

45
2ej-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
(FES-Z)

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA
DE LA PORINA OmpC RECOMBINANTE DE
Salmonella typhi

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ARACELI ELVIRA SANTIAGO MACHUCA



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 1992



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.

(I)

INDICE.

Resumen.

1.-	Introducción	1
1.1.	Generalidades de la respuesta inmunológica	1
1.2	Fiebre tifoidea	3
1.2.1	Historia	3
1.2.2	Generalidades	4
1.2.3	<u>Salmonella typhi</u> 9,12,d,Vi	4
1.2.4	Diagnóstico	7
1.2.5	Respuesta inmune	8
1.3	Vacunas contra <u>Salmonella typhi</u>	9
1.4	Proteínas de la membrana externa	11
1.4.1	Generalidades	11
1.4.2	Clasificación	12
1.4.3	Porinas	14
1.5	Antecedentes de investigación en México, sobre proteínas de membrana externa de <u>Salmonella typhi</u> 9,12,d,Vi	16
1.6	Porina OmpC recombinante	18
2.-	Fundamentación del tema	20
3.-	Planteamiento del problema	22

(II)

4.-	Modelo experimental	23
5.-	Objetivos	24
6.-	Hipótesis	25
7.-	Materiales y Métodos	26
7.1	Animales de experimentación	26
7.2	Esquemas de inmunización	26
7.3	Dosis letal media (DL_{50})	27
7.4	Caracterización de las cepas bacterianas	30
7.5	Cultivo y cosecha de bacterias	31
7.6	Aislamiento de las proteínas de la membrana externa	31
7.7	Obtención de las porinas	32
7.8	Purificación de las porinas por cromatografía de exclusión molecular	33
7.9	Electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio	34
7.10	Cuantificación de las proteínas	35
8.-	Resultados	36

(III)

8.1	Caracterización de <u>Salmonella typhi</u> 9,12,d,Vi	36
8.2	Caracterización de <u>Escherichia coli</u> UH302/pST13	37
8.3	Obtención de las proteínas de la membrana externa de <u>Escherichia coli</u> UH302/pST13	37
8.4	Obtención y purificación de la porina recombinante OmpC	40
8.5	Caracterización de la porina OmpC	42
8.6	Cuantificación de las proteínas por el método de Lowry	44
8.7	Determinación de la DL_{50}	46
8.8	Evaluación de la actividad protectora (cinética de sobrevivencia)	49
9.-	Discusión	52
10.-	Conclusiones	54
	Propuestas y/o recomendaciones	55
	Anexo	59
	Apéndice	60
11.-	Bibliografía	64

(IV)

PRINCIPALES ABREVIATURAS.

DL ₅₀	Dosis letal media.
KDa	Kilodaltones.
LPS	Lipopolisacárido.
nm	nanómetros.
PME	Proteínas de membrana externa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
BHI	Infusión de cerebro y corazón (por sus siglas en inglés)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
SSI	Solución salina isotónica.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
APS	Persulfato de amonio.
i.p	intraperitoneal.
TEMED	N, N ,N',N'-tetrametil etilén diamino.
UFC	Unidades formadoras de colonias
T _h	Linfocitos T inductores o cooperadores.
T _c	Linfocitos T citotóxicos.
ASB	Albúmina sérica bovina.

(V)

INDICE DE GRAFICAS.

Gráfica 1.- Elución a través de una columna de Sephacryl S-200 de la porina recombinante de Salmonella typhi, obtenida a partir de Escherichia coli UH302/pST13.

Gráfica 2.- Curva estándar empleada en la cuantificación de las porinas por el método de Lowry.

Gráfica 3.- Determinación de la DI_{50} , de Salmonella typhi en ratones hembras C_3H/Fej de 16-18 g.

Gráfica 4.- Determinación de la DI_{50} , de Salmonella typhi en ratones hembras BALB/c de 16-18 g.

Gráfica 5.- Evaluación de la actividad protectora de la porina OmpC recombinante en la cepa C_3H/Fej contra el reto de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Gráfica 6.- Evaluación de la actividad protectora de la porina OmpC recombinante en la cepa BALB/c contra el reto de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

(VI)

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Estructura antigénica de las bacterias gram-negativas.

Figura 2.- Organización de las proteínas de la membrana externa.

Figura 3.- Conformación tridimensional de las porinas.

Figura 4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas de la membrana externa de Escherichia coli UH302/pST13.

Figura 5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para la porina OmpC recombinante obtenida de Escherichia coli UH302/pST13 y para las porinas obtenidas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

(VII)

RESUMEN.

La porina OmpC recombinante se obtuvo a partir de Escherichia coli UH302/pST13 que contenía el gen ompC de Salmonella typhi Ty2.

Esta porina se purificó por el método de Nikaido (36) y se verificó el grado de pureza por electroforesis.

Se encontró que la DL_{50} de Salmonella typhi 9,12,,d,Vi fue, para BALB/c de 6×10^5 bacterias/ml y para C_3H/Fej , de $1,5 \times 10^6$ bacterias/ml.

La actividad protectora de la porina recombinante OmpC se evaluó empleando un modelo murino.

Cuando los ratones fueron inmunizados con $10 \mu g$ de la porina recombinante, se obtuvo una protección de 20% en la cepa C_3H/Fej , contra el reto con 500 DL_{50} .

Cuando se inmunizaron con $5 \mu g$ de la porina recombinante, no hubo protección contra el reto de 500 DL_{50} . Se usó como testigo un lote inmunizado con $10 \mu g$ de porinas obtenidas a partir de Salmonella typhi 9,12,d,Vi. La protección fue del 100% contra el reto con 500 DL_{50} .

La actividad protectora también se evaluó para la cepa BALB/c, la cual se inmunizó con $10 \mu g$ y $5 \mu g$ de la porina OmpC recombinante, posteriormente se retó con 500 DL_{50} , los resultados mostraron una protección de 10.5% y 5% respectivamente. Se trabajó a la par un testigo inmunizado con porinas obtenidas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi con el cual se obtuvo una protección del 100%.

1.-INTRODUCCION.

1.1 Generalidades de la respuesta inmunológica.

El sistema inmunológico está constituido por una gran variedad de estirpes celulares articuladas en una red de interacciones que permiten, diferenciar lo propio y lo ajeno (14).

Al entrar el antígeno al organismo se inicia la respuesta inmunológica con la fagocitosis de éste por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (CPA), digieren las fracciones proteicas a péptidos (5) y los expresan en su membrana en unión a glicoproteínas codificadas por el sistema principal de histocompatibilidad. El macrófago procesa los antígenos protéicos por dos vías diferentes:

- a) Endógena; Preferentemente relacionada con los antígenos virales, los péptidos antigénicos se expresan en moléculas de histocompatibilidad de clase I (56).
- b) Exógena; Comprende aquellos antígenos que se captan mediante la fagocitosis, los péptidos se expresan en moléculas de clase II (56).

Esta primera fase, llamada de procesamiento y presentación de antígeno, es esencial para activar a los linfocitos T inductores. Los linfocitos T inductores o cooperadores T_h ($CD4^+$) reconocen al antígeno unido a moléculas de histocompatibilidad de clase II. Una vez activados los T_h , proliferan y producen diversos mediadores solubles como las linfoquinas que conducen a la fase efectora de la respuesta inmunológica. Algunas de estas linfoquinas son; el

interferón gamma y las Interleucinas 2, 4, 5 y 6.

Los linfocitos T citotóxicos (CD8'), juegan un papel muy importante en la respuesta inmune celular, éstos a diferencia de los linfocitos T inductores, reconocen antígenos en el contexto de moléculas de clase I.

