

40<sup>2e,</sup>



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"OBTENCION, SEPARACION, PURIFICACION Y  
DETERMINACION DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA  
DE LOS PEPTIDOS DE PORINAS DE Salmonella typhi  
9, 12, Vi:d, OBTENIDOS POR DIGESTION CON  
BROMURO DE CIANOGENO"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
OSCAR ARTURO PATLAN RUIZ

Director de Tesis:  
DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# I N D I C E

	Hoja
Abreviaturas.....	1
1.0 Resumen.....	4
2.0 INTRODUCCION	
2.1 Fiebre tifoidea.....	5
2.2 Salmonella typhi.....	8
2.3 Envoltura celular.....	10
2.3.1 Membrana Interna (citoplasmática).....	12
2.3.2 Peptidoglicana.....	12
2.3.3 Espacio periplásmico.....	14
2.3.3.1 Zonas de adhesión.....	15
2.3.4 Membrana externa.....	15
2.3.4.1 Fosfolípidos.....	17
2.3.4.2 Lipopolisacárido (LPS).....	17
2.3.4.3 Antígeno común de enterobacterias (ECA).....	21
2.3.4.4 Efectos del EDTA sobre el LPS.....	21
2.3.4.5 Proteínas de membrana externa (PME).....	22
2.4 Porinas	
2.4.1 Propiedades y Características.....	26
2.4.2 Genes.....	32
2.4.3 Función de las porinas.....	34
2.5 Péptidos de porinas	
2.5.1 Trabajos previos con péptidos de diferentes proteínas.....	37
2.5.2 Mecanismo de reacción del BrCN.....	38
2.5.3 Digestión de porinas con BrCN.....	39
2.6 Vacunas contra la Fiebre Tifoidea.....	41
3.0 JUSTIFICACION.....	50
4.0 OBJETIVOS.....	51
5.0 MATERIAL Y METODOS	
5.1 Material.....	52
5.1.1 Material biológico.....	52
5.1.2 Medios de cultivo.....	52
5.1.3 Reactivos y soluciones.....	52
5.2 Metodología	
5.2.0.1 Cultivo de bacterias.....	53
5.2.0.2 Obtención y purificación de porinas.....	53
5.2.0.3 Determinación de porinas.....	54
5.2.0.4 Determinación de LPS.....	54
5.2.0.5 SDS-PAGE de porinas.....	55

5.2.0.6	Digestión de porinas.....	56
5.2.0.7	SDS-PAGE de los péptidos de las porinas.....	57
5.2.0.7.1	Tinción con azul de Coomassie.....	57
5.2.0.7.2	Tinción con plata.....	58
5.2.0.8	Cromatografía de péptidos por filtración en gel.....	59
5.2.0.9	SDS-PAGE de péptidos separados.....	60
5.2.1.0	Inmunoelctrotransferencia (reveado con rojo de Ponceau).....	60
	(reveado con Ac's monoclonales).....	61
5.2.1.1	Tratamiento del PNC.....	61
5.2.1.2	Isoelectroenfoque.....	62
5.2.1.3	Activación de esplenocitos.....	64
6.0	RESULTADOS	
6.1	Obtención y purificación de porinas.....	67
6.2	Obtención y caracterización electroforetica de péptidos.....	67
6.3	Isoelectroenfoque.....	76
6.4	Separación de péptidos	
6.4.1	Cromatografía por filtración en gel.....	76
6.4.1.1	SDS-PAGE de péptidos separados.....	81
6.4.2	Inmunoelctrotransferencia.....	84
6.5	Estimulación de esplenocitos.....	86
7.0	DISCUSION.....	94
8.0	CONCLUSIONES.....	98
9.0	BIBLIOGRAFIA.....	99

## I. O R E S U M E N

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar la respuesta celular que presentan los esplenocitos de ratones de la cepa C3HeB/Fej en microcultivos, ante la presencia de los péptidos de las porinas de Salmonella typhi 9,12,Vi:d, como antígenos, los cuales se presentaron a las células tanto en forma soluble como particulada (en papel de nitrocelulosa).

Para obtener los péptidos de las porinas estas se digirieron con BrCN. Con el fin de determinar los productos formados se separó una muestra del digerido en SDS-PAGE, observándose que aparecían cuatro bandas al teñir con el colorante de Coomassie y siete bandas cuando se realizó la tinción con plata. Los pesos moleculares calculados para los péptidos observados fueron de 29, 19, 16, 10, 9, 8, y 6 kDa.

La separación de los péptidos se hizo por cromatografía de exclusión molecular y por inmunoelctrotransferencia, obteniéndose en el primer caso un perfil cromatográfico característico formado por seis picos cuando las fracciones eluidas se leyeron a una longitud de onda de 267 nm. Con respecto a la inmunoelctrotransferencia al revelar el PNC con rojo de Ponceau se pudieron apreciar cuatro bandas, las cuales después de cortarse se trataron con DMSO para formar partículas accesibles a las células, con el fin de confirmar la transferencia también se revelaron unas tiras del PNC con un anticuerpo monoclonal.

Los ratones de los cuales se extrajo el bazo, fueron inmunizados con porinas (30 µg) los días 0 y 7 y sacrificados el día 14. La evaluación de la respuesta celular de los esplenocitos ante los péptidos se determinó por incorporación de  $H^3$ Tdr.

Los resultados obtenidos indican que todos los péptidos inducen una activación celular, siendo el péptido de 16 kDa el que lo hace con mayor intensidad tanto en la forma soluble como particulada y que esta estimulación de esplenocitos es incluso mayor que la obtenida con las porinas probablemente debido a la especificidad del reconocimiento a un epítope inmunodominante o a una mayor exposición del mismo por efecto del rompimiento. Cabe señalar también que el péptido de 29 kDa fue reconocido por el anticuerpo monoclonal del lote 8F6 anti-porinas producido en el INH, con lo que se refuerzan las evidencias de que los péptidos de las porinas son buenos inmunógenos en forma individual, capaces de activar linfocitos y ser reconocidos por anticuerpos específicos.

## 2.0 INTRODUCCION

### 2.1 FIEBRE TIFOIDEA

La fiebre entérica más severa y prototípica es la fiebre tifoidea y el agente causal es Salmonella typhi. El hombre es el único huésped de S. typhi, y la transmisión ocurre a través de alimentos o agua contaminados con materia fecal proveniente de individuos enfermos o portadores. (34)

La fiebre tifoidea generalmente se presenta en forma endémica, siendo un problema de salud pública importante en nuestro país; en 1987 se reportaron 11,078 casos con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes. (4,40).

Una vez en el intestino, Salmonella typhi puede colonizar o no la luz intestinal antes de penetrar la mucosa del intestino delgado, a diferencia de otras enterobacterias que necesitan colonizar para tener invasividad. (4)

La evolución de la enfermedad se caracteriza porque durante la primera semana de infección, los síntomas, que consisten en fiebre, letargo, malestar y dolores generalizados, pueden confundirse con una variedad de otras enfermedades. Durante este lapso, el microorganismo penetra en la pared intestinal, infectando los ganglios linfáticos regionales. Además Salmonella typhi en esta fase, no

lesiona el epitelio intestinal. Aquí la bacteria es fagocitada por el macrófago y llevada al sistema fagocítico mononuclear por el torrente circulatorio, de manera tal que en 24 hrs la bacteria se encuentra localizada intracelularmente y circulando por todo el organismo, donde es fagocitada por los monocitos, pero no destruida. Luego de la multiplicación intracelular, reingresa en el torrente circulatorio provocando una prolongada bacteremia, lo cual ocurre durante la segunda semana de enfermedad. La infección del sistema biliar y otros tejidos también ocurre en este momento. Durante este período el paciente se encuentra severamente enfermo, con fiebre sostenida de aproximadamente 39 °C y a menudo delira. El abdomen es muy sensible y puede presentar manchas de color rosa; en muchos pacientes comienza la diarrea. En este momento, los microorganismos están re infectando el tracto intestinal desde la vesícula y pueden causar necrosis de las placas de Peyer. Hacia la tercera semana, los pacientes se encuentran exhaustos y todavía con fiebre, pero comienzan a mejorar si no se producen complicaciones. Las complicaciones incluyen perforación intestinal, hemorragia severa, tromboflebitis, colecistitis, neumonía o formación de abscesos. El cuadro clínico está caracterizado por: mialgias, astenia, adinamia, hiporexia, cefalea, náuseas y fiebre de predominio vespertino alcanzando temperaturas hasta de 40 °C en una primera fase. Si el paciente no es tratado en forma adecuada en este momento y el cuadro se agrava, las manifestaciones pueden ser de septicemia, estado tífico o shock endotóxico. La tasa de mortalidad varía del 2 al 10%. Se observa menor mortalidad cuando se dispone del tratamiento de sostén adecuado. Puede haber recaídas en aproximadamente el 20% de los los pacientes. (4,34,63)



Thomas Willis, en 1659, describió los signos y síntomas de la fiebre tifoidea; sin embargo, durante años se confundió con el tifo. En 1782 Ruxham describió las dos enfermedades febriles como entidades clínicas diferentes: la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo). Jenner en 1850, demostró que las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos eran específicas de la fiebre tifoidea. William Budd, en 1856, estableció que la enfermedad era transmitida a través de alimentos y aguas contaminadas con materia fecal proveniente de individuos enfermos o convalescientes. (27,28)

Eberth, en 1880, describió la presencia del bacilo tifoídico en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de pacientes con fiebre tifoidea. Pfeiffer, en 1885, hizo el primer aislamiento del bacilo a partir de heces. (19)

La forma de establecer el diagnóstico de certeza de este padecimiento debe ser a través del aislamiento de la bacteria por medio de hemo y coprocultivo. Entre los análisis serológicos se encuentran las reacciones febriles o reacción de Widal que se describió desde 1895, la cual más que diagnóstico sugiere el antecedente de contacto con la bacteria y sólo el análisis repetido con aumento en el título, permite establecer el diagnóstico confirmativo; además se ha encontrado como fenómeno concomitante en la fase aguda, la disminución en la cuenta leucocitaria. (27,40)

## 2.2 Salmonella typhi

Salmonella typhi pertenece a la familia Salmonellae, es un bacilo anaerobio facultativo, Gram-negativo, móvil, no esporulado, de longitud variable y que característicamente fermenta la glucosa y la manosa pero no puede utilizar la lactosa o la sacarosa, produce abundante ácido sulfhídrico y descarboxila la lisina y ornitina. Se conocen más de 1,500 serotipos de salmonelas. Según la clasificación de Kauffman-White, Salmonella typhi pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9, 12; los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie posee el antígeno "Vi". La fórmula: 9, 12, Vi: d. denota los antígenos de S. typhi en forma abreviada. (11,32,37,44)

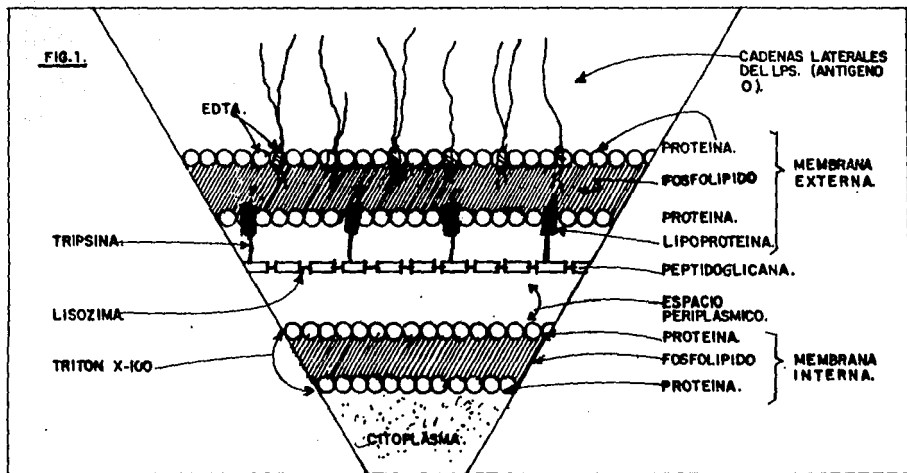
Tabla I. PRINCIPALES CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE S. typhi y E. coli (11,32)

PRUEBA	<u>S. typhi</u>	<u>E. coli</u>
INDOL	-	+
ROJO DE METILO	+	+
MOTILIDAD	+	±
GLUCOSA	+	+
	ácido	ácido y gas
LACTOSA	-	+
		ácido y gas
SACAROSA	-	±
MANITOL	+	+
	ácido y gas	
PRODUCCION DE H <sub>2</sub> S	+	-
TRIPLE AZUCAR HIERRO	Pared alcalina, fondo ácido.	Pared ácida, fondo ácido.
LISIN-descarboxilasa	+	±
ORNITIN-descarboxilasa	+	±

### 2.3 ENVOLTURA CELULAR

La bacteria cuyo habitat es el intestino, debe poseer algún mecanismo que proteja a su membrana citoplasmática de la acción detergente de las sales biliares, ácidos grasos y de los glicéridos. Las bacterias patógenas deben tener propiedades capaces de adherirse a las células eucarióticas y/o a los tejidos invadidos. (11,49)

La envoltura de las bacterias Gram-negativas consiste de tres capas esenciales; membrana citoplasmática (o interna), capa de peptidoglicana, capa delgada (20 a 30 Å) densa a los electrones (y que corresponde a la pared celular de las células Gram-positivas), y la membrana externa, una capa exterior (de 60 a 180 Å). En los cortes examinados, estas dos últimas capas aparecen íntimamente unidas. La membrana externa, o capa L, es muy similar, tanto por su composición como en su aspecto trilaminar, a las típicas membranas biológicas. Muchos tipos de proteínas solubles que se presentan en el citosol, se localizan entre las dos membranas en un compartimiento conocido como el espacio periplásmico. Las dos membranas están interconectadas por las también llamadas zonas de adhesión. La envoltura celular está a menudo cubierta con una capa capsular más bien amorfa o también llamada capa adicional o capa A representada como un modelo de subunidades regulares de naturaleza proteica. (49,60)



*Fig. 1 Esquema de la cubierta celular de un microorganismo Gram-negativo. Sus componentes se detallan a la derecha de la imagen, mientras que a la izquierda se indican los posibles puntos de acción de agentes desestabilizadores de la envoltura celular. En la membrana interna, la mayoría (o la totalidad) de las proteínas intervienen en los procesos de transporte y de catálisis, mientras que en la membrana externa existe un número de enzimas muy reducido, y por electroforesis se demuestra que la variedad de proteínas es también mucho menor (De Schmitman, C.A. J. Bacteriol., 108:553, 1971).*

### 2.3.1. MEMBRANA INTERNA (CITOPLASMICA)

La membrana citoplasmica consiste de fosfolipidos y proteínas en cantidades aproximadamente iguales, los cuales juegan un papel importante en el transporte de nutrientes, en la fosforilación oxidativa, y por medio de polisomas unidos a la membrana, en la síntesis de fosfolipidos, peptidoglicana y lipopolisacárido. Además, estan probablemente involucrados en la división celular y sirven como una ancla para el DNA, al menos durante la replicación. (49,60)

### 2.3.2 P E P T I D O G L I C A N A

#### (M U R E I N A)

En las bacterias Gram-negativas se encuentra una monocapa de peptidoglicana rodeando la membrana citoplasmática. La rigidez de la capa de peptidoglicana permite a la célula que mantenga una presión osmótica de aproximadamente 35 atm. en el citoplasma. La degradación de la peptidoglicana con lisozima resulta en lisis de las células causada por la incorporación de agua a través de la membrana citoplasmática al citosol. La capa de peptidoglicana consiste de una red en la cual estan inmersas cadenas de aminoazucares, que contienen residuos alternados de N-acetilglucosamina y ácido N acetilmurámico, éstas están covalentemente unidas entre sí, via enlaces cruzados que pueden formarse entre los

tetrapeptidos, los cuales están unidos a los residuos del ácido N acetilmurámico. La peptidoglicana es probablemente también responsable, junto con la pared celular, de la forma bacilar de la bacterias. Se ha observado que de manera aislada tiene la misma forma que las células de las cuales ha sido extraída. (49,69,71)

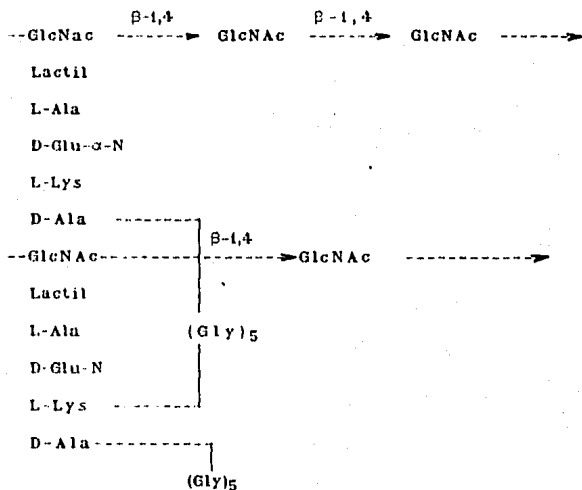


Figura 2. Estructura de la peptidoglicana formada por residuos alternos de N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, un tetrapeptido formado por residuos D y L también alternos y un enlace peptídico que une al grupo carboxilo terminal de un tetrapéptido con un grupo  $\text{NH}_2$  o  $\text{COOH}$  libre en uno de los tetrapéptido vecinos. (11)

### 2.3.3 ESPACIO PERIPLASMICO

El espacio periplásmico está localizado entre las membranas interna y externa. Ha sido reportado que representa entre un 20 y un 40 % del total del volumen celular aunque se han sugerido valores mucho mas bajos. El espacio está compuesto por proteínas y oligosacáridos, las proteínas periplásmicas comprenden aproximadamente el 4% del total de las proteínas celulares. Con respecto a sus funciones, pueden distinguirse tres clases de proteínas periplásmicas:

1) Proteínas con una función catabólica (p. ej. 5'-nucleotidasa y fosfatasa alcalina) convierten los solutos para los cuales no existe sistema de transporte a una forma que pueda ser transportada a través de la membrana citoplasmática.

