and leukocyte migration inhibition in patients with typhoid fever and TAB vaccinated individuals. Infect. Immun. 10: 1229, (1974).
45. O'Brien, A.D. Innate resistance of mice to *Salmonella* infection. Infect. Immun. 38: 948, (1972).

46. Hoham, A.W. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infect. Immunol.* 22: 763, (1978).
47. O'Brien, A.D. y Metcalf, E.F. Control of early *Salmonella typhimurium* growth in innately *Salmonella*-resistant mice does not require functional T lymphocytes. *J. Immunol.* 124: 121, (1986).
48. Schreiber, J.R., Hicks, L.J. y Celada, A. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon with differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.* 134: 1602, (1985).
49. O'Brien, A.D., Scher, I., Campbell, S.H., et al. Susceptibility of CBA/N mice to infection with *Salmonella typhimurium*: influence of the X-linked gene controlling B lymphocyte function. *J. Immunol.* 123: 720, (1979).
50. O'Brien, A.D. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.* 124: 37, (1986).
51. Tagliabue, A., Nencioni, L., Villa, L. et al. Genetic control of in vitro natural cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by intestinal and splenic lymphoid cells in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 56: 531, (1984).
52. O'Brien, A.D. Innate resistance of mice to *Salmonella* infection. *Infect. Immun.* 38: 948, (1982).
53. Lissner, C.R., Swanson, N.R. y O'Brien, A.D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*, expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages in vitro. *J. Immunol.* 131: 2006, (1983).
54. Paul, C., Shalada, K., Warren, R. et al. Adoptive transfer of murine host protection to salmonellosis with T-cell growth factor-dependent, *Salmonella*-specific T-cell lines. *Infect. Immun.* 48: 40, (1985).
55. Fukazawa, Y., Kagaya, K., Ishibashi, Y. Effect of delayed-type hypersensitivity reaction and transferred lymphokine on resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 38: 986, (1983).
56. Manual de técnicas y procedimientos para el estudio de microorganismos enteropatógenos. Secretaría de Salud. México, D.F., 1987.
57. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680, (1970).
58. Oakley, B.R., Kirsch, D.R. y Morris, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105: 361, (1980).
59. Walker, J.M. *Methods in Molecular Biology. Volume 1 Proteins.* Clifton, New Jersey U.S.A. 1984.
60. Davies, L.G., Dibner, M.D. y Batley, J.F. *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier 1986. U.S.A.
61. Mac Faddin, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* Editorial Médica Panamericana 1984.
62. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. y Farr, A.L. Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, (1951).
63. Karkhanis, T.D., Zeltzer, J.V., Jackson, J.J. y Carlo, D.J. A new improved microassay to determine 2-keto-3 deoxy-octanoate in lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85: 595, (1978).
64. Westphal, O. y Jann, K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry. Volume V. USA 1965 pp.83-91*
65. Carter, P.B. y Collins, F.M. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* 139: 1189, (1974).
66. Manual de prácticas de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Depto de Inmunología IPN 1983 México, D.F.
67. Tokunaga, H., Tokinaga, M. y Nakai, T. Characterization of porins from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* 95: 433-439, (1979).
68. Lee, D., Schnaitman, C. y Pugsley, A. Chemical heterogeneity of major outer membrane pore proteins of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 138: 861-870, (1979).