Los T_c al activarse secretan linfocinas, como interleucina 2 y el interferón gamma y tienen actividad lítica contra células infectadas principalmente por virus y células tumorales (34).

La fase efectora de la respuesta inmune la podemos clasificar en dos grandes ramas;

- a) La humoral; donde la actividad biológica depende de los anticuerpos y el complemento.
- b) La celular; donde se involucran eventos de hipersensibilidad retardada y citotoxicidad mediada por células.

Existen otros mecanismos efectores no específicos muy importantes que dependen de los macrófagos, por ejemplo la fagocitosis y liberación al medio de productos biológicamente activos como la interleucina 1, factor de necrosis tumoral y algunos componentes del complemento.

La comunicación de todos los elementos mencionados conforman el concierto inmunológico el cual se establece a través de la liberación de mediadores solubles y del contacto íntimo celular.

1.2 Fiebre tifoidea.

1.2.1 Historia.

La primera reseña de la fiebre tifoidea se atribuye a Thomas Willis, quien en 1659 describió el cuadro clínico.

Sin embargo, durante muchos años se confundió con el tifo, y no fué sino hasta 1782, cuando Ruxham diferenció ambas entidades clínicas como la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo) (17). Posteriormente en 1837, Gerhard, estableció las bases del diagnóstico diferencial entre ambas enfermedades.

Jenner en 1850, analizó las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos, y puntualizó que eran específicos para la fiebre tifoidea (46).

William Budd, en 1856, determinó que la fiebre tifoidea se transmite a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas con materia fecal proveniente de individuos enfermos (18).

Eberth en 1880, logró aislar al bacilo tifoídico de ganglios linfáticos mesentéricos e hígado de pacientes con fiebre tifoidea, y posteriormente en 1885, Pfeiffer, lo aisló a partir de heces de pacientes enfermos (18).

Widal en 1895 describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (46).

1.2.2 Generalidades.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión masiva de Salmonella typhi.

El cuadro clínico se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal, que frecuentemente se presentan con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen hemorragia intestinal en el 2 al 8% de los casos y la perforación que se presenta en el 3 al 4%. La tasa de letalidad es alrededor del 1%, sin embargo, en los casos complicados puede ascender hasta el 30% (26). No existen reservorios animales, siendo el hombre el elemento más importante en la cadena de transmisión de la enfermedad.

1.2.3 Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tribu Salmonellae y especie typhi.

De acuerdo con la clasificación de Kauffman-White (8), Salmonella typhi pertenece al grupo D y comparte los antígenos somáticos 9 y 12. Los flagelos contienen el antígeno "d", y en la cápsula se encuentra el antígeno capsular "Vi", formado de un homopolímero lineal de ácido alfa-1,4,2-desoxi-2-N-acetilgalacturónico, que se ha relacionado con la virulencia de

la bacteria. La nomenclatura 9,12,d,Vi denota a Salmonella typhi en forma abreviada (figura 1).

Salmonella typhi es una bacteria intracelular, Gram negativa, móvil, mide 2 a 3 μm de longitud por 0.6 μm de ancho, citofílica, anaerobia facultativa, fermenta la glucosa con producción de ácido, no metaboliza la lactosa ni la sacarosa.

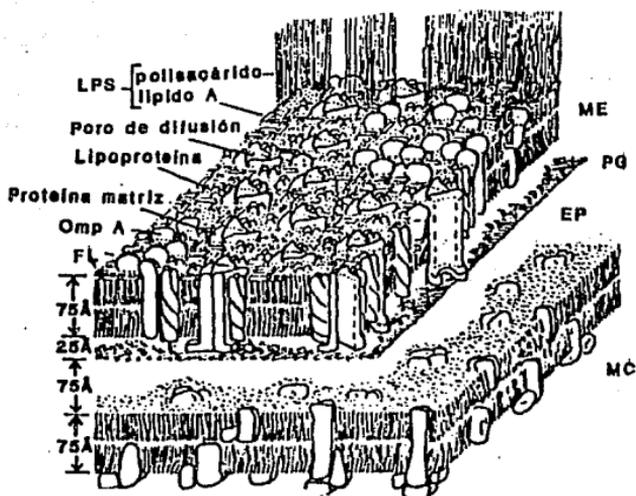


Figura 1.- Estructura antigénica de las bacterias Gram-negativas. Abreviaturas: FL, fosfolípidos; ME membrana externa; PG peptidoglicano; EP espacio periplásmico; MC membrana citoplasmática; LPS lipopolisacárido (Tomado de 9).

1.2.4 Diagnóstico.

El cultivo de Salmonella typhi a partir de la sangre ha sido considerado como la prueba definitiva para el diagnóstico; el aislamiento a partir de las heces, de la orina o de la bilis son pruebas menos convincentes (26).

Hemocultivo: La sangre del enfermo cultivada en el medio doble de Ruiz-Castañeda permite el aislamiento del germen en más de 80% de los casos si la sangre se extrae durante una elevación febril.

Coprocultivo. Es positivo desde el final de la primera semana en la enfermedad natural y en las inoculaciones experimentales algunos sujetos comienzan a eliminar Salmonella typhi desde el primer día.

Mielocultivo: Ofrece las mayores oportunidades de éxito en el aislamiento de Salmonella typhi en el medio Mendoza y se logra más del 90% de resultados positivos.

Serología: La reacción de Widal tiene una sensibilidad de 80% y, sólo hace el diagnóstico; pero no sirve para el pronóstico o para guiar el tratamiento ni para predecir las recaídas o complicaciones.

Biometría hemática: Los hallazgos útiles son leucopenia (menos de 5,000 leucocitos/mm³), ausencia de eosinófilos, los niveles de hemoglobina tienden a ser bajos.

1.2.5 Respuesta inmune.

Salmonella typhi penetra al organismo a través de la boca, se multiplica en el intestino delgado, y penetra la membrana basal intestinal sin causar daño importante en los tejidos. Es fagocitada por macrófagos y transportada a los ganglios linfáticos regionales donde se multiplica activamente, dando una fase de bacteremia. Posteriormente se distribuye en el sistema fagocítico mononuclear, donde se reproduce y es liberada nuevamente al sistema circulatorio.

La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio, en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar (17).

Aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida, se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de endotoxina la cual induce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (18).

1.3 Vacunas contra Salmonella typhi.

En 1886 se realizó la primera inmunización experimental contra la infección por Salmonella typhi. Frankel y Simmons lograron proteger a conejos inyectándoles dosis de bacteria viva.

Posteriormente Klikovich demostró que los bacilos muertos son

capaces de inducir protección alentando a Wright en Inglaterra y Pfeiffer y Kölle en Alemania a utilizar, por primera vez (1887), vacunas inactivadas para la inmunización de humanos (26).

Así, la vacuna de Pfeiffer y Kölle, preparada en medio sólido, estaba constituida por bacteria fenolada inactivada por calor a 56°C (42).

En 1955, la Organización Mundial de la Salud (OMS), promovió la realización de estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, para determinar la eficacia de tres vacunas preparadas con células enteras de Salmonella typhi inactivadas con acetona, calor-fenol o alcohol. La vacuna inactivada con acetona (Vacuna K), confirió una mayor y más duradera protección. La vacuna inactivada con calor y fenol (Vacuna L), mostró eficacia intermedia y la inactivada con alcohol fue la menos efectiva (42).

Tully y col, en 1962, inmunizaron chimpancés con una cepa rugosa de Salmonella typhi, obteniendo elevados títulos de anticuerpos contra el antígeno "H", sin embargo no evitaron la infección con la bacteria.

En 1970 Wong, logró purificar el antígeno "Vi", sin desnaturalizarlo y demostró que era inmunogénico y seguro (42).