2) Proteínas que tienen afinidad por los azúcares, iones y aminoácidos. Estas proteínas son esenciales para el transporte del soluto en cuestión.

3) Proteínas involucradas en la degradación o modificación de componentes nocivos tales como los antibióticos y los metales pesados. (49,59)



### 2.3.3.1 ZONAS DE ADHESION

Por microscopía electrónica son visibles sitios de contacto entre las membranas citoplásmica y externa, los cuales llegan a ser aparentes sólo cuando las membranas se separan por plasmólisis. Hay aproximadamente de 200 a 400 de estos sitios por célula, miden de 20-30 nm de espesor y cubren aproximadamente el 5% de la superficie de la membrana. Se sugiere que están involucradas en la penetración del DNA del fago en la célula, en la síntesis de LPS y de algunas proteínas de membrana externa y en la producción de pilis sexuales. (49,59)

### 2.3.4 MEMBRANA EXTERNA

Se ha determinado por microscopía electrónica que la membrana externa es similar a la membrana citoplásmica y tiene un espesor de 7.5 nm; en la microscopía electrónica aparece como una capa media electrotranslúcida, colocada entre dos capas electrodensas. La membrana externa esta constituida por proteínas (9-12% de proteínas celulares), el antígeno común a enterobacterias (ECA) como un componente menor (0.2% del peso celular seco), fosfolípidos y lipopolisacárido (LPS) como constituyentes mayores. Está covalentemente unida a la capa de peptidoglicana, via una lipoproteína. Actúa como una barrera hidrofóbica, pero no ejerce un papel activo de transporte. (11,59,74)

La membrana externa protege a la bacteria debido a la gran hidrofobicidad que le confiere, importante en la evasión de la fagocitosis por el cambio en la constitución de los antígenos de superficie, protege contra otras defensas inespecíficas del hospedero, como son la lisozima, la  $\beta$ -lisina, varias proteínas de los leucocitos y las sales biliares del tracto intestinal. Se piensa que las cadenas específicas -O se proyectan de la superficie de la membrana externa y, por tanto, resguardan la superficie de la célula de la acción de los anticuerpos y el complemento, evitando el contacto íntimo con la membrana externa. La membrana externa hace que la difusión de los antibióticos hacia el interior de la bacteria sea lenta, dando oportunidad a ésta de que los inactive. (49,60)

Estudios relacionados a la localización de los componentes de la membrana externa indican que el LPS y casi todas las proteínas, tienen sitios expuestos a la superficie, los cuales pueden actuar como receptores de fagos, colicinas y donadores de células en la conjugación y pueden reaccionar con anticuerpos, enzimas y agentes químicos. (10,49)

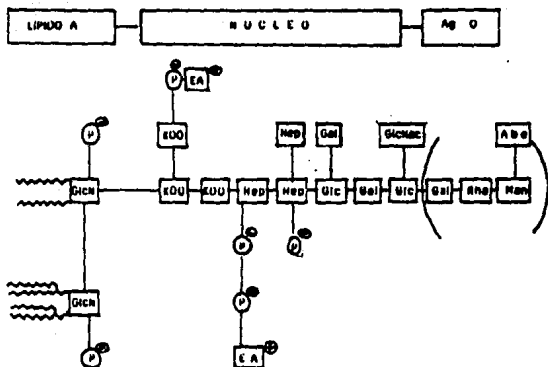
La mayoría de los estudios sobre la membrana externa se han realizado en E. coli y S. typhimurium, sin embargo, los resultados que se obtienen de estos pueden ser extrapolados a S. typhi.

#### 2.3.4.1 F O S F O L I P I D O S

La composición fosfolipídica de la membrana externa es muy similar a la de la membrana citoplasmática (lípidos polares, predominando los fosfoglicéridos en relación a los esfingolípidos), con un ligero, pero significativo enriquecimiento de fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. (45,60)

#### 2.3.4.2 L I P O P O L I S A C A R I D O (LPS)

El LPS, el cual es característico de las bacterias Gram-negativas, es una molécula anfipática a menudo dividida en una parte hidrofóbica llamada lípido A, y un sacárido hidrofílico. La parte hidrofílica consiste de un corazón oligosacárido, el cual usualmente es llamado antígeno-O, es una estructura polimérica formada por unidades repetitivas de carbohidratos, además de estas dos regiones se presenta una región específica de polisacárido. Una representación esquemática de la estructura general se da en la Fig. 3. El LPS tiene seis o siete cadenas de ácidos grasos semejantes a la cadena de disacárido glucosamina, todas las cadenas de ácidos grasos en el LPS están saturadas, y contienen ácidos grasos 3-hidroxi-oxi-acil. Presenta gran cantidad de grupos cargados negativamente, sobre la propia unión de los residuos de azúcares proximales. (11,59,86)



EA : Etanolamina

KDO : Acido 2-ceto-3-deoxioctulónico

Figura 3. Representación esquemática de la estructura química del LPS de *S. typhimurium* (49)

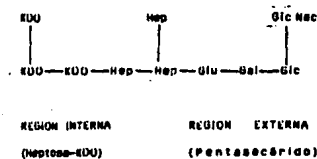


Figura 4. Región del núcleo basal de *S. typhimurium* (De Weinbaun, G. *Microbial Toxins*, Chapter 4, 1977).

El antígeno O consiste de alrededor de 40 unidades repetitivas de 3 a 6 residuos de azúcar. El número de unidades repetitivas varía, siendo uniforme en un cultivo o una cepa, esto depende de las condiciones de crecimiento, mientras que la presencia de ciertos profagos en el cromosoma pueden alterar drásticamente la estructura y composición del antígeno-O. Estas propiedades son usadas para determinar serotipos O, o como método inmunológico para identificar sub-cepas de una especie. Las cadenas O específicas del LPS son factores virulentos, los cuales ayudan a la invasión bacteriana. Son altamente inmunogénicas y capaces de inducir anticuerpos específicos. (49,59,86)

Los lipopolisacáridos constituyen la mayoría de los componentes antigénicos superficiales, (antígenos somáticos O), y son responsables de la actividad endotóxica de las células Gram-negativas. Se supone que la región del lípido A es responsable de la actividad de las endotoxinas de los lipopolisacáridos bacterianos. Esa porción lipídica del complejo está orientada en la zona hidrofóbica de la membrana exterior. La unión del LPS a la membrana depende tanto de enlaces hidrofóbicos como de enlaces iónicos, que están mediados por cationes polivalentes (p. ej. el  $Mg^{++}$ ). (60,86)

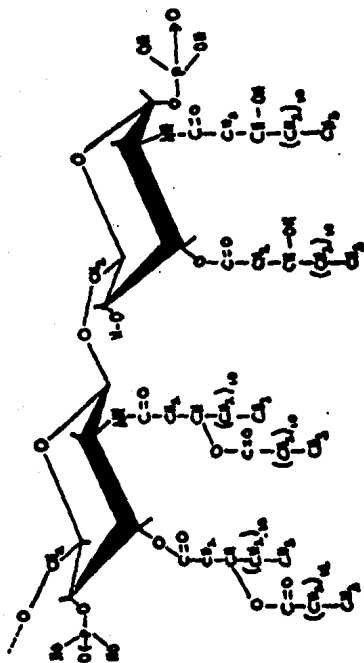


Figura 5. Estructura del lípido A de S. typhimurium. (60)

### 2.3.4.3 ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS (ECA)

El antígeno común de las Enterobacterias (ECA) es un polisacárido ácido que contiene N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil D-manosaminurónico, y 4-acetamido-4,6-dideoxi-D-galactosa, parcialmente esterificado por el ácido palmítico. ECA se presenta unido a la membrana externa por medio de los fosfolípidos, que forman una "ancla". El antígeno común enterobacterial o antígeno de Kunin está presente en la mayoría de las enterobacterias. Algunas cepas, contienen a ECA en su forma inmunogénica, en la cual está asociado con el LPS por un enlace covalente con la parte del corazón del lípido A, similar a la forma de unión del antígeno-O. (49,60)

### 2.3.4.4 EFECTO DEL EDTA SOBRE EL LPS

Hace 26 años, Repaske demostró que el EDTA en buffer de tris, junto con lisozima, convierten las células de bacterias Gram-negativas en esferoplastos, y ahora se reconoce el papel del EDTA como un desestabilizador de la interacción LPS-LPS que destruye la membrana externa. El EDTA remueve aproximadamente la mitad del LPS de la célula, presumiblemente por los complejos que forma con los cationes divalentes (los cuales están involucrados en las interacciones LPS-LPS). (49,60,71)

### 2.3.4.5 PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de Escherichia coli empleando esferoplastos preparados con lisozima y EDTA, éstos se lisaron por choque osmótico y posteriormente se separó en un gradiente de sacarosa la membrana externa de la citoplasmática. El método anterior fué modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME. Schnaitman describió una metodología que evita la preparación de esferoplastos y consiste en el rompimiento de las bacterias en una prensa francesa, seguido de la sedimentación de la envoltura celular y de la solubilización de la membrana citoplasmática con un detergente no iónico(53,61,71).

Schnaitman fué el primero en informar que Escherichia coli contenía una proteína principal, la cual constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana; poco despues, él y otros investigadores demostraron por SDS-PAGE que en realidad eran cuatro. Schmitges y Henning describieron una proteína principal, que se podía separar en dos bandas por electroforesis, en condiciones reductoras. Actualmente se sabe que el número de las PME es variable y depende de la información genética de la bacteria. Su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo, temperatura, etc. (6,29,72,73,74)

Las PME que más se han estudiado son las de E. coli y S.



typhimurium. Di Rienzo, Nakamura e Inouye en 1978 y Osborn y Wu en 1980, hicieron una revisión extensa de ellas y las clasificaron en proteínas principales y menores. (12,62)

Las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100 000 copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo se expresan 5. Dentro de las proteínas principales se encuentran:

1) Proteínas matrices o porinas (Omp C, Omp D, Omp F, Pho E), que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana (60);

2) Proteína modificable por el calor (Omp A), involucrada en los procesos de conjugación y que actúa como receptor para fagos y colicinas (7,75).

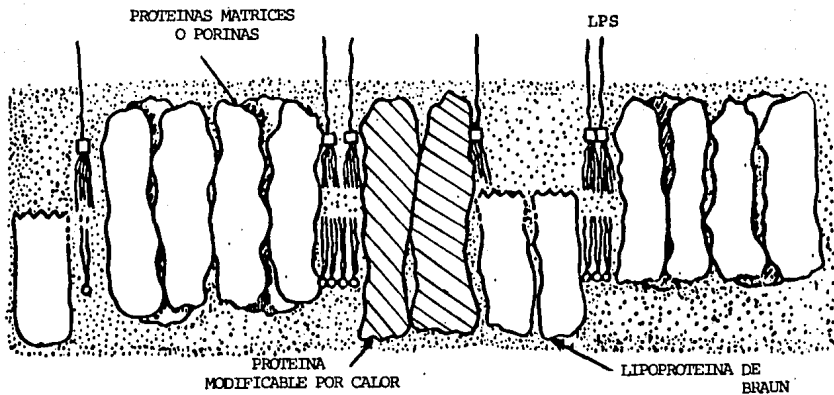
3) Lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana (82).

La proteína OmpA de E. coli es similar a las porinas, es rica en estructuras  $\beta$ -laminares, aparece rodeando ligeramente a la membrana. Las mutantes carentes de la proteína OmpA, producen membranas externas inestables y no son capaces de llevar a cabo la conjugación. OmpA está presente en aproximadamente  $10^5$  copias por célula. Es modificada por calor, tiene un peso molecular aparente en SDS-PAGE de 35 kDa, mientras que en su forma no desnaturalizada

es de 26 kDa. La proteína OmpA purificada no es hidrofóbica. La carencia de la proteína OmpA esta compensada por un aumento de las porinas y fosfolípidos, y posiblemente también del LPS. (49,60,62)

Junto con la lipoproteína de Braun la proteína OmpA está de alguna forma involucrada en el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana externa, así como en la forma de la célula. (49,59)

Las PME se encuentran principalmente estructuradas con la conformación terciara  $\beta$ -laminar. La cantidad de proteínas principales de membrana externa por unidad de superficie de area de membrana externa es constante bajo condiciones variables de crecimiento. Las principales PME, han sido purificadas y en muchos casos su actividad biológica depende de la presencia de LPS. (49,62)



*Figura 6. Organización de las proteínas de membrana externa.(61)*

## 2.4 P O R I N A S

### (CANALES INESPECIFICOS DE DIFUSION)

Las proteínas codificadas por los genes *ompF*, *ompC*, y *phoE* en *E. coli* y las codificadas por los genes *ompF*, *ompD* en *S. typhimurium* son llamadas porinas, porque producen poros relativamente inespecíficos o canales que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa. La importancia fisiológica de las porinas está en que permite la difusión de los nutrientes, antibióticos, o inhibidores a través de la membrana. (54,59,60)

#### 2.4.1 PROPIEDADES DE LAS PORINAS

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas debe permitir la absorción de los nutrientes y la eliminación de los productos de desecho. Se ha encontrado que la membrana externa de las bacterias entéricas es permeable a solutos hidrofílicos mayores de 600 daltons. El primero en aislar estas porinas fue Rosinbush (1974), quien les llamo "matriz proteica", ya que se les consideró como las responsables de la función de la membrana externa, de determinar la forma de las bacterias. Sin embargo no existen aún evidencias de que las porinas contribuyan a mantener determinada forma de las células, por lo que el uso del término matriz proteica ha sido abandonado. (59,60,62)

Tanto en E. coli como en S. typhimurium pueden encontrarse varios tipos de porinas en una determinada cepa. La cepa E. coli K-12 contiene las porinas OmpF y OmpC cuando crece en condiciones normales de cultivo y la porina PhoE se presenta cuando las células crecen en ausencia de fosfatos. Se ha observado que la proteína PhoE forma un poro más eficiente para el paso del fosfato orgánico e inorgánico que la proteína OmpF. Las células de S. typhimurium LT2 crecen en los medios ordinarios presentando sus tres porinas OmpF, OmpC y OmpD anteriormente denominadas por sus pesos moleculares, 35 kDa, 36 kDa y 34 kDa respectivamente. La cantidad relativa de estas porinas se encuentra bajo una eficiente regulación dada tanto por la actividad osmótica del medio, como por la temperatura. Las porinas están presentes en forma constitutiva, pero algunas veces son inducidas bajo ciertas condiciones de crecimiento, o están codificadas por un bacteriófago o por un plásmido. Schnaitman encontró que varias muestras clínicas de las que se aisló E. coli producen una porina adicional, llamada proteína 2 o Lc, la cual no existe en la cepa K-12 y es codificada por un profago. En las cepas encapsuladas de E. coli es frecuente encontrar que producen una porina característica, comúnmente llamada proteína K. La cantidad total de estas proteínas, es relativamente constante y muy grande, por lo que las porinas son unas de las proteínas más abundantes en E. coli y S. typhimurium en términos de masa; estas pueden representar por arriba del 2% del total de las proteínas celulares. (7,49,59,71)

**TABLA 2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS DE *S. typhimurium*. (60)**

CARACTERISTICA	OmpF	OmpC	OmpD
Peso molecular	35 kDa	36 kDa	34 kDa
Número de copias por célula	Mayor de $10^5$	Mayor de $10^5$	Mayor de $10^5$
Receptor para fagos o bactericinas	N.D.	PH42, PH105 PH221	PH42, PM 31 PH51
Gene estructural	ompF minuto 21	ompC minuto 46	ompD minuto 28
Punto isoeléctrico	4.77	4.78	N.D.
Forma oligomérica	Trímero	Trímero	Trímero
Diámetro del poro	1.4 nm	1.4 nm	1.4 nm

N.D. No determinado

**TABLA 3. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS DE *E. coli* K12  
Y *E. coli*. (60)**

CARACTERISTICAS	OmpF	OmpC	PhoE
Peso molecular	37.2 kDa	36 kDa	37.78 kDa
Número de copias por célula	Mayor de 10 <sup>5</sup>	Mayor de 10 <sup>5</sup>	Mayor de 10 <sup>5</sup>
Receptor para fagos o bacterinas.	Tula, T2, TP1 TP2, TP5, K20 Col A	TP2, TP5, PA-2 TP6, Tulb, T4 MeI	TC23, TC45
Gene estructural	ompF minuto 20.7	ompC minuto 46	ompD minuto 5.9
Punto isoelectrico	5.9-6.2	4.41	N.D.
Forma oligomérica	Trímero	Trímero	Trímero
Diámetro del poro	1.4 nm	1.4 nm	1.4 nm
Otras características.	Su síntesis se reprime en alta osmolaridad	Se expresa en condiciones de alta osmolaridad.	Su síntesis se reprime en condiciones limitadas de fosfatos.

N.D. = No determinado  
kDa: Kilodaltones

Se han secuenciado las porinas encontrándose que existe una homología muy grande entre OmpC, OmpF y PhoE. La estructura secundaria de las porinas demuestra que existen de 11 a 15 extensiones entre residuos de aminoácidos, las cuales adoptan la conformación  $\beta$ -laminar, esto sugiere que la proteína atraviesa la membrana muchas veces por tener estas extensiones. Se ha demostrado que las estructuras  $\beta$ -laminares están orientadas perpendicularmente hacia la superficie de la membrana. (59,60)

Las porinas de la cepa K-12 de E. coli, OmpF y OmpC están inmunológicamente relacionadas con la proteína PhoE. La forma desnaturalizada de cada una de estas proteínas asociadas a la peptidoglicana reacciona con el antisuero producido contra la proteína OmpC purificada, estos resultados sugieren que todas estas porinas son derivadas de un gen ancestral común y que se han conservado muy bien las estructuras de sus genes durante la evolución. (49,59)

Las porinas de E. coli tienden a formar cristales hexagonales bidimensionales cuando el complejo membrana externa-peptidoglicana es extraído con SDS a temperaturas por abajo de los 60°C. Tales arreglos pueden ser formados en la ausencia de la capa de peptidoglicana, y el LPS (lípidos A o ácidos grasos), estimula este proceso. Las porinas pueden ser extraídas y llevadas a una solución de NaCl 1 M en solución de SDS, pero siempre que se usan



estas condiciones las porinas se presentan en forma de trímeros, estrechamente asociados, que contienen un triplete de orificios que retienen la tinción negativa. Cuando los trímeros son calentados a 100°C en SDS, éstos se disocian en monómeros, cada unidad monomérica contiene un canal en su superficie externa. Se ha propuesto que estos tres canales se fusionan a la mitad de la membrana y salen del otro lado como un canal central único. Esto explicaría porque la hermética asociación de las tres subunidades es necesaria para la producción de los canales funcionales. Sin embargo, otros estudios con la porina PhoE, indican que en la membrana externa los tres canales permanecen sin unirse.

(49,60,62)

Las proteínas OmpC y OmpF de E. coli actúan como receptores del fago Tula y los fagos Tulb y Mel respectivamente. La proteína OmpC debe interactuar con la región del corazón del LPS para experimentar un cambio de conformación antes de que éste pueda actuar como un receptor de fagos. Alternativamente, la proteína OmpC y el LPS pueden constituir dos partes independientes del complejo receptor, ambos son esenciales para la exitosa activación de Tulb. (10,59,71)

Las porinas son fabricadas continuamente durante el ciclo celular. Las lipoproteínas y las porinas proveen de más de 400,000 contactos entre el saco de mureína y la membrana externa.

(69)

## 2.4.2 GEN DE OmpC

El gen de la porina OmpC de S. typhi tiene la secuencia nucleotidica siguiente: (54)

Los sitios del rompimiento con el BrCN se presentan con letra remarcada y subrayados

```

      11      20      29      38      47      56
CCA GTA AGC AGT GGC ATA AAA AAG CAA TAA AGC CAT ATA ACA GAG GGT TTA TAC
P V S S G I K K Q R R E I T R G Y

      65      74      83      92     101     110
ATG AAA GTT AAA GTA CAG TCC CTC CTG GTA CCA GCT CTG CTG GTG GCG GGC GCA
W K V K V Q S L L V P A L L V A G A

     119     128     137     146     155     164
CGC AAT GCG GCT GAA ATT TAT AAT AAA GAC GGC AAC AAA TTA GAC CTG TTT GGT
A N A A B I Y N K D G N K L D L P G

     173     182     191     200     209     213
AAA GTT GAT GGC CTG CAC TAC TTC TCT GAC GAC AAA GGC AGC GAC GGC GAC CAG
K V D G L H Y P S D D K G S D G S Q

     227     236     245     254     263     272
ACC TAC ATG GGT ATC GGC TTC AAA GGC CAA AGC CAG GTT AAC GAT CAG CTG ACC
T Y W R I G R K G B T Q V N D Q L T

     281     290     299     308     317     326
GTT TAT GGC CAG TGG GAA TAT CAG ATT CAG GGC AAC CAG ACT GAA AGC AGC AAC
G Y G Q W R Y Q I Q G N Q T E S S N

     335     344     353     362     371     380
GAC TCC TGR AGC GGT GTG GCG TTT GCG GGT CTG AAA TTC GCT GAC GCA GGT TTC
D S W T R V A P A G L K P A D A G S

     389     398     407     416     425     434
TTC GAT TAT GGT GGT AAC TAC GGC GTA ACC TAT CAC CTG ACC TCC TGG AAC GAC
P D Y G R N Y G V T Y D V T S W N D

     443     452     461     470     479     488
GTT CTG CCG GAG TTC GGC GGC GAC ACC TAC GGC GCT GAC AAC TTT ATG CAG CAG
V L P R P G G D T Y G A D N F W Q Q

     497     506     515     524     533     542
CGT GGT AAC GGC TAT GCT AAC TAC GGT AAC ACC GAC TTC GGT CTG GTG AAT
R G N G Y A N Y R N T D P P S L Y D

```

551	560	569	572	587	596
GGT CTG GAC TTC GCG TTT CAG TAT CAG GGC AAA AAC GGC AGC GTG AGC GGT GAA					
G L D P A L Q U Q G K N G S V S G R					
605	614	623	632	641	650
AAC ACC AAC GGT GGC AOC CTG CTG AAC CAG AAC GGC GAC GGT TAC GGC GGA TCG					
N T H Q R S L L N Q N G D G Y O G S					
659	668	677	685	695	704
CTG ACT TAT GCA ATC GGC GAA GGC TTC TCT CTC GCT GGC GCT ATC ACC ACC TCT					
L T Y A I G R Q F R V G Q A I T T S					
712	721	731	740	749	758
AAA GGT ACT GGC GAT CAG AAC AAC ACC GCT AAC GCT GGC CTG TAT GGT AAC GGC					
K R T A D Q N N T A N A R L Y G H O					
767	776	785	794	803	812
GAT GGC GGC ACG GTF TAC ACG GGC GGC CTG AAA TAC GAT GCG AAC AAC ATC TAT					
D R A T V Y T Q O L K Y D A N N I Y					
821	830	839	848	857	866
CTG GCA GCG CAG TAT TCT CAG ACC TAT AAC GCT ACC GGT TTT GGT ACC TCT AAC					
L A A Q Y S Q T Y N A T R P G T S N					
875	884	893	902	911	920
GGC AGC AAC CCG TCC ACC TCT TAC GGT TTT GGC AAC AAA GCG CAG AAC TTT GAA					
G N H P N Y S Y G P A N K A Q N P R					
929	938	947	956	965	974
GTG GTF GCT CAG TAC CAG TTC GAC TTT GGT CTG GGT GCG TCT GTC GCT TAC CTG					
V V A Q Y Q P D P O L R P S V A Y L					
982	992	1001	1010	1019	1028
CAG TCT AAA GGT AAT GAC ATC ACG AAC GGC TAC GCG GCG AGC TAT GGC GAC CAG					
Q S K G K D I S N O Y O A S Y G D Q					
1057	1066	1075	1084	1093	1082
GAC ATC GTA AAA TAC GTF GAT GTC GGC GCG ACT TAC TAC TTC AAC AAA AAC ATG					
O I V K Y V D V P A T Y Y P N K N M					
1091	1100	1109	1118	1127	1136
TCC ACC TAT GTF GAT TAC AAA ATC AAC CTG CTG GAT AAA AAC GAC TTT ACC GCG					
S T Y V D Y K I N L L D K N D P T R					
1145	1154	1163	1172	1181	1190
GAT GGC ATC AAC ACC GAC GAC ATC GTA GCG CTG GGT CTG GTF TAC CAG TTT TAA					
D Q I N T D D I V A L G O L V Y Q P S					

Hay evidencias de un control positivo en la síntesis de la proteína OmpF por AMPc. (59)

Algunos estudios con células intactas llevan a la conclusión de que algunas de las porinas son específicas. Se ha observado que la pérdida mutacional de la porina OmpF hace decrecer la velocidad de la hidrólisis de los nucleótidos, este resultado condujo a algunos investigadores a pensar que la porina OmpF es un canal específico de nucleótidos, tal conclusión no es aceptable porque la velocidad de estos procesos esta influenciada por la magnitud de la permeabilidad de la barrera en relación al tamaño del soluto en proceso de inmersión. Estudios en liposomas demostraron que el canal PhoE prefiere compuestos aniónicos. (60)

#### 2.4.3 FUNCION GENERAL DE LAS PORINAS

Los poros hidrofílicos en las membrana externa explican la impermeabilidad a las sales biliares y la muy buena permeabilidad para los nutrientes. Mutantes deficientes de porinas tienen incrementada su  $K_m$  pero no se altera su  $V_{máx}$  respecto a la incorporación de los solutos. (49,59)

Los hallazgos más importantes sobre la cinética de incorporación a través de porinas son:

i) La velocidad de difusión está determinada por la diferencia en concentraciones de los dos lados de la membrana. La influencia de la temperatura sobre la velocidad de penetración es baja. (49)

ii) Los solutos que son voluminosos no pueden difundir a

iii) La velocidad de difusión de los solutos a través de los poros esta influenciada por factores tales como su tamaño, carga e hidrofobicidad, lo que origina una gran diferencia en los coeficientes de permeabilidad de la mayoría de los solutos. Los solutos que tienen cargas negativas se difunden a través de OmpF y OmpC de E. coli de forma mas lenta que sus contrapartes no cargadas y que los solutos con dos cargas negativas, que difunden más lentamente. Se ha demostrado que los canales formados por la proteína Lamb y la proteína PhoE tienen una preferencia por ciertos sustratos debido a la presencia de sitios de unión, que se encuentran presumiblemente a la entrada de los poros. (11,49,60)

iv) La incorporación de porinas en la bicapa lipídica conlleva a un aumento de la conductancia de la membrana de varios niveles de magnitud. La proteína forma grandes canales acuosos en la membrana. La formación de los canales es inducida irreversiblemente por el voltaje. Los canales existen tanto en estado abierto como cerrado, los cuales están en equilibrio entre sí. (45,49)

v) En algunas cepas se presenta mas de una clase de porinas. Se ha demostrado que una clase de porinas es suficiente para la célula. (49)

vi) El término poro se ha introducido para indicar en general a los canales de difusión. Sin embargo, algunos poros además de sus propiedades generales, tienen afinidad por ciertos solutos con

respecto a su permeabilidad. (49,59,60)

vii) El límite de exclusión para S. typhimurium y E. coli es de aprox. 6 KDa, lo cual es probablemente una ventaja para el organismo porque permite la entrada de pequeñas micelas, de solutos hidrofóbicos y de grandes péptidos al espacio periplásmico. (49)

Las porinas desnaturalizadas, son polipéptidos ácidos con un punto isoelectrico de alrededor de 4.8. Una alta osmolaridad resulta en la desaparición de la proteína OmpF, la cual está cuantitativamente compensada por la síntesis de más proteína OmpC. Múltiples copias del gen ompF resultan en una superproducción de la proteína OmpF a expensas de las proteínas OmpC y PhoE. La superproducción de la proteína PhoE, la cual está acompañada por una disminución de la cantidad de la proteína OmpF y la proteína Lamb, es letal en las células. (49,59)

## 2.5 P E P T I D O S

### 2.5.1 TRABAJOS PREVIOS CON PEPTIDOS DE DIFERENTES PROTEINAS

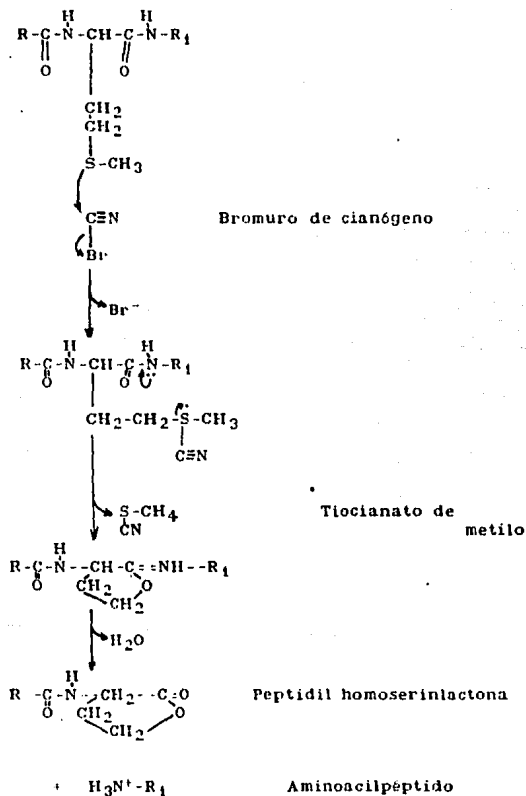
Se tienen antecedentes de la digestión de algunas proteínas con Bromuro de Cianógeno (BrCN), entre las cuales se encuentran la lisozima (5), la termolisina (78) y la proteína IB del gonococo (77), entre otras, los cuales describen los métodos de digestión, separación de los péptidos formados y purificación de los mismos, así como la antigenicidad e inmunogenicidad que se obtiene al comparar los péptidos con la proteína completa respectiva, en ensayos tanto celulares como humorales. (5,77,78)

### 2.5.2 MECANISMO DE REACCION DEL BrCN

El BrCN es uno de los agentes químicos específicos para la escisión de cadenas polipeptídicas en residuos de aminoácidos bien definidos. El mecanismo consiste en que el Br-CN rompe el enlace peptídico, en donde el grupo carbonilo es aportado por un residuo de metionina, el cual se convierte en un residuo C-terminal que es la lactona de la homoserina. El número de fragmentos producidos a partir de un polipeptido por el bromuro de cianógeno puede predecirse según el número de residuos de metionina de la cadena (45).

La descripción esquemática de la ruptura peptídica por el BrCN se presenta en la Figura 7.

Figura 7. Mecanismo de reacción de la escisión de polipeptidos por acción del BrCN.(45)





El BrCN produce rompimiento en las porinas, ya que estas contienen tres residuos de metionina, lo cual repercute en la producción de cuatro péptidos, los cuales tendrían un peso molecular estimado de 21, 9, 6 y 4 kd. (PCGENE)

Con el fin de solubilizar el BrCN para que pueda reaccionar con las proteínas, se han probado soluciones de ácido fórmico a diferentes concentraciones, habiéndose encontrado que la solución de ácido fórmico al 70% es la más adecuada. Con esta concentración se inhibe la formación de bromuro y se evita una posible oxidación del triptofano presente en las proteínas. Concentraciones más elevadas del 70% resultan en una acción inhibitoria de la actividad del bromuro de cianógeno. La concentración recomendada del BrCN en el ácido fórmico al 70% es de 100 mg/ml, la digestión se lleva a cabo a 25°C durante 20 hrs (45).

El rompimiento con BrCN se pone de manifiesto determinando los pesos moleculares de los productos de reacción por análisis en SDS-PAGE. (5,77)

### 2.5.3 DIGESTION DE PORINAS CON BrCN

Mediante el uso del programa para computadora PCGENE, es posible determinar los péptidos que se formarían al romper las porinas OmpC y OmpF, ya que funciona simulando una digestión con BrCN, proporcionándonos las características fisicoquímicas de dichos péptidos, como son el punto isoelectrico (pI), la cantidad de aminoácidos y el peso molecular de cada uno de ellos (tabla 4).