En 1975 Germanier y Furer desarrollaron la cepa de Salmonella typhi Ty21a (13), la cual protegió el 95% en ensayos clínicos. Esta cepa tiene una mutación en el gene galE que le causa una deficiencia en la enzima UDP-4-galactosa epimerasa. Sin embargo en estudios posteriores realizados en una población endémica de fiebre tifoidea en Chile, la vacuna mostró una protección apenas del 51 al

67% (13). Además se demostró por técnicas de mutación puntual que el daño no se encuentra únicamente en el gen galE.

Stocker en 1981, desarrolló las cepas de Salmonella typhi 541Ty y 543Ty, las cuales contienen mutaciones en aroA y purA. La mutación en el gen aroA genera dependencia por aminoácidos aromáticos, en tanto que al inactivar purA se genera un requerimiento por adenina. Sin embargo al evaluar su actividad protectora en ensayos clínicos, despertaron pobre respuesta inmune (6).

En 1984, Robbins y Robbins lograron preparar dos lotes de antígeno "Vi". Ambos resultaron ser buenos inmunógenos, sin embargo, uno de ellos generó reacciones adversas, debido a su contenido de lipopolisacárido contaminante (45). Actualmente está en vías de salir al comercio una vacuna hecha de este antígeno por los laboratorios Mérieux, en Francia.

En la actualidad se estudian las cepas CVD906 y CVD908 obtenidas por Levine y colaboradores derivadas de las cepas de Salmonella typhi ISP1820 y Ty2 respectivamente(6). La cepa CVD908 es una mutante aroC y aroD, altamente inmunogénica, que en ensayos clínicos genero altos títulos de anticuerpos IgG y IgA.

1.4 Proteínas de la membrana externa.

1.4.1 Generalidades.

Miuria y Mizushima, en 1968, obtuvieron por primera vez la membrana externa de Escherichia coli, empleando para ello esferoplastos preparados con lisozima y EDTA, los cuales fueron lisados osmóticamente, separando las membranas externas por gradiente de sacarosa (32).

Osborn, modificó la técnica con el fin de obtener las membranas externas con menor cantidad de lipopolisacárido (38).

Schnaitman (1971), obtuvo las membranas externas por un nuevo método, el cual consistía en el rompimiento de las bacterias en una prensa francesa, seguida de la posterior solubilización de la membrana interna con el detergente no-iónico tritón X-100 (48).

Schnaitman fué el primero en reportar que Escherichia coli contenía una proteína principal o mayor, la cual constituye el 70% de las proteínas totales de la membrana (49).

Schmitges y Henning describieron una proteína mayor, la cual electroforéticamente se podía separar en dos bandas (47). En la actualidad se sabe que el número de PME es variable y depende de la información genética de la bacteria y su expresión se puede afectar por condiciones de cultivo, temperatura, mutaciones, etc (27).

1.4.2 Clasificación.

Las proteínas se clasifican de acuerdo con su abundancia en la membrana en proteínas principales y proteínas menores (31,7).

Proteínas principales.

- Las proteínas matrices o porinas, que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana (36).
 - La proteína modificable por el calor (OmpA), actúa como receptor de fagos y colicinas (7).
 - La lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcionalidad de la membrana (9,51).
- La organización molecular de las proteínas mayores en la membrana de bacterias gram-negativas, ha llevado a investigar su eficacia como inmunógenos protectores (figura 2).

Proteínas menores.

Intervienen como acarreadores en el transporte activo de sustancias de alto peso molecular y que están relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana que tiene actividad de fosfolipasa A (9,37).

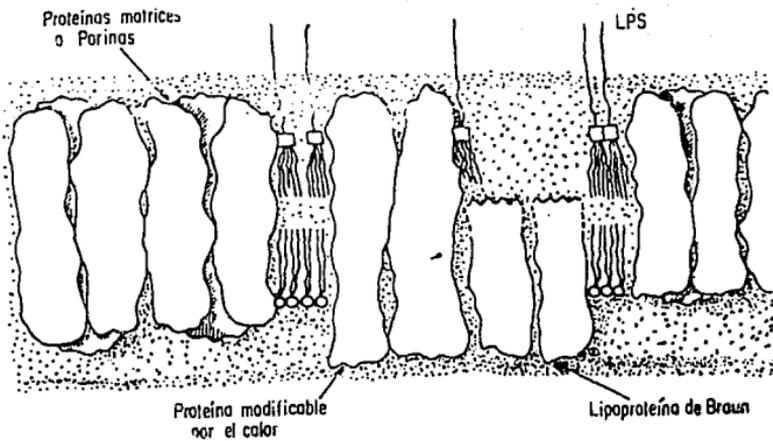


Figura 2. Organización de las proteínas en la membrana externa (Tomado de 27).

1.4.3 Porinas.

Las porinas son proteínas de membrana externa de peso molecular de 31000 a 48000 daltones, su composición de aminoácidos indican una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45%. Presentan un punto isoelectrico de 4.5 a 4.6 (35).

Reciben el nombre de porinas porque se arreglan en forma regular en la membrana externa formando trímeros, que forman poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecifica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa (fig 23)(22).

En Escherichia coli las porinas son codificadas por los genes ompC, ompF, y phoE. Estos genes son expresados en condiciones de baja osmolaridad, alta osmolaridad y baja concentración de fosfatos, respectivamente (33,54).

La proteína modificable por el calor está codificada en Escherichia coli por el gene ompA y probablemente se encuentra fuertemente asociada al lipopolisacárido (11,52). Los genes ompA de E. coli y S.typhimurium han sido aislados y secuenciados (3,12).

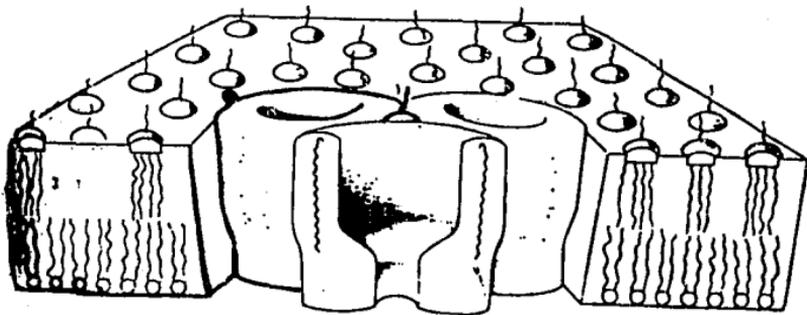


Figura 3. Conformación tridimensional de porinas. Modelo propuesto por Jap para la porina Pho E, en 1989 basado en estudio de cristalografía electrónica con una resolución de 18 \AA (Tomado de 22).

1.5 Antecedentes de Investigación en México.

En el Centro de Investigación Biomédica del D.F (División de Inmunoquímica), se pretende la obtención de una vacuna contra la fiebre tifoidea, que sea capaz de inducir protección de larga duración, de gran efectividad en una sola dosis y sin reacciones colaterales, y que su producción a gran escala sea rápida, segura y económica.

Los estudios realizados se han enfocado a evaluar la inmunidad protectora de las proteínas de membrana externa (PME) de Salmonella typhi, de las que se ha demostrado lo siguiente:

-Las PME de Salmonella typhi obtenidas con una contaminación del 4% de lipopolisacárido (LPS), protegen al reto con 1000 DL₅₀ de la bacteria homologa (19).

-Los anticuerpos anti-PME de Salmonella typhi desarrollados en conejo, protegen pasivamente al ratón contra el reto de la bacteria viva(19).

-Durante la fase de convalecencia, el suero de pacientes con fiebre tifoidea tienen anticuerpos de clase IgG dirigidos contra las porinas de Salmonella typhi (37,4).