**Tabla 4. Características fisicoquímicas de los péptidos de las porinas OmpC y OmpF respectivamente, de E. coli.**

**OmpC**

Posición en la secuencia	Longitud	Peso (Da)	pI	1/21 f
3) Gln- 143 a Met- 342	200 aa	21,445	9.0	10 m
2) Arg- 58 a Met- 142	85 aa	9,484	3.6	2 m
1) Lis- 2 a Met- 57	56 aa	6,002	4.5	3 m
4) Ser- 343 a Phe- 377	35 aa	4,040	3.6	>20 h

**OmpF**

3) Leu- 137 a Met- 329	193 aa	21,017	4.7	3 m
2) Thr- 61 a Met- 136	76 aa	8,384	4.1	>20 h
1) Lis- 3 a Met- 60	58 aa	6,070	9.1	3 m
4) Ser- 330 a Phe- 362	33 aa	3,610	3.1	>20 h

aa = aminoácidos

h = hora

m = minutos

f = Tiempo necesario para la ruptura

pI = punto isoeléctrico

*Ordenados de acuerdo a su longitud*

*(de Inouchy y cols. 1982. Primary structure of the ompF gene that codes for a major outer membrane protein of Escherichia coli K-12. Nucleic acids research 10: 6957-6968).*

La absorción del triptofano a 280 nm constituye el fundamento de la determinación de péptidos y proteínas por medición de la absorbancia de las fracciones de elución obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Se ha observado que las proteínas rotas por BrCN pierden algunos determinantes antigénicos, pero ganan nuevos epítopos no presentes sobre la proteína completa, tal es el caso de la lisozima y la proteína IB. Se ha establecido que muchos epítopos inmunodominantes están encubiertos por la conformación de la proteína. (5,77)

Los estudios de la inmunogenicidad de péptidos se han realizado, no sólo en péptidos obtenidos por digestión con BrCN sino, también existen algunos en los que el rompimiento se da por enzimas proteolíticas, o bien otros que son sintetizados químicamente. (23,35,38)

## 2.6 VACUNAS CONTRA LA FIEBRE TIFOIDEA

La primera vacunación contra la fiebre tifoidea se realizó en 1896 por Wright, quien inoculó con bacilos muertos de Salmonella typhi a dos oficiales medicos de los cuales uno de ellos recibió posteriormente a la bacteria viable y no presentó sintoma alguno de la enfermedad, considerandose así que la vacuna había conferido protección. Mas adelante Visokovich realizó estudios similares en la Unión Soviética, sin poder obtener pruebas concluyentes sobre el valor protector de las vacunas antitifoídicas similares a las de Wright. Sin embargo se corroboró que ni siquiera el restablecimiento de una fiebre tifoidea aguda protegía completamente contra una segunda infección. Se han hecho múltiples ensayos para encontrar la forma más adecuada e inocua de protección contra la enfermedad, siendo uno de los primeros intentos el de Pfeiffer y Kolle, en 1885, quienes demostraron que el suero de pacientes convalescientes protegía a cobayos contra dosis letales de bacilo tifoídico. La primera inmunización experimental con una suspensión de microorganismos vivos de Salmonella typhi, fué realizada en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y en ratones por Bauner y Pfeiffer en 1887. Klikovich posteriormente empleó bacilos muertos con el mismo propósito. Lo anterior indujo a Wright en Inglaterra, y a Pfeiffer y Kolle en Alemania, a emplear en 1897 por primera vez, vacunas inactivadas en la inmunización de humanos. Cuando estas vacunas se aplicaron en la India, Egipto, Italia y

Sudáfrica, se encontró una disminución significativa en la morbilidad, así como una atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que sufrieron la enfermedad. Las vacunas tifoideas elaboradas con bacterias muertas siguieron utilizándose durante décadas sin conocerse su efecto protector real, ya que se carecía de modelos animales para probar su eficacia y no se lograba relacionar el efecto protector con algún indicador serológico. (19,20,64).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas aplicadas por vía oral, hechas a base de bacterias atenuadas. El efecto de las mismas fue estudiado en el ejército francés, en donde, desafortunadamente, hubieron muertos entre los individuos vacunados.(47)

En 1955, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, con el fin de probar la eficacia de las vacunas preparadas a base de células enteras de Salmonella typhi inactivadas con acetona (vacuna K) y con calor-fenol (vacuna L). Estos estudios demostraron que la vacuna K fue la mejor y se encontró que la protección era mayor cuando se aplicaban dos dosis (24,66,80,87).

El hecho de que las vacunas parenterales presenten efectos colaterales indeseables ha motivado la búsqueda de nuevos inmunógenos protectores. Ha la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran a base de bacterias vivas. Una de ellas se produce a base de una cepa de Salmonella

typhi dependiente de estreptomocina para su crecimiento y otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (designada por Germanier como Ty 21a). Estudios in vitro con esta vacuna han demostrado que se desencadena una buena respuesta humoral del intestino, el cual produce una reacción específica sustancial mayor para IgA que para IgG e IgM. (17,22,46,67)

Los estudios realizados con la vacuna de Germanier en Egipto demostraron que es capaz de proteger al 95% de la población vacunada. Se ha encontrado que la vacuna oral con capa entérica es muy superior a la preparada en cápsula de gelatina, también se ha observado que el nivel de protección se relaciona con el número de dosis, se presenta una protección alta al emplear 4 dosis, cuando la vacuna se aplica en una area de alta incidencia y/o prevalencia. En Chile, se encontró que con tres dosis administradas (capsulas con capa enterica), a intervalos de 2 ó 21 días entre cada dosis, se inducía una protección del 51 al 67%, respectivamente (14,21,84).

Por otro lado, se han estudiado los antígenos de superficie específicos de Salmonella typhi como probables candidatos a vacunas contra la fiebre tifoidea: antígeno somático "O" (endotoxina y/o lipopolisacárido), antígeno flagelar "H" y el antígeno capsular "Vi". Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O" jugaba un papel importante en la protección, por lo que se elaboró una vacuna a base del oligosacárido de repetición del lipopolisacárido (LPS). La protección obtenida con esta vacuna fué escasa y de corta duración (27,39,85).

También se han probado en el modelo humano, vacunas híbridas con toxoide colérico, fabricadas por ingeniería genética sobre células completas de S. typhi Ty24, insertando un plásmido que codifica para la biosíntesis de un antígeno O de V. cholerae (Inaba569B), la cual ha dado buenos resultados, aunque aún está en estudio. (8,16)

Con respecto al antígeno flagelar "H", se ha demostrado que tampoco está relacionado directamente con la inmunidad protectora. Tully y cols. (1962) observaron que al inmunizar chimpancés con una cepa rugosa de S. typhi, se inducía la producción de anticuerpos contra el antígeno "H", pero no se obtenía protección aún con títulos altos de anticuerpos antiflagelares. En 1968, Anderson demostró que en ratones inmunizados con una mutante carente de flagelo de S. typhi, se obtenía el mismo grado de protección que en aquellos inmunizados con la cepa móvil (3,79).

La relación de los anticuerpos anti-Vi con un estado inmune protector ha sido demostrada recientemente por Robbins y cols., a través de estudios de campo realizados en Nepal y Sudáfrica. Por lo que se ha enfatizado en la importancia que tiene el antígeno "Vi" en la virulencia de la cepa infectante, así como la conveniencia de conservarlo en las preparaciones de vacunas (2,26,65,68).

En 1970 Venneman y cols. demostraron que las fracciones ribosomales de Salmonella typhimurium inducían protección en el

ratón contra la bacteria virulenta. Resultados similares fueron obtenidos por Molinari y Larralde. En trabajos posteriores Molinari y Cabrera demostraron que las fracciones ribosomales de Salmonella typhi inducían también protección en ratones(56,57,83).

Por otra parte, Johnson presentó evidencias de que las proteínas ribosomales eran las que protegían a los ratones. Smith y Biglye sugirieron que tanto el ARN como las proteínas, se requieran para obtener protección. Los trabajos realizados por Eisenstein y Johnson demostraron que las fracciones ribosomales de Salmonella están contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular(13,33,51,76).

En trabajos posteriores, Johnson y cols. demostraron que las proteínas de la envoltura celular de Salmonella typhimurium son las que protegen a los ratones contra la infección por esta bacteria. Estos experimentos ponen en duda el papel que juegan las fracciones ribosomales en la protección y apoyan lo sugerido por Mates y Yosipovisi, en el sentido de que los antígenos protectores de Salmonella se localizan en la superficie bacteriana(33,50,52).

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevó a investigar su eficacia como inmunógenos protectores. (9,18).

Los hallazgos más importantes en cuanto a la capacidad inmunógena y protectora de las PME y porinas son:



Kussi y cols. demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de S. typhimurium protegen al ratón a un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos(41,42).

Isibasi y cols. han demostrado que en pacientes con fiebre tifoidea se producen anticuerpos de clase IgM hacia una PME de 28 kDa durante la fase aguda de su padecimiento. En la convalecencia, la respuesta es de IgG y se dirigió hacia las porinas (36 a 41 kDa). Además que la vacunación de ratones NIH con 10 µg a 30 µg de PME de S. typhi, induce protección del 100% al reto con 500 DL<sub>50</sub> de S. typhi 9,12,Vi:d y S. typhi Ty2; y del 30% al reto con la misma dosis de S. typhimurium. También han demostrado que la administración pasiva de suero de conejo anti-PME de S. typhi 9,12,Vi:d, confiere protección del 100% al reto con 100 DL<sub>50</sub> de S. typhi 9,12,Vi:d y S. typhi Ty2; y del 80% al reto con S. typhimurium. El suero de conejo anti-PME utilizado en el ensayo de protección pasiva reconoció por inmunoelectrotransferencia, todas las PME de las dos cepas de S. typhi empleadas en el reto, pero solamente a las porinas de S. typhimurium. La transferencia pasiva del suero anti porinas pudo proteger al ratón de un reto letal con S. typhimurium virulenta. (30,31,58)

Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de S. typhi 9, 12,Vi:d confieren una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub> de S. typhi 9,12,Vi:d, mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no producen ningún efecto. La administración de anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos de las porinas a ratones BALB/c normales

generó una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer a las porinas por inmunoelectrotransferencia. La vacunación de ratones NIH con 30 µg de PME de *S. typhi*, produjo *in vitro* una respuesta proliferativa de linfocitos, en presencia de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* o *E. coli*. La inmunización de ratones C57Bl/6 con PME de *S. typhi* indujo *in vitro* una respuesta proliferativa específica de linfocitos T. (30,81)

Dentro de los estudios de protección con porinas resaltan los siguientes hechos:

1) Los antígenos proteicos en ausencia de las cadenas O-específicas del LPS pueden producir inmunidad. El suero del ratón inmunizado con PME de la cepa Rb2 (carente de la cadena -O del LPS) contiene sólo anticuerpos anti-proteínas. (58,81)

2) Se ha observado una clara dependencia del efecto de la respuesta inmune a la dosis. La ruta de inmunización no tiene una influencia importante sobre la respuesta inmune excepto para la hipersensibilidad tardía en las vías intramuscular y subcutánea. (55,58)

3) La porina es un antígeno protector y su potencial inmune es significativamente mejorado por el LPS. La mayor eficiencia en la protección con porinas al inocularse junto con el LPS se puede deber a que:

i) Los anticuerpos anti-LPS pueden contribuir a la protección.

ii) El LPS puede actuar como un adyuvante.

iii) El LPS puede formar un complejo con la porina ó inducir un cambio de configuración de la misma, haciendola mas inmunogenica. (81)

La detección de los anticuerpos antiproteinas podría servir para una prueba diagnostica de la tifoidea, particularmente en zonas endemias donde la prueba de Widal no ha sido satisfactoria. (58)

### 3.0 J U S T I F I C A C I O N

Basandose en los hallazgos encontrados en torno a la inmunogenicidad de péptidos, por diferentes autores en diversas proteínas, el presente proyecto se enfoca en la producción de los péptidos de las porinas por rompimiento con BrCN y la determinación de su capacidad estimulante de la proliferación de esplenocitos, como una medida de su inmunogenicidad, para evaluar el valor de estos péptidos como vacunas antitifoídicas.

## 4.0 O B J E T I V O S

### OBJETIVO GENERAL

Obtener, separar y purificar los peptidos de porinas de S. typhi, así como evaluar su capacidad inmunogenica.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener porinas de S. typhi, por el metodo de Nikaido.(60)
2. Obtener peptidos de porinas por tratamiento de estas con DrCN.
3. Elaborar un mapa peptídico, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).
4. Separar y purificar los peptidos, por los metodos de cromatografia por filtracion en gel, isoelectroenfoque e inmunoelectrotransferencia.
5. Determinar la proliferacion de esplenocitos en cultivos celulares, inducida por los peptidos de porinas.

## 5.0 MATERIAL Y METODOS

### 5.1 MATERIAL

Se empleó el material de vidrio comunmente usado dentro del trabajo de laboratorio.

#### 5.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa de Salmonella typhi 9,t2,Viid, aislada de un paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea.

Ratones hembras, singénicos de la cepa C3HeB/FeJ de 18-20 g.

#### 5.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar infusión cerebro corazón (BHI).

- Medio mínimo de sales "A" (Dioxon).

Solución de lavado Hepes 10 mM pH 7.4.

- Medio para cultivo celular HANKS (Sigma).

- Medio para cultivo de células RPMI (Sigma).

Suero fetal bovino (Sigma)

#### 5.1.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos empleados en el presente trabajo fueron de grado analítico y de las marcas J.T.BaKER, Sigma, Merck y Bio-Rad.

## 5.2 METODOLOGIA

### 5.2.0.1 CULTIVO DE BACTERIAS

Las bacterias empleadas para la obtención de porinas se crecieron durante 8 hrs a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon, en fase de crecimiento logarítmica, por centrifugación (Centrifuga Sorvall RC5C. Instrument Dupont) a 1650 xg durante 15 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

### 5.2.0.2 OBTENCION Y PURIFICACION DE PORINAS

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido(60). Las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico, se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Labsonic system sonicator), en periodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.3, a 660 nm. Seguido de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 xg /15 min, la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 xg/30 min a 20°C (Ultracentrifuga Beckman LB-M), esta se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7 con SDS al 2% y se incubó 30 min a 32°C, posteriormente se ultracen-

trifugo y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento formado contenía peptidoglicana, de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella solubilizandola con Tris 50 mM, pH 7.7 que contenía SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.05%; después de un periodo de incubación de 2 hrs a 37°C, se ultracentrifugo a 100 000 xg/30 min a 25°C, el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 ml/hr. Se recuperó la fracción que eluye inmediatamente después del volumen vacío, detectada por absorbancia a 280 nm (Uvicord, S LKB 2138). Para reutilizar la columna, esta se lavó con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel. (15)

### 5.2.0.3 DETERMINACION DE PROTEINAS

La cuantificación del contenido de proteínas en las preparaciones de porinas purificadas (NIKAIDO), se realizó de acuerdo al método de Lowry (48), empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

### 5.2.0.4 DETERMINACION DE LPS.

El contenido de LPS presente en las preparaciones de porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto 3-manooctulónico (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis (36). Empleando una curva patrón de KDO.



### 5.2.05 ELECTROFORESIS DE PORINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO. (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE para porinas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments), sistema discontinuo de electroforesis en condiciones reductoras. El gel separador contenía 11.2% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El amortiguador de muestra fué Tris 0.125 M pH 6.8 conteniendo SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. (43)

La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 6 hrs empleando 20 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 1 hr en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-acido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-acido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel quedó transparente.

### 5.2.0.6 DIGESTION DE PORINAS

La digestión de porinas se realizó según indican los siguientes pasos:

1. Liofilización de las porinas.

2. Se preparan las siguientes soluciones:

ácido fórmico al 70%

solución de NaOH 5 N (se emplea como medida de seguridad, para que en caso de que se derrame el BrCN, éste se neutralice rápidamente con NaOH y evitar así la formación de HCN).

3. Dentro de la campana de extracción de gases se procede a:

a) Colocar un peso aproximado de 100 mg de BrCN dentro de un vial de vidrio, se tapa y se traslada hasta la balanza analítica en donde se determina su peso exacto.

b) Se adiciona 1 ml de ácido fórmico al vial que contiene al BrCN.

c) La solución que se forma se adiciona a un segundo vial, en el cual se han depositado 1 mg de porinas liofilizadas.

d) Se agita la mezcla, se tapa perfectamente y se protege de la luz envolviéndola en papel aluminio.

e) La reacción se mantiene durante 20 hrs.

f) Transcurridas las 20 hrs la mezcla de reacción se coloca dentro de una membrana para diálisis (que permite la

separación de moléculas de 2,000 daltons) y se dializa contra PBS pH 7.4, con seis cambios del amortiguador durante dos días, de 2,000 ml cada uno.

#### **5.2.0.7. ELECTROFORESIS DE PEPTIDOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS PAGE).**

La electroforesis de peptidos se realizó en una unidad para geles verticales (LKB Instruments) en condiciones reductoras y sistema discontinuo de amortiguadores. El gel separador contenía 15% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. (70)

#### **5.2.0.7.1 TINCION CON COLORANTE DE COOMASSIE**

El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 20 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1% , pH 8.3. Los geles se tiñeron empleando la tinción con Coomassie por la rapidez y sencillez que implica su realización, y la tinción con plata por su capacidad para revelar con mayor sensibilidad las bandas más pequeñas o menos concentradas en las muestras, en la primera se sumergieron durante 1 hr en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25%

en metanol-ácido acético-agua (45:10:45), y se decoloraron empleando una solución de metanol-acido acetico-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel quedo transparente. La segunda forma de tinción se realizó según los siguientes pasos:

#### 5.2.0.7.2 TINCION CON PLATA (Bio-Rad Laboratories)

1. Se colocó el gel a teñir dentro de 400 ml de una solución fijadora que contenia 40% de metanol y 10% de ácido acético (V/V), cuidando no tocar el gel directamente con las manos, tanto en este paso como en los sucesivos. Dejar en esta solución por 60 min.

2. Se Cambio el gel a una solución de 10% de etanol y 5% de ácido acetico (400 ml) por 30 minutos.

3. Se contino la fijación del gel, en 400 ml de una solución nueva de 10% de etanol y 5% de ácido acético (V/V) por 30 min.

4. Se oxidó el gel con 200 ml de la solución oxidante previamente preparada (ácido peryódico 1.4 g; etanol 8.0 ml; ac. acetico 10 ml, y H<sub>2</sub>O 110 ml), durante 10 minutos.

5. Se enjuagó en 400 ml de agua desionizada por 10 minutos.

6. Se repitió el lavado dos veces más en 400 ml de agua desionizada por 10 minutos.

7. Se llevó el gel a un recipiente que contenía 200 ml del reactivo de nitrato de plata (2 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado; 28 ml de NaOH 0.1 N recién preparada; 5 ml de AgNO<sub>3</sub> al 20%, y 115 ml de agua desionizada) y se mantuvo ahí por 60 minutos.

8. Se enjuagó con 400 ml de agua desionizada durante 2 min.

9. El gel se colocó en 200 ml de la solución reveladora (05

ml de formaldehído al 37%; 50 mg de ácido acético y 1000 ml de agua desionizada), el tiempo que debió permanecer fué de aproximadamente 30 seg, hasta que la solución reveladora se tornó color café humo, una vez que esto ocurrió, se desechó la solución reveladora y se adicionaron 200 ml de solución nueva por 5 min.

10. Se volvió a cambiar el revelador y se esperaron 5 min.

11. Se detuvo la reacción con 100 ml de ácido acético al 5% (v/v) por 5 minutos.

#### **5.2.0.8 SEPARACION DE PEPTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR**

Empleando tanto una columna de 60 cm de largo X 1.5 cm de diametro como otra de 1 m de largo X 1 cm de diametro, se hizo una cromatografía por filtración en gel, el soporte empleado fué de poliacrilamida (Biogel P-30), el cual se hidrató toda la noche en el amortiguador de elución, (ácido acético al 10%), y se empaco en ambas columnas, dejandose lavar por dos días, una vez hecho esto, se colocaron 0.5 ml de peptidos, a una concentración de 500 µg/ml, las fracciones se recolectaron en volúmenes iguales de 1.15 ml, empleando un colector de fracciones para cromatografía en gel (LKB Multivac 2111), obteniendose las lecturas de absorbancia a 280 nm en el Uvicord por registro en el graficador potenciométrico. Las fracciones colectadas, se leyeron también a 280 nm en el espectrofotómetro, y estos resultados se graficaron, para obtener el patrón de elución.

Una vez que se hubo determinado en que tubos se encontraban

los picos de elución se procedió a someterlos a diálisis contra PBS pH 7.4, con el fin de eliminar el ácido acético, y así poderlos emplear en los ensayos de activación celular.

#### **5.2.0.9 SDS-PAGE DE PEPTIDOS SEPARADOS**

Con el fin de corroborar que los picos de absorción estaban dados por los péptidos los cuales ya habían sido separados, se sometieron muestras de las fracciones a corrimientos electroforéticos, habiéndose previamente concentrado estas fracciones por liofilización. La tinción de estas electroforesis se hizo con plata, debido a que la cantidad de proteína era mucho menor en estas muestras, y por tanto requería de un método más sensible de tinción.

#### **5.2.1.0 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

La electrotransferencia de péptidos y porinas de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se llevó a cabo durante 75 min. a 500 mA en un equipo Transphor (LKB Instruments). Empleando como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 20% en Tris 20 mM, pH 8.3. Transcurrido este tiempo y para comprobar que la transferencia se llevó a cabo, se tiñó el PNC con rojo de Ponceau durante 5 minutos y se lavó en seguida con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS).

Con el propósito de confirmar la transferencia y de saber si un anticuerpo monoclonal anti porinas (lote 8F6), reconocía a

alguno de los péptidos, se reveló el PNC sometiéndolo al siguiente tratamiento:

1. Se colocaron en solución de bloqueo durante 3 hrs a 37°C, (dos tiras en PBS-gelatina al 2% y dos tiras en PBS-leche al 2%).

2. Se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0.1%, con agitación, 5 minutos cada vez.

3. Se incubaron las tiras con el primer anticuerpo sin diluir (usando sobrenadante de células SP2 como control negativo), por 24 hrs en agitación a 37°C.

4. Se lavaron 5 veces en agitación, durante 5 minutos cada vez.

5. Se adicionó el conjugado (IgG de cabra anti-ratón con peroxidasa), diluido 1:500 con solución de bloqueo, 5 ml por tira por 90 min en agitación a 37°C.

6. Se lavo con PBS-Tween seis veces y tres veces con PBS sólo, 5 minutos en agitación.

7. Finalmente se revelaron las tiras con una solución de Diaminobencidina (5 mg) + 10 ml de PBS + 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

8. Cuando las bandas que aparecían sobre las tiras de papel se observaron con claridad se detuvo la reacción con agua.

#### 5.2.1.4. TRATAMIENTO DEL PNC PARA ESTIMULACION DE ESPLENO-CITOS (1)

Con el fin de disponer de los péptidos en una forma tal que fueran accesibles a las células, fue necesario tratar al PNC de la siguiente manera:

1. Una vez que se ha terminado la transferencia, se tiñe con rojo de Ponceau y se lava con PBS-Tween 0.1% para observar las bandas.

2. Recortar las bandas

3. Lavar con PBS-Tween 0.1% estéril.

4. Pasar a tubos estériles.

5. Lavar con PBS estéril y secar.

6. Cortar en pedazos pequeños.

7. Pasar a tubos de vidrio estériles. \*

8. Agregar aprox. 100  $\mu$ l de DMSO agitar y disolver. \*

9. Incubar a T.A. 1.5 hrs. \*

10. Resuspender en amortiguador de carbonatos pH 9.6 estéril en tubo estéril, con agitación constante, adicionar 1 gota cada 5 seg hasta 0.5 ml. \*

11. Lavar 2 veces con HANKS. \*

12. Resuspender en 900  $\mu$ l de RPMI 1,640  $\mu$ l + 100  $\mu$ l SFB. \*

\* Los pasos señalados con el asterisco, se debieron realizar en condiciones de esterilidad, dentro de la campana de flujo laminar.

#### 5.2.1.2 ISOELECTROENFOQUE (IEF) (25)

En la técnica de isoelectroenfoque se separan las proteínas al alcanzar su punto isoelectrico. Se empleo para verificar la pureza de los peptidos y las porinas al confirmar los pI teóricos reportados para cada uno de ellos. Los pasos que se siguen para desarrollar esta técnica son los siguientes:



1. Una vez limpio el material con agua y etanol, colocar la placa de vidrio sobre el soporte azul. Se deposita una pequeña cantidad de agua sobre su superficie.

2. Se coloca el lado lipofílico de un acetato para electroenfoque IKB sobre la placa de vidrio y se sacan las burbujas que se hayan formado.

3. Colocar el plástico separador alrededor de la placa ya montada.

4. Colocar la placa de plástico que contiene los carriles.

5. Una vez hecho el emparedado, se sella colocando pinzas alrededor del mismo.

6. Se preparan las siguientes soluciones:

a) Solución densa (ácida)

-598  $\mu$ l de Inmobilina pH 3.6

-446  $\mu$ l de Inmobilina pH 4.6

-314  $\mu$ l de Inmobilina pH 6.2

-Agua cbp 15 ml

-5 ml de Acrilamida

-7.3 ml glicerol al 97%

-Agua cbp 30 ml

b) Solución ligera (básica)

-424  $\mu$ l de Inmobilina pH 3.6

-640  $\mu$ l de Inmobilina pH 4.6

-930  $\mu$ l de Inmobilina pH 6.2

-Agua cbp 15 ml

-5 ml Acrilamina

-Agua cbp 30 ml

7. La solución ligera se coloca en el recipiente izquierdo del hacedor de gradientes, y la solución densa en el derecho (donde se coloca también el motor).

8. Se adicionan 75  $\mu$ l de TEMED y 80  $\mu$ l de APS a cada recipiente. Se agita momentáneamente, se coloca el motor y se enciende. Colocar el cono. Abrir las valvulas de salida de conexión, y depositar la mezcla en el emparedado.

9. Una vez polimerizado el gel, se retiran las pinzas y se coloca la placa sobre el refrigerante previamente engrasado.

10. Se mojan tiras de papel filtro con la solución de los electrodos y se colocan en los extremos del gel.

11. Se acomodan los electrodos y se realiza un precorrimiento de 30 min a 2000 V, 15 mA y 20 Watts.

12. Se deposita la muestra y se realiza el corrimiento a 2000 V, 5 mA y 5 Watts durante toda la noche.

13. Apagar el sistema, sacar la placa y proceder a fijar la proteína durante 1 hr. Posteriormente se tiñe con azul de Coomassie durante 15 minutos y se procede a decolorar.

### 5.2.1.3 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS MEDIDA POR INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA ( $^3$ HTdr)

1. Esquema de inmunización.

a) Inmunizar lotes de 3 ratones por vía intraperitoneal los días 0 y 7 con 30  $\mu$ g de PME de Salmonella typhi en HANKS. Se inocula también un ratón control con HANKS.

2. Obtención de esplenocitos (día 14).

a) Empleando condiciones de esterilidad desnucar los ratones inmune y control y limpiarlos con Yodo al 3%.

b) Extraer el bazo colocandolo en 5 ml de HANKS en condiciones de esterilidad.

3. Tratamiento del bazo.

a) Disgregar el bazo tamizando con malla metálica y adicionar 5 ml de HANKS.

b) Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos.

c) Lavar dos veces con HANKS eliminando en cada ocasión el sobrenadante y resuspender las células.

d) Adicionar 1 ml de cloruro de amonio y frotar suavemente durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo adicionar 10 ml de HANKS.

e) Centrifugar nuevamente a 1200 rpm durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y adicionar 1 ml de RPMI.

f) Determinar viabilidad empleando azul tripano.

g) Diluir con RPMI hasta tener una concentración de 2 millones de células/ml.

h) Colocar 200 000 células por pozo en placas de 96 pozos de microcultivo en 200  $\mu$ l. Se agregan concentraciones de porinas de 30  $\mu$ g/ml, y 50  $\mu$ l de péptidos solubles y en PNC, en una placa de polietileno de 96 pozos. Las células se cultivan 5 días a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

i) Durante las últimas 18 horas de cultivo se adiciona a cada pozo 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>HTdr y al final de la incubación se cosechan en un cosechador semiautomático (mca. Mini-Mash II)

j) La incorporación de <sup>3</sup>HTdr se determina en un contador de

centelleo de radiaciones  $\beta$  (Contador  $\beta$  Beckman LS 5801).

K) Obtener esplenocitos de animales no inmunizados, los cuales se cultivan del modo antes descrito.

Como testigo positivo de estimulación se emplean células provenientes de ratones inmunes y controles, a las que se adicionan 10  $\mu\text{g/ml}$  de Concanavalina A por pozo.

Se incluyeron pozos de células cultivadas con papel de nitrocelulosa sin proteína para descartar su actividad mitogénica.

## 6.0 R E S U L T A D O S

### 6.1 OBTENCION Y PURIFICACION DE PORINAS

Las porinas de *Salmonella typhi* se obtuvieron de acuerdo al método de Nikaido(60), el perfil cromatográfico de purificación por exclusión molecular se observa en la Fig. 8. Las porinas se recolectaron en la fracción 4, que eluyó inmediatamente después del volumen vacío, estas contenían menos del 1% de LPS como contaminante.

En la figura 9 se observan las bandas correspondientes a las porinas OmpC y OmpF.

### 6.2 OBTENCION Y CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE P E P T I D O S

Después de digeridas las porinas y una vez separados los productos de esta digestión se observaron las bandas que aparecen en las figuras 10 y 11. En los carriles correspondientes a los peptidos aparecen cuatro bandas (con Coomassie) y siete bandas (con Plata) que se pueden observar claramente, estas bandas fueron observadas en todas las muestras de peptidos con lo que se demuestra la reproducibilidad del método de obtención.

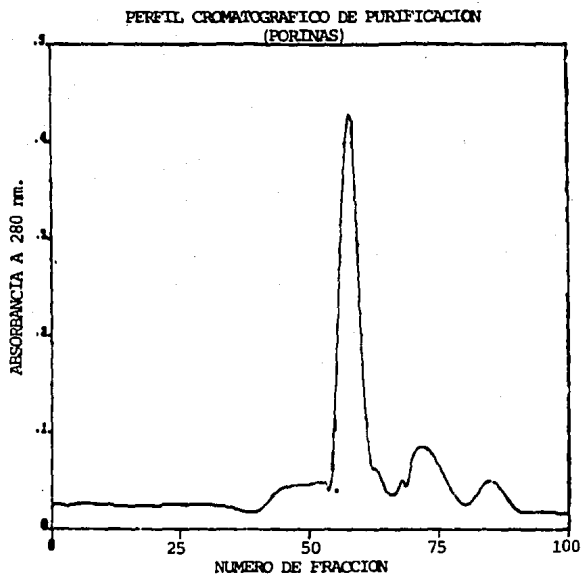


Figura 8. Perfil cromatografico de purificación de porinas de *S. typhi*, por exclusion molecular. Columna de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical Co.), con una velocidad de flujo de 4 ml/hr.

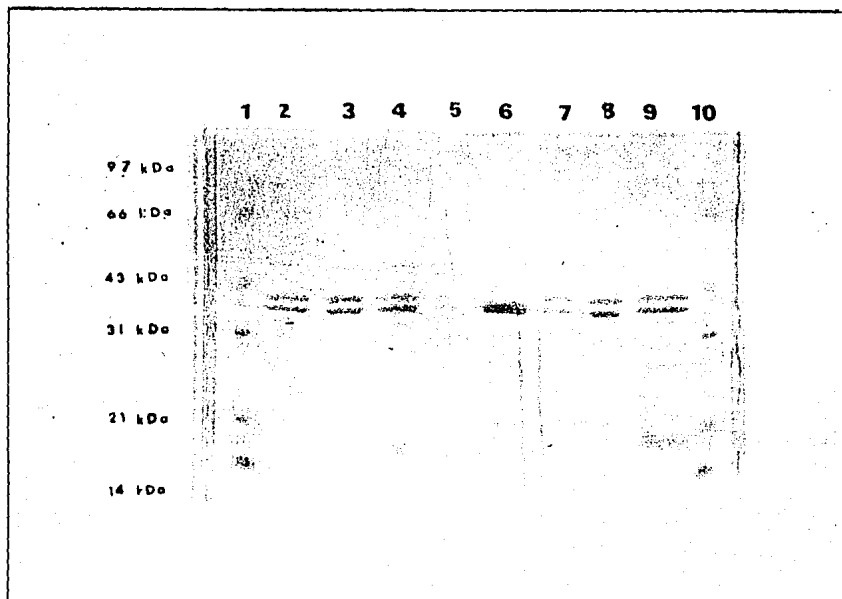
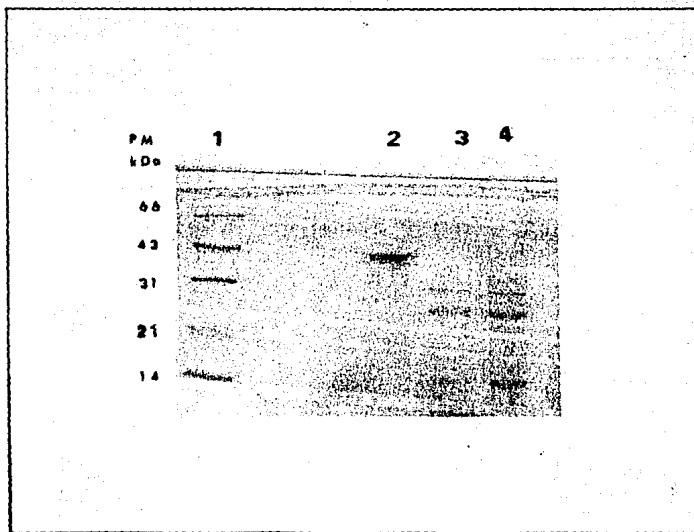


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, teñida con azul de Coomassie, de: porinas de *Salmonella typhi* aisladas por el método de Nikaido [10  $\mu$ g carriles 2, 3, 5-8]. En los carriles 4 y 9 aparecen las PME sin separar.