-Las porinas de Salmonella typhi, protegen el 90% en el modelo murino cuando se inmunizan con 10µg y se retan con 100 DL₅₀ (20).

Las porinas de Salmonella typhi, protegen el 90% en el modelo murino cuando se inmunizan con 30µg y se retan con 500 DL₅₀ (20).

-Los Anticuerpos monoclonales anti-porinas protegen el 60% al reto de 20 DL₅₀ de Salmonella typhi y los anticuerpos monoclonales anti-LPS no tienen efecto protector (21,40).

-Se formuló una preparación de porinas de Salmonella typhi estéril con una concentración de 100µg/ml, se probó en un modelo murino y demostró ser segura y no pirogénica (39).

-Se midió la capacidad de las porinas Salmonella typhi de inducir activación de macrófagos de ratones C₃H/FeJ dependientes de linfocitos T *in vitro*. Se encontró que los macrófagos fueron capaces de eliminar aproximadamente el 50% de la bacteria intracelular infectante (40).

-Se obtuvo un conjugado porinas-toxoide tetánico con actividad protectora contra el reto de 1000 DL₅₀ de Salmonella typhi en la cepa C₃H/FeJ (21).

1.6 Porina Omp C recombinante.

En la actualidad se está tratando de obtener a las porinas por métodos de DNA recombinante para eliminar contaminantes como el LPS.

Haller y col (1975), obtuvieron cepas de Escherichia coli K12, mutantes de las proteínas principales de la membrana celular (16).

Inouye y col (1983), secuenciaron la región promotora del gen ompC en Escherichia coli (53).

Calva y col (1987), aislaron el gen que codifica para la porina OmpC y la clonaron en Escherichia coli HB101 y P678-54 (43).

Venegas y col (1988), clonaron en Escherichia coli, el gen que codifica para la expresión de una porina de 36 KDa de Salmonella typhi (58).

Vaara y col (1989), secuenciaron el gen ompH, reportado de Salmonella typhi, que codifica para la expresión de la proteína OmpH, de 16 KDa (24).

McGroarty y col (1990), obtuvieron la cepa RAM122 a partir de Escherichia coli K-12, la cual contiene una delección en la porina OmpC, de los aminoácidos 103 al 110 (57).

Cabello y col (1990), en el Departamento de Microbiología, New York Medical College, Valhalla, USA, obtuvieron el DNA de cepas de Salmonella typhi procedentes de Perú, México, Chile, India y Inglaterra, y compararon el genoma para la expresión de proteínas de la membrana externa (10). Y en 1978, caracterizaron y clonaron

la porina de 36 KDal OmpC de Salmonella typhi en Escherichia coli UH302. La clona recombinante fue identificada por su capacidad de dotar a Escherichia coli de la susceptibilidad a bacteriófagos porina específicos y por la aparición en la membrana de una nueva proteína a 36 KDal (1).

El plásmido pST13, se obtuvo a partir de Salmonella typhi Ty2, de la cual se extrajo el DNA y construyó un cósmido (1).

Posteriormente este cósmido se introdujo por transducción en Escherichia coli UH302.

La bacteria Escherichia coli UH302 fue obtenida a partir de la cepa P400, por selección sucesiva a los fagos Tulb, Tula y Tull (6).

Para determinar la presencia del cósmido recombinante, en Escherichia coli UH302, se seleccionó con el bacteriófago P221, el cual tiene como receptor en Salmonella typhi a la porina OmpC (1).

2.-FUNDAMENTACION DEL TEMA.

La fiebre tifoidea es uno de los principales problemas de salud en América Latina. Durante 1990, se presentaron aproximadamente 89,591 casos, que representan una incidencia de 20.8 casos/100,000 habitantes, que ha llegado a ser hasta de 150 casos/100,000 habitantes en Chile.

En México en 1989 se notificaron 16,852 casos que representan una tasa de 20 casos/100,000 habitantes y se registraron 692 muertes que representan una mortalidad de 0.82/100,000 habitantes (2).

El grupo de edad más afectado es de 15-44 años, que representa el 58.62% de los casos, lo cual equivale a más de 500,000 días laborables perdidos.

Las estrategias propuestas para el control epidemiológico de esta enfermedad incluyen, el mejoramiento de la infraestructura sanitaria, campañas de educación sanitaria a la población, control de portadores tifoídicos y desarrollo de vacunas profilácticas.

El mejoramiento de la infraestructura implica mucho tiempo y dificultad, sobre todo en países subdesarrollados, ya que para ello es necesario no sólo mejorar el nivel económico de la población sino también elevar su nivel de educación, siendo más viable el desarrollo de vacunas profilácticas.

El desarrollo de una vacuna consiste en una serie de pasos que comprende, la identificación del agente inmunogénico, identificación y caracterización de los antígenos protectores, evaluación del inmunógeno en animales, ensayos de respuesta inmunológica en humanos, y por último la evaluación y producción a nivel industrial.

La División de Inmunoquímica, se ha enfocado a estudiar las PME de Salmonella typhi. Durante el desarrollo de esta tesis se evaluó la actividad protectora de la porina OmpC recombinante, como posible agente inmunogénico para la obtención de una vacuna contra la fiebre tifoidea.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Por estudios anteriores se sabe que el complejo de porinas de Salmonella typhi obtenidas por Nikaido (36), tienen actividad inmunogénica, en el modelo murino.

Sin embargo no se ha evaluado la actividad protectora independiente de cada porina ya que no se cuenta con un método adecuado para la separación de las porinas a partir de Salmonella typhi.

El Dr. Cabello y colaboradores, obtuvieron la cepa Escherichia coli UH302/pST13, la cual tiene el gen que codifica para la expresión de la porina OmpC de Salmonella typhi, y la cual fue donada a la división de Inmunología para la obtención de esta proteína recombinante.

Se purificó la porina OmpC recombinante, por el método de Nikaido (36) y posteriormente se evaluó la actividad protectora de esta, en el modelo murino empleado C_H/Fej y BALB/c.

4.-MODELO EXPERIMENTAL.

Determinación de la DL_{50} de Salmonella typhi 9,12,d,Vi en ratones BALB/c y C₃H/Fej.

Caracterización, siembra y cosecha de Salmonella typhi 9,12,d,Vi y Escherichia coli UH302/pST13.

Obtención de proteínas de la membrana externa y porinas de Salmonella typhi y Escherichia coli UH302/pST13.

Purificación, caracterización y cuantificación de las porinas.

Inmunización de cepas murinas con porinas de Salmonella typhi y porina OmpC recombinante de Escherichia coli UH302/pST13.

Reto de cepas con 500 DL_{50} de la bacteria viva.

OBJETIVOS.**Objetivo general.**

-Aislar la porina recombinante OmpC y evaluar el papel que juega en la inducción de protección en un modelo murino contra el reto a Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Objetivos particulares.

-Purificar y caracterizar la porina recombinante OmpC de Salmonella typhi 9,12,d,Vi expresada en Escherichia coli UH302/pST13.

-Evaluar la capacidad de inducir protección activa de la porina recombinante OmpC en un modelo murino de fiebre tifoidea empleando como cepa de reto a Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

-Comparar la respuesta inmune que presentan dos cepas endogámicas de ratones con diferente capacidad para responder a porinas.

6.- HIPOTESIS.

Se sabe que dos de las porinas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi inducen protección en modelos murinos contra el reto de la bacteria homóloga, por lo tanto al inocular la porina OmpC recombinante de Salmonella typhi, ésta será capaz de inducir una respuesta protectora menor a la de las dos porinas de Salmonella typhi juntas en el mismo modelo murino.

7.- MATERIALES Y METODOS.