*Figura 10. Patrón electroforético de los péptidos de las porinas de S. typhi digeridas con BrCN, los cuales se observan en los carriles 3 y 4, después de haber sido teñidos con colorante de Coomassie.*



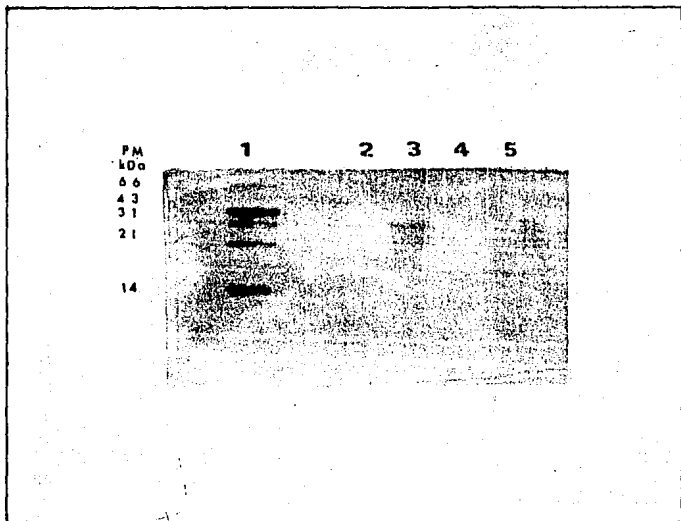


Figura 11. Patron electroforético de los péptidos de las porinas de *S. typhi* digeridas con BrCN, teñidos con Nitrato de Plata, los cuales se observan en los carriles 4 y 5.

Mediante la medición de la distancia recorrida por los peptidos, al teñir con azul de Coomassie y plata, se pudo conocer el peso molecular aproximado de cada uno de ellos, encontrándose que recorren las distancias reportadas en la tabla 5. Basándonos en la relación logarítmica entre el corrimiento de las muestras en SDS-PAGE, expresado por el  $R_f$ , con el peso molecular de los compuestos, se procedió a construir la curva de calibración correspondiente, la cual se muestra en la fig. 12

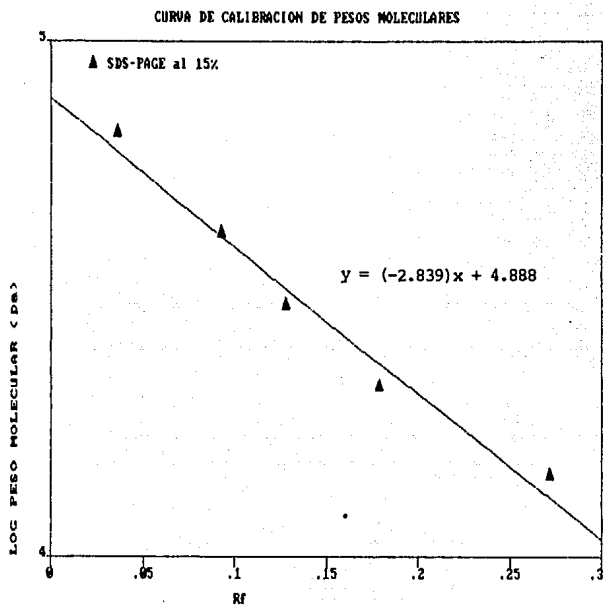


Fig. 12. Curva patrón de los estándares de pesos moleculares obtenidos para un gel de poliacrilamida al 15%, en condiciones reductoras.

Interpolando el *Rf* obtenido para los péptidos en la curva patron se conocieron los pesos moleculares de cada uno de los mismos (Tabla 5), cabe mencionar que estas longitudes de corri --miento son el promedio de varias electroforesis.

Los pesos moleculares calculados para los péptidos indican que la digestión se realizó solo de forma parcial, por lo que la banda de mayor peso molecular correspondería en realidad a la unión del péptido de 8 kDa con el de 21 kDa, y el de 16 kDa a una unión entre el de 9 kDa y el de 6 kDa.

Con el fin de conseguir una digestión completa se cambiaron las condiciones de reacción agregando 30 mg más de BrCN después de 20 horas de haber puesto los primeros 100 mg de BrCN, y se dejó durante 24 horas mas. Sin embargo no hubo cambios en cuanto a los productos de reacción obtenidos, por lo que se decidió trabajar con los péptidos que producía la primera digestión (incompleta).

La determinación de la concentración de péptidos obtenida tras la digestion se realizó mediante el método de Lowry. La concentración de péptidos así obtenida fue de 500 µg/ml.

**TABLA 5.-Valores de la distancia recorrida por los péptidos y los estándares de pesos moleculares expresada por el Rf, así como el peso molecular correspondiente a cada uno de ellos.**

POLIPEPTIDO	Longitud recorrida	Rf	PM (Da)
E Albúmina sérica			
S Bovina (BSA)	0.5 cm	0.0357	66,200
T Albúmina de huevo			
A blanco de gallina	1.3 cm	0.0928	42,699
N Anhidrasa carbonica			
D bovina	1.8 cm	0.1286	31,000
A Inhibidor de la			
R tripsina, de soya	2.5 cm	0.1786	21,500
E Lisozima del huevo			
S blanco de gallina	3.8 cm	0.2714	14,400
P UNO	2.1 cm	0.1500	28,983
E DOS	3.0 cm	0.2142	19,040
P TRES	3.4 cm	0.2429	15,791
T CUATRO	4.4 cm	0.3143	9,902
I CINCO	4.6 cm	0.3286	9,018
D SEIS	4.8 cm	0.3429	8,213
O SIETE	5.2 cm	0.3714	6,816

El frente de colorante recorrió una distancia de 14.0 cm.  
El Rf se calcula según la fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por la proteína}}{\text{distancia recorrida por el frente de colorante}}$$

Se usaron estándares de pesos moleculares para SDS-PAGE, para rangos bajos (Bio-Rad Laboratories, Richmond, C.A.).

### **6.3 ISOELECTROENFOQUE**

Para observar la pureza y el pI de los péptidos obtenidos se decidió realizar esta técnica, el aspecto final del gel después de finalizado el corrimiento de toda la noche fue el que se muestra en la fig. 13.

Como se puede ver el péptido de 29 kDa tiene un punto isoeléctrico de 4.6, en tanto que el péptido de 21 kDa tiene un pI aproximado de 4.7, se confirma que las porinas presentan un pI de alrededor de 4.6, mediante la comparación con los estándares usados, (anhidrasa carbónica pI:5.9;  $\beta$ -lactoglobulina A pI:5.13 e inhibidor de tripsina pI:4.6).

### **6.4 SEPARACION DE PEPTIDOS**

#### **6.4.1 CROMATOGRAFIA POR FILTRACION EN GEL**

Como ya se mencionó antes, se usaron dos sistemas de columnas diferentes para la separación de los péptidos, encontrándose los cromatogramas que se muestran en las figuras 14, 15 y 16.

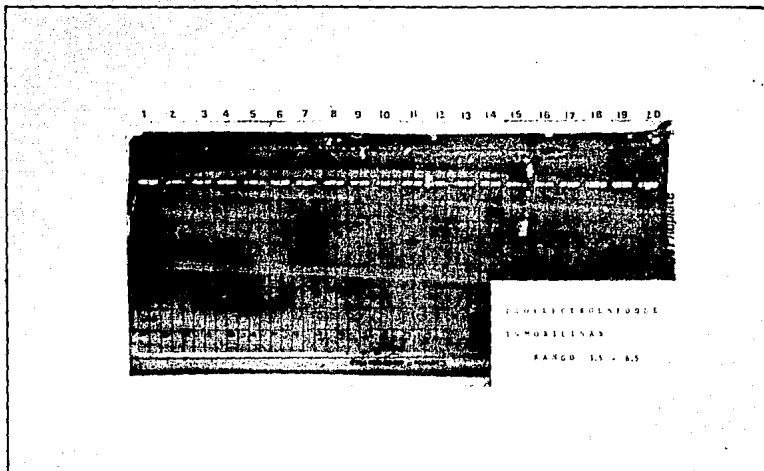


Figura 13. Isoelectroenfoque de los péptidos de porinas de *S. typhi* por el método de las inmobilinas, los péptidos aparecen en los carriles 1, 2 y 3. Las porinas se encuentran en el carril 11 y los estándares en los carriles 14, 15 y 16 (pI de 5.9, 5.13 y 4.6 respectivamente).

PURIFICACION DE PEPTIDOS DE *S. typhi*

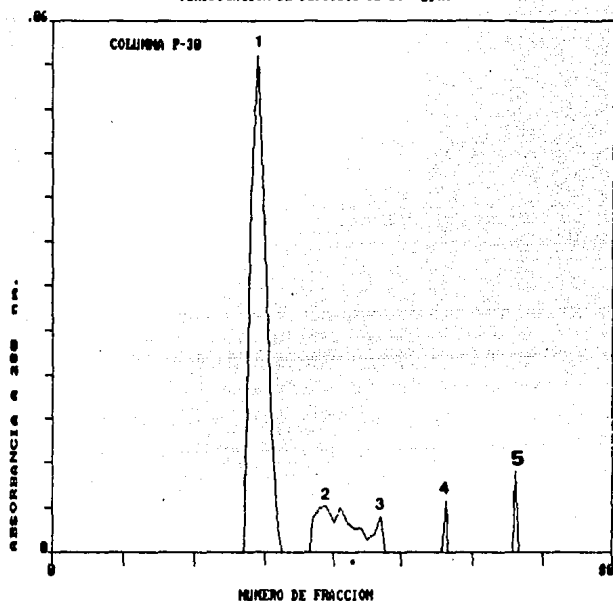
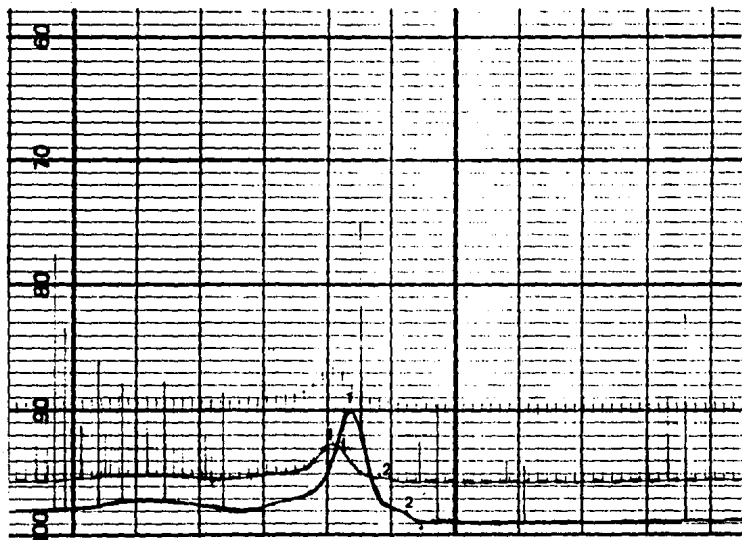


Figura 14. Cromatograma de los péptidos de porinas, empleando una columna de 60 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, en la que la fase estacionaria la forma el biogel P-30 de BIO-RAD y el líquido de elución es ácido acético al 10%, la correspondencia que se sugiere para los números es la siguiente:

PICO NUMERO	PEPTIDO
1	29 KDa
2	19 KDa
3	16 KDa
4	9 KDa
5	8 KDa





LKB-PRODUKTER AB, Stockholm, Sweden.

Figura 15. Cromatograma registrado para la columna de 60 cm de largo, empleando el graficador con una lámpara de longitud de onda de 280 nm, la línea continua representa la absorbancia y la línea discontinua la transmitancia. La velocidad del papel fué de 0.2 mm/min. El número 1 representa al péptido de 29 kDa y el 2 al de 19 kDa.

SEPARACION DE PEPTIDOS DE PORINAS DE *S. typhi*

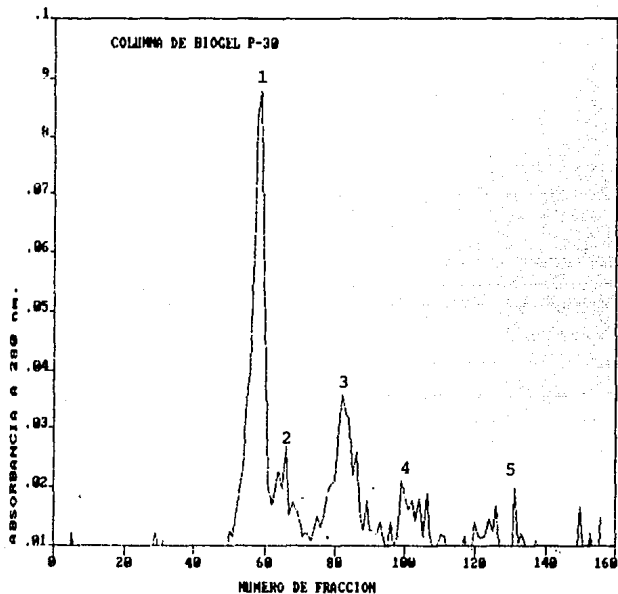


Figura 16. Cromatograma de los peptidos de porinas de *S. typhi* 9,12, y 13, empleando un soporte de Biogel P-30, ácido acético al 10% (como líquido de elución), la columna de vidrio empleada tenía un diámetro de 1 cm y una longitud de 1 m. La relación de los picos con los peptidos es la que a continuación se describe:

PICO NUMERO	PEPTIDO
1	29 KDa
2	19 KDa
3	16 KDa
4	9 KDa
5	8 KDa

Con el fin de determinar la longitud de onda a la cual absorben mejor la luz cada uno de los picos obtenidos en la columna de exclusión molecular se realizó un barrido del espectro de absorción de cada pico obtenido a través de la cromatografía de exclusión molecular. Encontrándose que a 267.0 nm es la longitud de onda a la cual los cuatro picos absorben más, sin que interfiera la absorbancia que el ácido acético tiene sobre la luz ultravioleta (UV), figura 17.

El volumen muerto de la columna fue de 15 ml, la velocidad de flujo fue de 12 ml/hr y el volumen de las fracciones de 1.15 ml.

#### 6.4.1.1 SDS-PAGE DE PEPTIDOS SEPARADOS

Después de haber sometido las muestras provenientes de la separación por filtración en gel, a la SDS-PAGE y de haber teñido con plata, el gel resultante mostró el aspecto que se representa en la Figura 18.

Se encontró que el pico de mayor tamaño correspondía al peptido de 29 kDa. Las muestras de los otros picos no presentaron banda alguna en la electroforesis, probablemente por la baja concentración en que se encontraban debido al efecto de la dilución que implica la separación por filtración en gel.

SEPARACION DE PEPTIDOS DE PORINAS DE *S. typhi*

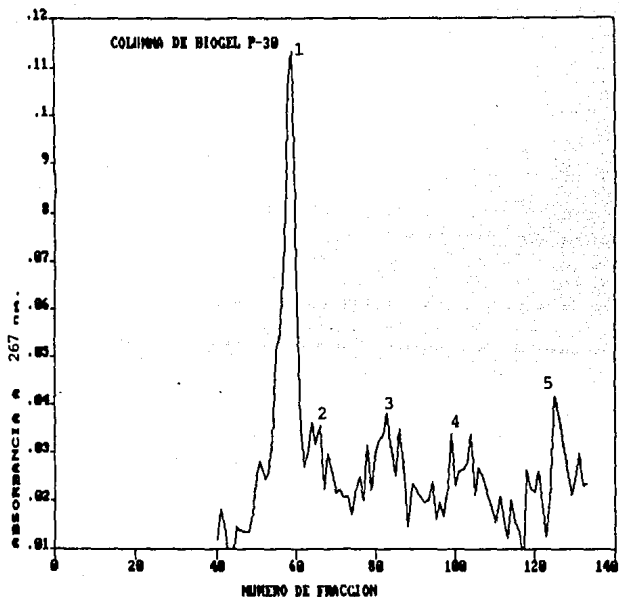
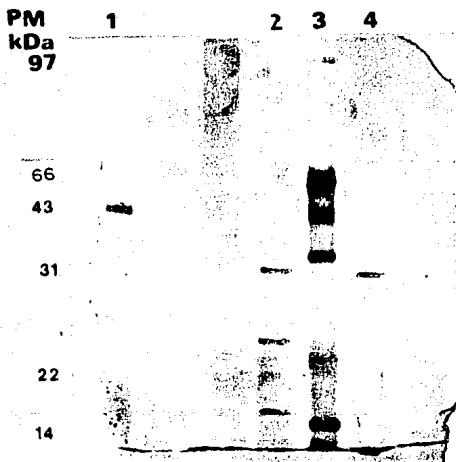


Figura 17. Perfil cromatográfico del digerido de porinas de *S. typhi* con BrCN, en columna de 1 m de longitud por 1 cm de diametro, al leerse la absorbancia de las fracciones obtenidas, a una longitud de onda de 267 nm. A continuación se detalla la correspondencia sugerida de los picos con los péptidos.

PICO NUMERO	PEPTIDO
1	29 kDa
2	19 kDa
3	16 kDa
4	9 kDa
5	8 kDa



*Figura 18. SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna de 60 cm, después de haber sido dializadas contra PBS pH 7.4.*

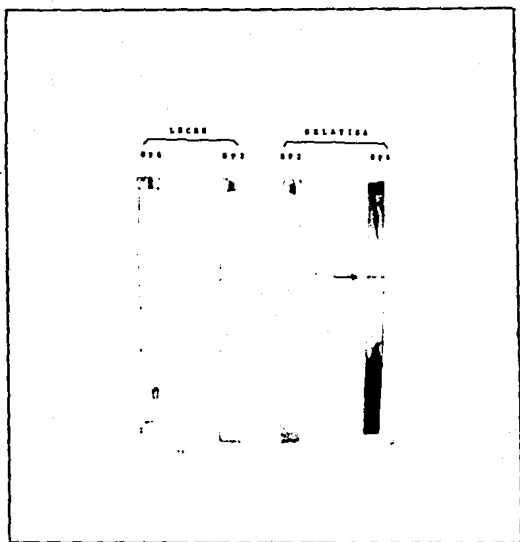
Carril	Muestra
1	Porinas
2	Péptidos
3	Estándares de pesos moleculares
4	Banda correspondiente al péptido de 29 kDa (pico uno del cromatograma).

#### 6.4.2 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Empleando un gel analítico para electroforesis, se separó una muestra con péptidos de porinas y en seguida se colocó en un sistema de transferencia. El paso de corriente se suspendió a los 45, 55, 65, 75 y 85 minutos, encontrándose que a los 75 minutos aparecen las bandas de los péptidos y las porinas. Una vez establecidas las condiciones a las cuales se transfieren los péptidos, se repitió la transferencia pudiéndose apreciar tan sólo 4 bandas al teñir con rojo de Ponceau, las mismas que se observan al teñir con azul de Coomassie (29 kDa, 19 kDa, 16 kDa y 8 kDa).

Del PNC que contenía los péptidos transferidos se cortaron 4 tiras que después se revelaron con anticuerpos monoclonales, pudiéndose observar una banda de color rosa intenso en la tira que se bloqueó con PBS-Gelatina (péptido de 29 kDa). En la figura 19 se puede apreciar el aspecto que presentaban las tiras de PNC después de haber sido reveladas.

El papel de nitrocelulosa se trató conforme a la técnica ya descrita, empleando DMSO, obteniéndose los péptidos dentro de partículas muy finas de papel suspendidas en el medio de cultivo.



*Figura 19. Tiras del papel de nitrocelulosa con peptidos inmunotransferidos, despues de haber sido reveladas con un anticuerpo monoclonal anti-porinas.*

SP2 : Sobrenadante de células SP2 (mieloma de ratón)

8F6 : Sobrenadante de hibridomas productores de anticuerpos anti-porinas.

## 6.5 ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS

Con el fin de conocer las condiciones de microcultivo más favorables para realizar la activación de las células de bazo, se procedió a montar una placa de polietileno de fondo plano con 96 pozos, en la que se varió tanto la cantidad de células por pozo, como la concentración de SFB en el medio de crecimiento RPMI. El ratón empleado para el ensayo fue un C3HeB/FeJ, las cuentas por minuto de los tres pozos que contenían lo mismo se promediaron, en la tabla 6 se presentan tanto las medias de las CPM como sus desviaciones estándar correspondientes.

En vista de que cuando se emplean 200,000 células/pozo se presentan valores de CPM más bajos que cuando se usan 100,000 células/pozo (lo que repercutiría en que se tendrían fondos menores al realizar la activación), y que con esta cantidad se observan valores más altos que cuando son empleadas 300,000 células/pozo (probablemente por que el medio se agota más rápido, deteniendo la proliferación), se decidió emplear  $2 \times 10^5$  células/pozo.

En cuanto a la concentración de SFB en el medio de crecimiento se eligió emplear el medio RPMI suplementado al 10%, por



producir una estimulación inespecífica menor a las concentraciones del 2% y 5%.

Una vez estandarizadas las condiciones del microcultivo celular, se procedió a realizar el experimento de la activación de esplenocitos, y se montó una placa de fondo plano con 96 pozos. Los resultados obtenidos para la incorporación de timidina marcada con  $H^3$ , de cada uno de los péptidos de las porinas obtenidos por rompimiento con BrCN, se presentan en la tabla 7.

La representaciones gráficas de los índices y coeficientes de estimulación se presentan en las figuras 20 y 21 respectivamente.

**TABLA 6. Medias y desviaciones estandar de las CPM registradas en el ensayo realizado para determinar las condiciones óptimas de microcultivo, bajo las cuales se lleva a cabo mejor la incorporación específica de <sup>3</sup>H Tdr**

Células/pozo	Concentración de SFB en RPMI.	Media	Desviación Estandar
50,000	--	171.0	16.9
50,000	2 %	112.0	28.3
50,000	5 %	87.8	11.3
50,000	10 %	710.0	45.6
100,000	--	194.7	4.6
100,000	2 %	762.0	144.9
100,000	5 %	1,846.0	252.0
100,000	10 %	1,553.0	103.6
200,000	--	283.7	31.9
200,000	2 %	467.2	83.9
200,000	5 %	531.5	74.4
200,000	10 %	380.8	57.5
300,000	--	443.8	35.6
300,000	2 %	398.5	59.5
300,000	5 %	351.3	30.7
300,000	10 %	167.0	28.4

*El testigo de concanavalina A presentó una media de cpm de 9,711.5, usandose 200,000 células/pozo y medio suplementado con SFB al 10%.*

Tabla 7. Medias y desviaciones estándar de las CPM obtenidas por la lectura en el contador de radiaciones  $\beta$ , para cada uno de los antígenos usados en la estimulación de esplenocitos de ratón

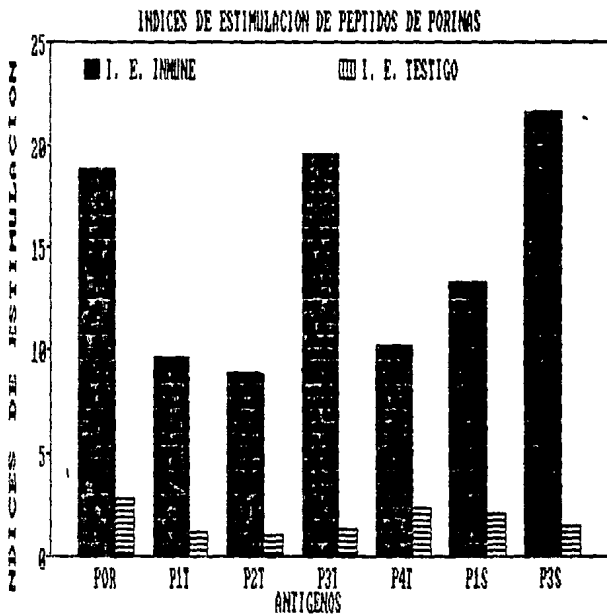
ANTIGENO	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR
<b>RATON INMUNE</b>		
Células solas	493.0	64.6
Porinas solubles	9,253.0	2,140.0
Papel de Nitrocelulosa	770.0	204.0
Péptido de 29 kDa		
Transferido	7,408.0	1,279.0
Péptido de 19 kDa		
Transferido	6,797.0	605.0
Péptido de 16 kDa		
Transferido	15,007.0	2,974.0
Péptido de 9 kDa		
Transferido	7,778.0	1,002.0
Péptido de 29 kDa		
Soluble	6,517.0	599.0
Péptido de 16 kDa		
Soluble	10,685.0	737.0
Concanavalina A	66,343.0	4,345.0
<b>RATON TESTIGO</b>		
Células solas	313.0	93.0
Porinas solubles	867.0	71.0
Papel de Nitrocelulosa	400.0	23.0
Péptido de 29 kDa		
Transferido	480.0	59.0
Péptido de 19 kDa		
Transferido	127.0	49.0
Péptido de 16 kDa		
Transferido	528.0	19.0
Péptido de 9 kDa		
Transferido	937.0	358.0
Péptido de 29 kDa		
Soluble	662.0	112.0
Péptido de 16 kDa		
Soluble	475.0	48.0
Concanavalina A	17,268.0	848.0

El tratamiento de los datos se hace calculando los índices de estimulación y los coeficientes de estimulación según las formulas siguientes:

$$\text{Indice de estimulación del inmune} = \frac{\text{CPM del inmune con antígeno}}{\text{CPM del inmune sin antígeno}}$$
$$\text{Indice de estimulación del testigo} = \frac{\text{CPM del testigo con antígeno}}{\text{CPM del testigo sin antígeno}}$$
$$\text{Coeficiente de Estimulación} = \frac{\text{Indice de estimulación del inmune}}{\text{Indice de estimulación del testigo}}$$

**Tabla 8. Indices y coeficiente de estimulación para cada uno de los antígenos empleados en la estimulación de esplenocitos.**

ANTIGENO	INDICE DE ESTIMULACION INMUNE	TESTIGO	COEFICIENTE DE ESTIMULACION
Perinas solubles	18.77	2.77	6.78
Péptido transferido (28,883 Da)	9.62	1.2	8.02
Péptido transferido (19,040 Da)	8.83	1.0	8.83
Péptido transferido (15,791 Da)	19.49	1.32	14.77
Péptido transferido (8,213 Da)	10.10	2.34	4.32
Péptido soluble (28,883 Da)	13.22	2.12	6.25
Péptido soluble (15,791 Da)	21.67	1.52	14.25
Papel de Nitrocelulosa	1.56	1.28	1.22
Concanavalina	134.57	55.17	2.40



*Figura 20. Indices de estimulación de péptidos de porinas, comparación de los índices para los ratones inmune y testigo*

POR = PORINA  
 P1T = PEPTIDO 1 Transferido (29 kDa)  
 P2T = PEPTIDO 2 Transferido (19 kDa)  
 P3T = PEPTIDO 3 Transferido (16 kDa)  
 P4T = PEPTIDO 4 Transferido ( 9 kDa)  
 P1S = PEPTIDO 1 Soluble (29 kDa)  
 P3S = PEPTIDO 3 Soluble (16 kDa)

### COEFICIENTES DE ESTIMULACION DE PEPTIDOS D/PORINAS

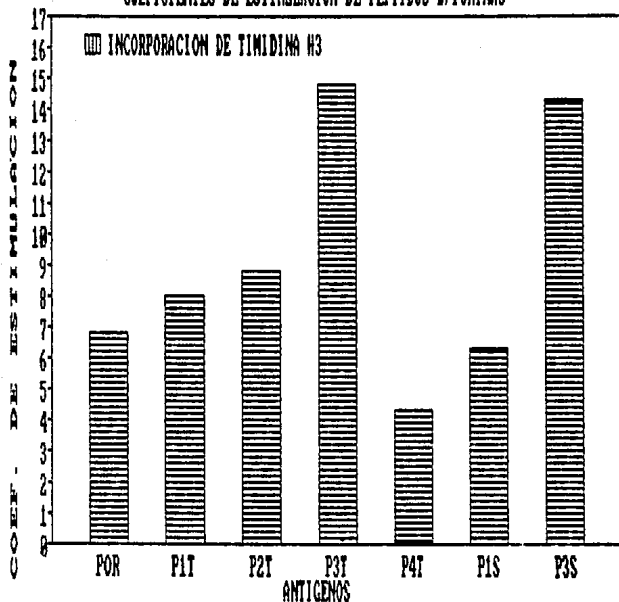


Figura 21. Coeficientes de estimulación de los diferentes antígenos usados en la incorporación de timidina marcada radioactivamente con  $H^3$ .

POR = PÖRINA  
 P1T = PEPTIDO 1 Transferido (29 kDa)  
 P2T = PEPTIDO 2 Transferido (19 kDa)  
 P3T = PEPTIDO 3 Transferido (16 kDa)  
 P4T = PEPTIDO 4 Transferido ( 9 kDa)  
 P1S = PEPTIDO 1 Soluble (29 kDa)  
 P3S = PEPTIDO 3 Soluble (16 kDa)

## 7.0 D I S C U S I O N

La extracción de porinas empleando el método de Nikaido, (60) permitió la obtención de dos porinas; OmpC y OmpF, las cuales se identificaron por SDS-PAGE. Estas porinas al ser digeridas por tratamiento con BrCN produjeron no sólo los cuatro péptidos esperados para cada una de ellas, sino además 2 péptidos adicionales (debido a una digestión incompleta), de pesos moleculares de alrededor de 29 kDa y 16 kDa, en el caso del de 29 kDa, éste no puede ser sino la unión de dos péptidos (21 y 8 kDa), ya que éstos se encuentran juntos en la cadena polipeptídica, en tanto que el péptido de 16 kDa correspondería a la unión del de 9 kDa con el de 6 kDa por la misma razón que el anterior. Aunque se trataba de probar la inmunogenicidad de cada uno de los péptidos por separado, en ninguna de las digestiones se consiguió provocar un rompimiento total, sin embargo la digestión parcial resultó muy reproducible, por lo que se decidió trabajar con las fracciones de las porinas así obtenidas.

Como se pudo apreciar en los cromatogramas presentados para cada uno de los sistemas empleados, la columna de 60 cm de largo por 1.5 cm de diámetro presenta los fondos de lectura más bajos, sin embargo en ella resulta más difícil observar un segundo pico muy cercano al primero, por lo que podría pasar inadvertido, lo que no sucede con la columna de 1 m de longitud por 1 cm de



diámetro, que realiza una mejor separación (por la formación de más platos teóricos), sin embargo, nos presenta unas lecturas de absorbancia de fondos más altos y un cromatograma más irregular el cual se atribuye a la resolución de todos los péptidos obtenidos que serían seis por cada porina, doce en total, los cuales por su similitud en cuanto a su peso molecular no pueden ser separados con eficiencia por éste método.

En los casos en que se tiene una mezcla tan basta de componentes, lo que se sugiere es usar un sistema cromatográfico líquido de alta presión (HPLC), el motivo por el que no se usó este método fué que no se contaba con la columna adecuada para el rango de pesos moleculares de los péptidos.

Mediante el uso del isoelectroenfoco fué posible conocer el pI de los diferentes péptidos (dentro del rango de 3.5 a 6.5), así como confirmar la pureza de las proteínas empleadas y de los péptidos obtenidos, ayudando ésto a eliminar posibles interferencias por contaminación con otro tipo de compuestos, diferentes a los de nuestro interés.

Por medio de la electroforesis, se pudo demostrar que el pico uno del cromatograma, corresponde al péptido de 29 kDa, se sugiere que el pico dos corresponde al péptido de 21 kDa y el pico tres al de 16 kDa. Lo anterior se fundamenta en que siendo el péptido de 9 kDa el que contiene todos los triptofanos (3) de la proteína, es el que más absorbe a 280 nm. y como se pudo ver en las figuras 16 y 17, es el pico tres el único que absorbe

menos a 267 nm y más a 280 nm.

El hecho de que el monoclonal 8F6 (clase IgM ) reconozca solo la banda correspondiente al péptido de 29 kDa, pero no a los otros péptidos, indicaría que el determinante antigénico contra el cual reacciona el monoclonal, está formado por una parte de la secuencia del péptido de 21 kDa y otra parte de la secuencia del péptido de 8 kDa, y que el BrCN rompe en una parte intermedia del epítoto.