7.1 Animales de experimentación.

Se trabajó con ratones hembras de las cepas C₃H/Fej y BALB/c, de 11-13 g, para retos con 500 DL₅₀ de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Se trabajó con ratones hembras de las cepas C₃H/Fej y BALB/c, de 16-18 g, para determinación de la DL₅₀ de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Ambas cepas fueron mantenidas en el Instituto Nacional de Higiene de la SSA.

7.2 Esquemas de inmunización.

Para evaluar la capacidad de la porina recombinante de inducir inmunidad activa en el modelo experimental murino, se formaron grupos de 10 ratones de 11 a 13 g de peso.

Se inmunizaron y retaron por vía i.p de acuerdo con el siguiente esquema de trabajo:

Día de Inmunización.	Inmunización con porinas OmpC rec (µg).	
	Lote 1	Lote 2
0 -----	5	10
15 -----	5	10
25 Día de reto con 500 DL ₅₀ .		

* Cepa de reto; Salmonella typhi 9,12,d,Vi resuspendida en

mucina al 5% en solución salina.

Grupos testigo; Ratonés inmunizados con mucina al 5% en solución salina, solución salina isotónica y porinas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

El grado de protección se evaluó como la sobrevivencia a los 10 días del reto.

7.3 Dosis Letal Media (DL₅₀)

Se creció Salmonella typhi 9,12,d,Vi durante 16 hrs a 37°C en agar BHI, seguido de una resiembra en el mismo medio, las bacterias se cosecharon a las 8 hrs. de cultivo (fase de crecimiento logarítmico).

El cultivo bacteriano se ajustó a una concentración de 10⁹ bacterias/ml en solución salina isotónica (0.6 de D.O a 540 nm), a partir de esta suspensión se siguió el esquema de trabajo que se describe a continuación;

Suspensión de bacteria

(1x10⁹), D.O 0.59 a 540nm.

1ml susp.

+ 9ml SSI.

Diluciones seriadas
en Mucina (5% en SSI).

1x10⁸ 1ml susp. *

+ 9ml SSI***

** 1x10⁷1x10⁶1x10⁵1x10⁴1x10³1x10²1x10¹

Diluciones seriadas
en SSI.

1x10³ *1x10²---Dilución 1:2.1x10¹---Directa.

1 ml.

Conteo de UFC en

A.N***

* Se sigue el mismo esquema para las diluciones subsecuentes.

** Suspensiones empleadas para las inoculaciones.

*** SSI.- Solución salina isotónica.

A.N.- Agar nutritivo.

U.F.C.-Unidades formadoras de colonias.

A partir de la suspensión de bacteria en mucina (mucina gástrica de cerdo al 5% en solución salina estéril), se inocularon 0.5 ml, por vía intraperitoneal, a grupos de 10 ratones ♀, de 16-18g de las cepas C₃H/Fej y BALB/c.

Como grupo testigo se emplearon ratones inyectados con 0.5 ml de mucina al 5% en solución salina.

Se registró la sobrevivencia por 3 días a partir de la inoculación, posteriormente se determinó la DL₅₀ de acuerdo al método de Reed y Muench (44), según la siguiente fórmula:

$$\text{Log DL}_{50} = \text{Log dil} < 50\% - (\text{D.P}) \times \text{Log factor de dilución.}$$

En donde:

Log dil < 50% = Logaritmo de la dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

D.P= Distancia proporcional

$$\text{D.P} = \frac{50\% - <50\%}{$$

$$>50\% - <50\%}$$

En donde;

50% = Dilución de la concentración que mata al 50% de la población.

<50% = Dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

>50% = Dilución inmediata superior a la dilución que mata al 50% de la población.

7.4 Caracterización de las cepas bacterianas.

Se trabajó con Escherichia coli UH302/pST13 y Salmonella typhi 9,12,d,Vi. El aislamiento de las bacterias se realizó en los medios de cultivo BHI y MacConkey.

Para corroborar que se estaba trabajando con la bacteria de interés se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa y sacarosa, producción de H_2S , movilidad y descarboxilación de la ornitina y lisina para lo cual se emplearon los siguientes medios:

- Agar hierro y triple azúcar (TSI).
- Agar de hierro y lisina (LIA).
- Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Citrato de Simmons.

7.5 Cultivo y cosecha de la bacteria.

Escherichia coli UH302/pST13, se sembró en placas de agar BHI y se dejó crecer durante 24 horas, a 37°C, se tomó un inóculo el cual se depositó en un matraz de 500ml que contenían 250 ml de medio mínimo A.

Después de un tiempo de crecimiento de 18 horas a 37°C, se dividió cada inóculo en partes iguales y se agregaron a garrafones que contenían 1.5 lt de medio mínimo A, complementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa, los garrafones se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante 8 horas deteniendo el crecimiento logarítmico.

Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm/20 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge). Para obtener la pastilla bacteriana.

7.6 Aislamiento de proteínas de la membrana externa.

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo con el método de Schnaitman (50), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación a 180 watts (Lab Line Ultratrip Labsonic System sonicator) por periodos de 2 minutos en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.3.

Para eliminar bacterias enteras de la suspensión sonicada ésta se centrifugó a 7000 x g durante 15 min, del sobrenadante se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a 200 000 x g/45 minutos a 4°C (LB 80 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.), la cual se solubilizó con Tritón X-100 al 2% en Hepes 0.01 M pH 7.4. La fracción insoluble en tritón X-100 (membrana externa y peptidoglicana) se sedimentó por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas y para lograr la extracción de las PME se resuspendió en Tris-HCl pH 7.2 que contenía Tritón X-100 al 2% y 5 mM de EDTA, se incubó durante 10 min a 37°C y posteriormente se ultracentrifugó a 200 000 x g/45 min/37°C. Las PME se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron.

7.7 Obtención de porinas.

La pastilla bacteriana obtenida a partir de la cosecha se resuspendió en amortiguador de tris-HCl 0.1M pH 7.4 hasta obtener una densidad óptica de 1 a 660nm (espectrofotómetro Beckman DU-7), la bacteria colocada en un baño de hielo se rompió por ultrasonido por periodos de 1 minuto por 3 minutos de descanso (Lab-line-Ultratip Labsonic System), hasta obtener una densidad de 0.4 a 660 nm. El lisado así obtenido, se trató con DNasa y RNasa incubándose durante 30 min en un baño para disminuir la viscosidad y eliminar los ácidos nucleicos.

Se concentraron las membranas por Ultracentrifugación (Ultracentrifuge rotors All Beckman preparative) a 35000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se solubilizaron en Tris 0.1M, pH 7.7, SDS (dodecil sulfato de sodio) al 2%, se incubó a 32°C durante 30 minutos, posteriormente se Ultracentrifugó a 45000 rpm durante 30 minutos a 20°C y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente.

El sedimento de este segundo proceso, contenía peptidoglicana, de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella solubilizandolas con Tris 50 mM, NaCl 0.4M y 2-mercaptoetanol 0.05%, se incubó durante 2 horas a 37°C, y se ultracentrifugó a 20000 rpm durante 1 hora a 20°C obteniéndose en el sobrenadante la porina recombinante.

7.8 Purificación de porinas por cromatografía de exclusión molecular.

El sobrenadante obtenido con anterioridad se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm por 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co) con un flujo de 4ml/hr. Se recolectaron las fracciones, detectandose la presencia de proteínas a 280 nm. La cantidad de muestra colocada fué de 8 ml y, se recuperaron en un colector (LKB Instruments). La porina recombinante se dializó contra NaCl 0.1M. Para utilizar nuevamente la columna, se lavó con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel.

7.9 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El gel de poliacrilamida se corrió en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Midget Electrophoresis Unit LKB) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo con el método de Laemmli (28).

Se utilizó como amortiguador de muestra Tris 0.125M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, 2-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. El gel superior contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en Tris-HCl 0.5M pH 6.8. El gel separador contenía 11.2% acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en Tris-HCl 1.5M pH 8.8.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante 3 horas, empleando 15mA por placa y como amortiguador de corrimiento se utilizó Tris 0.025, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente, los geles se tñeron durante 30 minutos en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (227:46:227) (50). Se destñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (30:7:63) (50), hasta que el fondo del gel fue transparente.

7.10 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de la porina recombinante, se realizó de acuerdo al método de Lowry (29), empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Chem Co).

Se sugiere el rango de 10 a 250 μ g de proteína para establecer la curva.

8.- RESULTADOS.**8.1 Caracterización de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.**

Se caracterizaron las bacterias antes de emplearse y los resultados son los siguientes:

- Agar hierro y triple azúcar (TSI).
 - Fermentación de la lactosa (-)
 - Fermentación de la sacarosa (-)
 - Fermentación de la glucosa (+)
 - H₂S (+)

- Agar hierro y lisina (LIA).
 - Descarboxilación de la lisina (+)
 - H₂S (+)

- Citrato de Simmons (-)

- Medio MIO.
 - movilidad (+)
 - Producción de indol (-)
 - Descarboxilación de la ornitina (+)

8.2.- Caracterización de Escherichia coli UH302/pST13.

- Agar hierro y triple azúcar (TSI).
 - Fermentación de la lactosa (-)
 - Fermentación de la sacarosa (-)
 - Fermentación de la glucosa (+)
 - H₂S (-)

- Agar hierro y lisina (LIA).
 - Descarboxilación de la lisina (+)
 - H₂S (-)

- Citrato de Simmons (-)

- Medio MIO.
 - movilidad (+)
 - Producción de indol (+)
 - Descarboxilación de la ornitina (-)

8.3.- Obtención de las proteínas de la membrana externa de Escherichia coli UH302/pST13 .

Las proteínas de membrana externa se obtuvieron por el método señalado, se solubilizaron en amortiguador de fuerza iónica elevada y se corrieron en condiciones reductoras.

En el gel de poliacrilamida (figura 4), fué posible ver la banda de la proteína OmpC recombinante (carril 3), la cual se encuentra entre 36-40 KDal. Se colocaron proteínas de la membrana externa de otra variedad de Escherichia coli que no contiene el gen que codifica para la expresión de la porina OmpC, por lo tanto la banda correspondiente no aparece en el gel de poliacrilamida (carril 2). En el carril 1, se colocaron las proteínas de la membrana externa de Escherichia coli UH302/pST13, que contiene el gen para la expresión de la porina OmpC recombinante, la cual aparece como una marcada banda, a la misma altura que la de la porina OmpC recombinante de el carril 3.

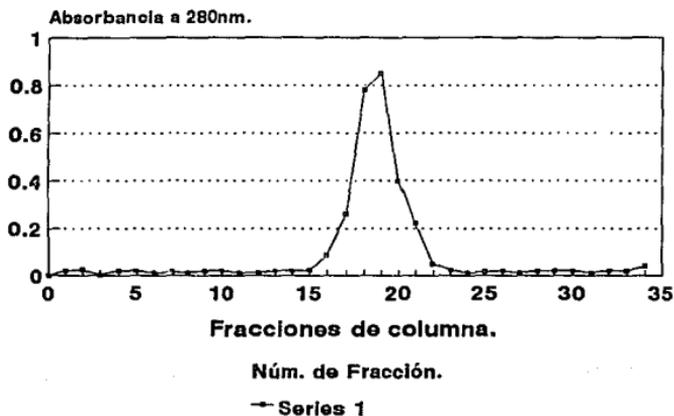


Figura 4. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para las proteínas de la membrana externa. En el gel se comparan membranas de *E. coli* UH302/pST13 (carril 1), con otra variedad de *E. coli* que no contiene el plásmido pST13, que codifica para la porina OmpC (carril 2) y en el carril 3 se muestra la porina OmpC recombinante obtenida por el método de Nikaido.

8.4.- Obtención y purificación de la porina recombinante OmpC.

Las porinas fueron purificadas, eluyendo en una columna de Sephacryl S-200. Donde se ve que a una absorbancia de 280 nm, en la fracción número 19 hay un pico máximo, el cual es debido a la presencia de las porinas (gráfica 1).

Elución de OmpC recombinante. Sephacryl S-200.



Porina de *E. coli* UH302/pST13.

Gráfica 1. Elución a través de columna de Sephacryl S-200 de porina OmpC recombinante, obtenida a partir de *Escherichia coli* UH302/pST13.

8.5.- Caracterización de la porina OmpC recombinante.

Se corrieron las porinas, de Escherichia coli UH302/pST13 en geles de poliacrilamida, donde se corroboró su identidad. Para Escherichia coli UH302/pST13, sólo se obtuvo una banda entre 36 y 40 KDa que corresponde a la porina OmpC (figura 5).

En el caso de Salmonella typhi 9,12,d,Vi se ven claramente dos bandas de porinas, no se sabe a que porina corresponde cada banda, sin embargo se sabe que una de las bandas corresponde a la porina OmpC.

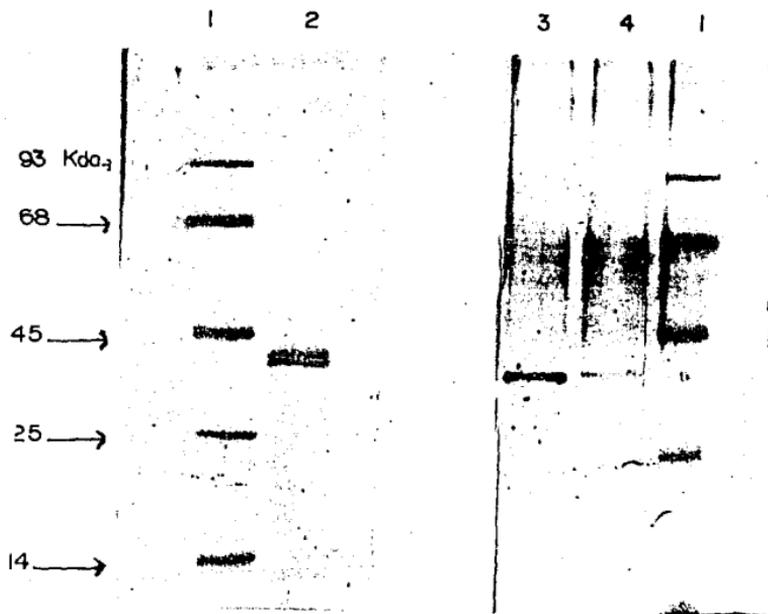
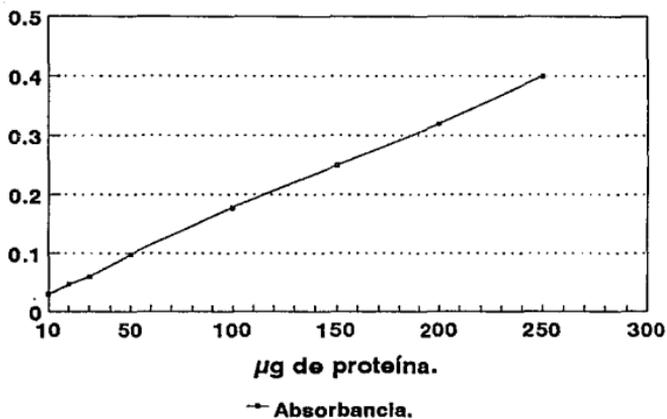


Figura 5. Corrimiento electroforético en condiciones reductoras de las porinas. En los carriles 3 y 4, se encuentra la porina OmpC recombinante, obtenida de Escherichia coli UH302/pST13 a diferente concentración y en el carril 2, las porinas obtenidas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi. En los carriles 1, se encuentran los marcadores de pesos moleculares que corresponden a: Fosforilasa b (93), Albúmina bovina (68Kd), Ovoalbúmina (45Kd), Anhidrasa carbónica (25Kd) y lisozima (14Kd).