Con respecto a la inmunogenicidad de los péptidos se puede decir que es el de 16 kDa el que induce una respuesta celular mayor tanto en la forma soluble como en la transferida, por lo que es muy probable que sea en alguna región de este péptido en la que se encuentre el epítoto inmunodominante, en este sentido nos inclinariamos a pensar que este determinante antigénico debiera estar en el péptido de 6 kDa en vista de que el péptido de 9 kDa transferido no da una respuesta muy alta por sí mismo.

Como se puede ver en las figuras 20 y 21, la inducción de la respuesta celular para el péptido de 16 kDa es incluso mayor que para las porinas (comparandose ambos cuando se encuentran en solución), lo que pudiera significar el aumento de la respuesta inmune por la especificidad del reconocimiento del anticuerpo hacia un epítoto determinado.

Una vez montada la técnica de HPLC para conseguir una separación más fina para el digerido de porinas y habiendo sintetizado

dichas proteínas por ingeniería genética (obteniéndose una sola porina, ya sea OmpC u OmpF), como ya se está haciendo en el laboratorio, será posible terminar de responder las cuestiones tratadas en el presente trabajo.

La determinación de la ubicación del determinante antigénico inmunodominante resulta de utilidad en cuanto a el desarrollo del modelo de una nueva vacuna antitifoidea, ya que esta será más específica e incluso pudiera aplicarse el péptido unido a otros toxoides como el tetánico para favorecer la respuesta inmune despertada por ambos.

El paso a seguir dentro del contexto de la búsqueda de una vacuna eficaz contra la fiebre tifoidea mediante el empleo de los péptidos de las porinas, es el de probar la respuesta humoral que estos son capaces de inducir, ya sea por la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) o alguna otra que permita medir el título de anticuerpos y probar la resistencia de que proveen en el modelo murino, cuando los animales sean inmunizados con diferentes concentraciones de péptidos y posteriormente retados con diversas DL<sub>50</sub> de S. typhi viva.

## 8.0 C O N C L U S I O N E S

Empleando los métodos descritos a lo largo del presente trabajo, fue posible obtener y separar los péptidos de las porinas, OmpC y OmpF, de S. typhi 9,12,Vib, producidos por digestión con BrcN, los cuales tenían pesos moleculares de 29, 19, 16, 9, 9, 8 y 6 kDa y eran producidos por una digestión parcial que, sin embargo, fué reproducible bajo las condiciones de reacción empleadas. La pureza de los peptidos quedo demostrada por el iso-electroenfoque, siguiendo el metodo de las inobilinas.

La separación de los péptidos resultó ser más adecuada empleando SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia, que usando cromatografía por de exclusión molecular, debido a que ésta última no es adecuada para separar mezclas tan complejas y de compuestos tan similares, como la mezcla de peptidos resultante de la digestión.

Por medio de la activación de esplenocitos se determinó que es el péptido de 16 kDa el que induce la mayor respuesta celular, y a través de la inmunoelectrotransferencia que el péptido de 29 kDa es el que se reconoce por el anticuerpo monoclonal 8F6 (IgM) producido contra porinas de S. typhi. Estos resultados demuestran que los péptidos son buenos candidatos como componentes de vacunas contra la fiebre tifoidea, ya que presentan una inmunogenicidad incluso mayor que las porinas.

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abou-Zeid, C.; Filley, E.; Steele, J. y Rook, G.A.W. 1987. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blotts into antigen-bearing particles. *Journal of Immunological methods*, 98: 5-10.
- 2.- Acharya, I.L.; Lowe, C.L.; Thapa, R.; Gurubacharya, V.L.; Shrestha, M.B.; Bact, D.; Cadoz, M.; Schulz, D.; Armand, J.; Bryla, D.A.; Trollfors, B.; Cramton, T.; Schneerson, R. and Robbins, R.B. 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of Salmonella typhi. A preliminary report. *N.Engl.J.Med.* 317:1101-1104.
- 3.- Anderson, E.S. 1966. Proposal use of a non-motile variant of Salmonella typhi for the preparation of vaccine against typhoid fever. *Symposium Series in Immunobiological Standardization*. 15:79-86.
- 4.- Anuario estadístico 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S. 1988.
- 5.- Bonavida, B.; Miller, A. y Sercartz, E. 1969. Structural basis for immune recognition of lysozymes. I. Effect of cyanogen bromide on Hen Egg-white lysozyme. *Biochemistry*, vol 8, num. 3:968-979.
- 6.- Bragg, P.D. and Hov, C. 1972. Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of Escherichia coli. *Biochem.Biophys.Acta.* 274:478-488.
- 7.- Chai, T. and Fould, J. 1974. Demonstration of missing outer membrane protein in tolG mutante in Escherichia coli. *J.Mol.Biol.* 85:465-474.
- 8.- Cryz, S.J. y Fürer, E. 1986. Further characterization of the Salmonella typhi Ty21a vaccine strain [letter]. *J. Infect. Dis.* 156(6): 1,276-79.
- 9.- Cvjetanovic, B. and Vemun, K. 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. *Bull WHO.* 32:29-36.
- 10.- Datta, D.B.; Arden, B. and Henning, U. 1977. Major protein of the Escherichia coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J.Bacteriol.* 128:821-829.
- 11.- Davies, V. D., Dulbeco, R., Elsen, H. L. y cols. 1983. *Tratado de microbiología*. 2a. ed. Salvat Editores, Barcelona España. pp. 119-123.
- 12.- Di Rienzo, J.M.; Nakamura, K. and Inouye, M. 1978. The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. *Annu.Rev.Biochem.* 47:481-532.
- 13.- Eisenstein, T.K. 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in ribosomal vaccines prepared from Salmonella typhimurium. *Infect.Immun.* 12:364-377.
- 14.- Ferrrecio, C.; Levine, M.M.; Rodriguez, H.; Contreras, R. 1989.

- Comparative efficacy of two, three or four doses of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric coated capsules: a field trial in a endemic area. *J. Infect. Dis.*; 159(4) : 766-9.
15. Fisher, L. 1975. *Introducción a la cromatografía en gel*. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1a. ed. México. pp. 43-50, 57-87.
  16. Forrest, B.D.; LaBrooy, J.T.; Altridge, S.R.; Boehm, G.; Beyer, L.; Morona, R.; Shearman, D.J. and Rowlay, D. 1989. Immunogenicity of a candidate live oral typhoid/cholera hybrid vaccine in humans [letter] *J. Infect. Dis.* Jan, 159(1):145-6.
  17. Forrest, B.D. 1988. Identification of an intestinal, immune response using peripheral blood lymphocytes. *Lancet*. Jan 16: i (8,577): 81-83.
  18. Frasch, C.E. and Robbins, J.D. 1978. Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. *J. Exp. Med.* 147:629-644.
  19. Germanier, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. *Boletín de la oficina sanitaria Panamericana*. 82:300-311.
  20. Germanier, R. 1984. Typhoid fever. En *Bacterial Vaccines*. Ed. Germanier R. Academic Press. pp. 137-165.
  21. Germanier, R. 1986. The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results. *Selavo International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity*. Siena, Italy. pp. 10-12.
  22. Germanier, R. and Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *Salmonella typhi* gal E mutant Ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 131:553-558.
  23. Ghose, A.C. y Karush, F. 1988. Induction of polyclonal and monoclonal antibody responses to cholera toxin by the syntetic peptide approach. *Molecular Immunology*, vol 25, núm. 3:223-230.
  24. Hejfec, L.B. et al. 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull WHO*. 30:321-339.
  25. High resolution analytical electrofocusing in polyacrylamide gels with Immobiline pH gradients. LKB. Bromma Application Note 324. (Manual de uso).
  26. Hornick, R.B.; Dupont, H.L.; Dawkins, A.T.; Snyder, M.J. and Woodward, T.E. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. *Symposia Series in Immunobiological Standardization*. 15:143-150.
  27. Hornick, R.B.; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; DuPont, H.L.; Dawkins, A.T. and Snyder, M.J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. *N. Engl. J. Med.* 283:686-691.
  28. Huckstep, R.L. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed. E. y S. Livingston, L.T.D., London. pp. 4-9.
  29. Inouye, M. and Yee, M.L. 1973. Homogeneity of envelope proteins of *Escherichia coli* separated by gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 113:304-312.
  30. Isibasi, A. y cols. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infection and Immunity*, vol 56, núm. 11: 2953-2959.
  31. Isibasi, A.; Ortiz, V.; Moreno, J.; Paniagua, J.; Vargas, M.; González, C. y Kumate, J. 1988. The role of outer membrane protein from Gram-negative bacteria as vaccine with special

- emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against Salmonella typhi porins. Cell function and disease. Ed. L. Todd, J. Jaz and L. Parker. Plenum, New York.
32. Jawetz, E. y cols. 1989. Microbiología médica. El Manual Moderno, S.A. 10a. ed. México. pp. 244-324.
  33. Johnson, W. 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from Salmonella typhimurium and Yersinia pestis. Infect. Immun. 5:947-952.
  34. Joklik, W.K.; Willett, H. y Amos, B. 1987. Zinsser Microbiología. Ed. Médica Panamericana. 18a. ed. Argentina. pp. 715-716.
  35. Jones, K.F. y Fischetti, A. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group 'a' M6 streptococci. J. Exp. Med. vol 167: 1114-1123.
  36. Karkhanis, T.D.; Zelther, J.V.; Jackson, J.J. and Carlo, D.C. 1978. A new improved microassay to determine 2-ceto 3-deoxy octonate in lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. Anal. Biochem. 85:526-601.
  37. Kauffman, F. Clasificación de bacterias. 1st. edition, Munksgaard, dinamarca.
  38. Kilgus, J. et al. 1989. Vaccine T-cell epitope selection by a peptide competition assay. Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 86: 1629-1633.
  39. Kumate, J. 1979. Inmunidad, inmunización y vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp. 227-247.
  40. Kumate, J. 1980. Tifoidea. En Kumate, J. y Gutiérrez G. Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
  41. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H. and Makela, P.H. 1982. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. Infect. Immun. 34:328-332.
  42. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H.; Valtonen, M. and Makela, P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25:857-862.
  43. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
  44. Lemmet. Manual de Microbiología Clínica. Editorial panamericana. 1982; 3º: 251.
  45. Lehninger, A. 1982. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, S.A. 2a. ed. España. pp. 108-109.
  46. Levine, M.M.; DuPont, H.L.; Hornick, R.B.; Snyder, M.S.; Woodward, W.; Gilman, H.R. and Libonatti, J.P. 1976. Attenuated, streptomycin dependent Salmonella typhi oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. J. Infect. Dis. 133:424-429.
  47. Levine, M.M. y Ferrecio, C. 1988. Typhoid vaccines [letter] Lancet. Jan. 23; 1 (8578): 173.
  48. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
  49. Lugtenberg, B. and Van Alphen, L. 1983. Molecular architecture

- and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other Gram-negative bacteria. Biochem. Biophys. Acta. 737:51-115.
50. Mates, A. and Yosipovici, H. 1976. Localization of the protective antigens in Salmonella typhimurium. Microbios. 16:81-90.
  51. Misfeldt, M.L. and Johnson, W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 17:98-104.
  52. Misfeldt, M.L. and Johnson, W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 24:808-816.
  53. Miura, T. and Mizushima, S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of Escherichia coli K-12. Biochim. Biophys. Acta. 150:159-161.
  54. Mizuno, T.; Chou, M.Y. e Inouye, M. 1983. Comparative study on the genes for three porins of the Escherichia coli membrane-sequence of the osmoregulated ompC Gene. J. Biol. Chem. 258: 6932-6940.
  55. Mohands, V.; Cherium, T.; Sridharan, G.; Simoes, E.A.; Pereira, S.M. y John, J.T. 1989. Immune response of infants and preschool children to typhoid vaccine given intradermally or subcutaneously. BMJ. Jan. 21; 298 (6667).
  56. Molinari, J.L. y Cabrera, R. 1974. Inmunidad inducida con una preparacion ribosomal obtenida de Salmonella typhi Ty2. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16:199-204.
  57. Molinari, J.L. and Larralde, C. 1974. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of Salmonella typhimurium. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16:189-197.
  58. Natarajan, M. y cols. 1985. Role of outer membrane proteins in immunity against murine salmonellosis. Antibody response to crude outer membrane proteins of Salmonella typhimurium comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. Vol. 8 No. 1; 9-16.
  59. Neidhardt, F y cols. 1987. Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology. American Society for microbiology. 1a. ed. pp. 10-18.
  60. Nikaido, H. y Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological reviews. vol. 49, num. 1; 1-32.
  61. Osborn, M.J.; Gander, J.E.; Parisi, E. and Carson, J. 1972. Mechanism and assembly of outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247: 3962-3972.
  62. Osborn, M.J. and Wu, H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34:369-422.
  63. Pérez, M. A. y Cabrera, R. 1974; Medidas preventivas enpleadas en la infeccion tifoidicas. Rev. Salud pública de México. XV: 185-194.
  64. Pfeiffer, R.; Kolle, W. 1896. Ueber die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbazillen. Z. Hyg. Infektkr. 21:202.
  65. Pittman, M. and Bohner, H.J. 1966. Laboratory assays of different types of field trial typhoid vaccines and relationship to efficacy in man. J. Bacteriol. 91:1713-1723.
  66. Polish Typhoid Committee. 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull. WHO. 32:15-27.



67. Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent Salmonella typhosa. J.Infect.Dis. 117:101-107.
68. Robbins, J.D. and Robbins, J.B. 1964. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of Salmonella typhi. J.Infect.Dis. 150:436-449.
69. Rosenbusch, J.P. 1974. Characterization of the major envelope protein from Escherichia coli. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecylsulfate binding. J. Biol. Chem. 249: 8019-8029.
70. Ruedim H, y cols. 1987. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 84: 6970-6974.
71. Schnaitman, C.A. 1971. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of Escherichia coli. J.Bacteriol. 108:553-563.
72. Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli by polyacrilamida electrophoresis. J.Bacteriol. 104:862-869.
73. Schnaitman, C.A. 1974. Outer membrane proteins of Escherichia coli O III outer membrane consist of four distinct polypeptide species. J.Bacteriol. 118:442-453.
74. Schmitges, C.J. and Henning, U. 1976. The major proteins the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Heterogeneity of protein I. Eur. J. Biochem. 63:47-52.
75. Schweizer, M. and Henning, U. 1977. Action of major outer cell envelope membrane protein in conjugation of Escherichia coli K 12. J.Bacteriol. 129:1651-1652.
76. Smith, R.A. and Bigly, N.J. 1972. Ribonucleic acid protein fractions of virulent Salmonella typhimurium as protective immunogens. Infect. Immun. 6:373-383.
77. Teerlink, T.; Versantvoort, H. y Beuvery, E.C. 1987. Antigenic and immunogenic properties of cyanogen bromide peptides from gonococcal outer membrane protein IB. J. Exp. Med. vol. 166: 63-76.
78. Titani, K. y cols. 1972. Amino acid sequence of thermolysin. Isolation and characterization of the fragments obtained by cleavage with Cyanogen Bromide. Biochemistry, vol. 11, nóm. 13: 2427-2435.
79. Tully, J.G.; Gaines, S. and Tigertt, W.D. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. J.Infect.Dis. 112:118-124.
80. Typhoid Panel, U.K. Department of technical cooperation. 1964. A controlled field trial of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Guiana. 30:631-634.
81. Udhayakumar, V. y Muthukkaruppan, U. 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of Salmonella typhimurium in mice. Infection and immunity, vol. 55, nóm. 3: 816-821.
82. Uemura, J. y Mizushima, S. 1975. Isolation of outer membrane proteins of Escherichia coli and their characterization on polyacrilamide gel. Biochemica et Biophysica Acta, 413:163-176.
83. Venneman, M.R.; Brigley, N.J. and Berry, L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from Salmonella

- typhimurium. Infect.Immun. 1:574-582.
- 84.- Wahdan,M.H.; Serie,C.; Cerisier,Y; Sallam,S. and Germanier,R. 1982. Controlled field trial of live Salmonella typhi strain Ty 2ta a oral vaccine against typhoid: Three years results. J.Infect.Dis. 145:292-293.
- 85.- Warren,J.W. and Hornick,R.B. 1979. Immunization against typhoid fever. Ann.Rev.Med. 30:457-472.
86. Westphal,B. and Jann,K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides extractions with phenol-water and further applications of the procedure. Methods.Carbohydr.Chem. 5:83-91.
87. Yugoslav Typhoid Commission. 1964. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. Bull WHO. 30:623-630.