8.6.- Cuantificación de las proteínas por el método de Lowry.

Se realizó una curva estandar con ABS (gráfica 2), donde se leyó la concentración de proteína que se encontraba presente en alícuotas de 10 μ l, obteniendo posteriormente el valor medio de la concentración que fué de 5.8 mg/ml de porina recombinante, y 1.0 mg/ml de porinas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Curva estandar de Lowry. Cuantificación de proteína.



Estandar:ABS.

Gráfica 2. Curva estandar empleada en la cuantificación de porinas por el método de Lowry.

8.7.- Determinación de DL_{50} .

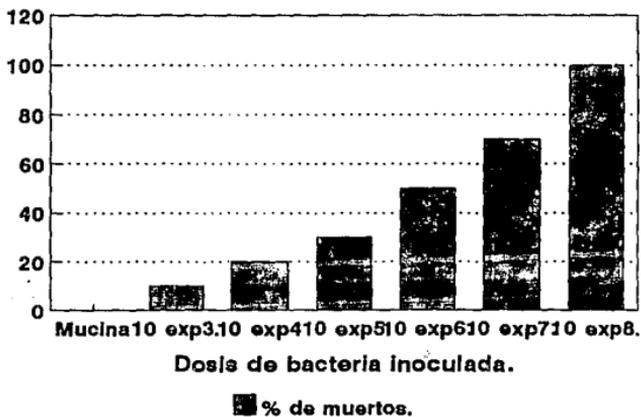
Se inocularon lotes de 10 ratones de la cepa BALB/c y C₃H/Fej, hembras de 16-18 gr, con las siguientes dosis de Salmonella typhi 9,12,d,Vi; 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 .

Los resultados se muestran en las gráficas 3 y 4, donde se observa que para C₃H/Fej a la dosis de 1×10^7 se ha muerto la mitad de la población, a diferencia de BALB/c que se observa que la dosis se encuentra entre 1×10^5 y 1×10^6 .

Posteriormente se determinó la DL_{50} empleando el modelo estadístico de Reed y Muench, la cual fué para BALB/c de 6×10^5 bacterias/ml y para C₃H/Fej fué de $1,5 \times 10^6$ bacterias/ml.

Dosis Letal Media.

Cepa C₃H/Fej.

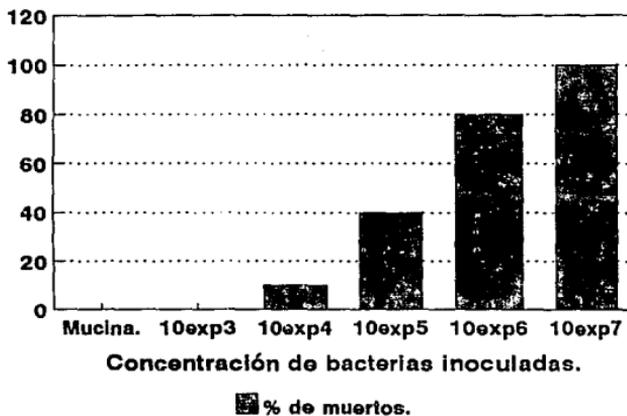


Ratones hembras de 10-18 g de peso.

Gráfica 3. Respuesta de cepa C₃H/Fej, a diferentes dosis de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

Dosis Letal Media.

Cepa BALB/c.



Ratones hembras de 16-18 g de peso.

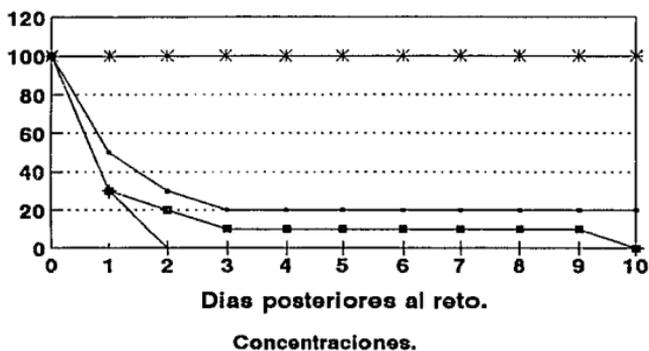
Gráfica 4. Respuesta de cepa BALB/c, a diferentes dosis de Salmonella typhi 9,12,d,Vi.

8.8.- Evaluación de la actividad protectora (cinética de sobrevivencia).

Se siguió el esquema de inmunización descrito en la metodología para ambas cepas, retando el día 25 con 500DL₅₀, posteriormente se registró la sobrevivencia por 10 días, los resultados se muestran en las gráficas 5 y 6.

Los resultados obtenidos mostrarán una protección de 20% en ratones C₃H/Fej, ante el reto de 500DL₅₀, cuando estos fueron inmunizados con 10 µg de porina recombinante OmpC. Cuando se inmunizaron con 5 µg no hubo protección ante el reto de 500DL₅₀. La actividad protectora para BALB/c inmunizados con 10 µg y 5 µg de porina recombinante, ante el reto de 500DL₅₀ fué de 10.5% y 5% respectivamente. Para ambas cepas se usó un lote testigo, el cual se inmunizó con 10µg de porinas obtenidas a partir de Salmonella typhi 9,12,d,Vi donde la protección fué del 100% ante el reto de 500DL₅₀.

Cinética de sobrevivencia. Cepa C3H/Fej.



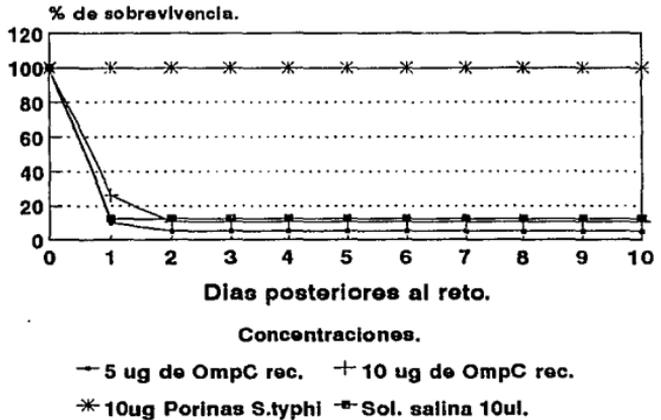
Concentraciones.
 ● 10 ug Omp C (roc). ■ 5 ug Omp C (rec).

* 10ug porinas S.typhi -■- Solución salina 10ul

Reto con 500 DL50 de S. typhi.

Gráfica 5. Evaluación de la actividad protectora (cinética de sobrevivencia), para la cepa C₃H/Fej.

Cinética de sobrevivencia Cepa BALB/c.



Reto con 500 DL50 de S. typhi.

Gráfica 6. Evaluación de la actividad protectora (cinética de sobrevivencia), para la cepa BALB/c.

9.- DISCUSION.

La fiebre tifoidea es un grave problema de salud pública en México y otros países del mundo. Para el control epidemiológico de esta enfermedad se han propuesto las siguientes alternativas;

- 1) Mejoramiento de la infraestructura sanitaria, saneamiento básico, vigilancia y control de portadores tifoídicos.
- 2) Desarrollo de vacunas profilácticas.

Para la profilaxis de la fiebre tifoidea en nuestro país, se cuenta con una vacuna reconocida oficialmente, la cual es elaborada con bacteria muerta por calor, la inmunidad es de corta duración y presenta efectos colaterales adversos debido a la presencia de LPS.

Tratando de solucionar esto en la actualidad muchas líneas de investigación científica están enfocadas a la generación de nuevas vacunas. El estudio de las PME de las bacterias Gram-negativas ha cobrado importancia, ya que se les considera elementos clave, por su naturaleza y localización, ya que inducen habitualmente la producción de anticuerpos de alta afinidad y que favorecen la respuesta celular.

En estudios realizados con anterioridad se ha reportado que las porinas de Salmonella typhi 9,12,d,Vi protegen el 100% ante el reto de 500DL₅₀, el inconveniente de estos ensayos fue que se trabajó con mezclas de cuando menos tres proteínas, todas con una alta homología molecular y por lo tanto difíciles de separar.

Empleando técnicas de biología molecular fue posible la obtención de la cepa de Escherichia coli UH302/pST13, la cual contiene el gen que codifica para la expresión de la proteína OmpC de Salmonella typhi 9,12,d,Vi. A partir de esta cepa se obtuvo la proteína recombinante por Nikaido (36) y posteriormente se realizaron ensayos de protección en las condiciones indicadas en la metodología y se observó que la porina OmpC recombinante no protegía en ambas cepas murinas, ante el reto de 500 DL₅₀ de la bacteria homóloga, a pesar de que se sabe que las porinas obtenidas a partir de Salmonella typhi protegen el 100% al mismo reto.

Los resultados nos llevan a pensar que la actividad protectora de las porinas de Salmonella typhi es debida al complejo de porinas con el LPS y que la actividad protectora no la confiere la porina OmpC por si sola.

Por todo lo señalado este trabajo debe considerarse como un ensayo introductorio en el estudio de la actividad protectora de las porinas de Salmonella typhi y buscar nuevos modelos experimentales que nos permitan obtener porinas puras y evaluar su actividad protectora, pretendiendo a futuro la obtención de un agente inmunogénico puros, para la elaboración de nuevas vacunas contra la fiebre tifoidea.

Durante la parte experimental se evaluó la resistencia a la bacteria viva en ambas cepas murinas, encontrandose para C₃H/Fej una dosis letal mas elevada que para la cepa BALB/c, bajo las mismas condiciones experimentales.

10.- CONCLUSIONES.

1.- La porina OmpC fue obtenida y caracterizada, bajo las condiciones reportadas en la metodología. Encontrándose una banda en aproximadamente 36 KDal, que corresponde a la porina OmpC.

2.- La porina OmpC no protege ante el reto de 500 DL₅₀, de la bacteria viva en ambas la cepa C₃H/Fej y BALB/c.

3.- La cepa C₃H/Fej, es mas resistente a la bacteria viva, que la cepa BALB/c, siendo para C₃H/Fej la DL₅₀ de $1,5 \times 10^5$ bacterias/ml y para BALB/c 6×10^5 bacterias/ml.

4.- La intensidad de la respuesta protectora de la porina OmpC en ambas cepas murinas es semejante. Siendo mayor en la cepa C₃H/Fej, que es de un 20%, y para BALB/c de 10.5%, cuando se inmunizó con 10µg de porina recombinante.

PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.

Entre los nuevos modelos experimentales a futuro, se propone;

- 1.- Unir el LPS a la porina OmpC recombinante, y evaluar su actividad protectora en modelos murinos. Esto nos permitirá analizar la respuesta inmune del complejo.
- 2.- Obtener por ingeniería genética, las porinas recombinantes respectivas de Omp A, Omp F y Pho E. Y evaluar su actividad protectora en modelos murinos. Esto permitirá determinar, si es la mezcla de las porinas o alguna de ellas independiente es la que confieren actividad protectora ante la infección por Salmonella typhi.
- 3.- Obtención de anticuerpos monoclonales, que permitan separar las porinas obtenidas por el método de Nikaido a partir de Salmonella typhi, y probar su actividad protectora de estas en un modelo murino.
- 4.- Evaluar la actividad protectora de la porina OmpC recombinante ante el reto de 50, 100, 200 DL₅₀.

ANEXO.**Preparación de medios.****-Agar Nutritivo.**

extracto de carne (BBL)	3.00 g
peptona (Difco)	5.00 g
agar (Bioxon)	15.0 g
agua destilada c.b.p	1 Lt.

Disolver y esterilizar a 15 Lb por 15 min.

-Infusión Cerebro y Corazón.

Infusión con cerebro de ternera (Difco)	200 g.
Infusión con corazón de Buey (Difco)	250 g.
Proteasa y peptona (Difco)	10 g.
Bacto-Dextrosa (Difco)	2 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Fosfato de sodio	2.5 g.
agua destilada c.b.p	1 Lt.

Disolver y esterilizar a 15 Lb por 15 min.

Preparación de soluciones.

-Amortiguador de fosfatos pH 7.4

cloruro de sodio (Merck)	8.7 g
fosfato ácido de potasio (Baker)	2.7 g
fosfato dibásico de sodio (Baker)	0.4 g
agua destilada	1 l.

-Tris 50 mM pH 8.0, SDS 0.2%.

tris (Sigma)	6.05 g/l
EDTA (Sigma)	1.86 g/l
SDS (Sigma)	2.00 g/l.

-Acrilamida.

Acrilamida (Biorad)	30.0 g
N,N-Bismetilén acrilamida (Biorad)	0.80 g

Aforar a 100 ml con agua destilada y desionizada, filtrar en papel Whatman 41 y mantener a 4 °C en frasco color ambar.

-Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris (Sigma) 18.15 g

Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.

-Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8.

Tris (Sigma). 6.00 g

Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml.

-Amortiguador de corrimiento electroforético.

Tris (Sigma) 3.00 g.

glicina (Sigma). 14.4 g.

SDS (Sigma) 1.00 g.

-Solución decolorante para azul de Coomassie.

Metanol (Merck) 50.0 ml.

ác. acético (Baker) 25.0 ml.

agua destilada. 925.0 ml.

-Solución colorante de Coomassie.

metanol al 50% (Merck)	454.0 ml.
ác. acético (Baker)	25.0 ml.
azul de Coomassie (Sigma)	1.20 g.

11.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aguero J, Mora G, Mroczzeroki-Wildey, M.E. Fernandez, Bero, L.F.C., Cabello 1987. Cloning expression and Characterization of the 36 KDa Salmonella typhi porin gene in Escherichia coli. Microbiol. Patogenesis. 1987. 3:399-407.
- 2.- Anuario Estadístico 1989. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación en Salud 1990.
- 3.- Beck E. and Bremer E. 1980. Nucleotide sequence of the gene ompA coding outer membrane protein II of Escherichia coli k-12. Nucleic Acids Research. 8:3011-3024.
- 4.- Blanco, F. Isibasi, A., Gonzalez, C.R, Ortiz, V. Paniagua, J. Arrequin, C y Kumate J. 1989. Human cell mediated Immunity porins from Salmonella typhi. Scand. J. Infectol. (in press).
- 5.- Chesunt R.W, Colon, S.M and Gery, H.M. 1982. Requirements for the processing of antigen-presenting B cell I, functional comparison of B cell tumor and macrophages. J. Immunol. 1219:2382-2388.
- 6.- Cole S.T, Sonntag I, Henning U. Cloning and opression in Escherichia coli K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes and Serratia marcescens. J. Bacteriol. 1982. 149:145-150.
- 7.- Datta D,B. Arden B y Henning U. 1977. Major protein of the Escherichia coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J. Bacteriol. 128:821-829.
- 8.- Davies, B.D. Dulbeco, R. Eisen, H.N, Gingberg H.S and Wood, W.B. 1983. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat. Editores. Barcelona España.
- 9.- Di Rienzo J.M., Nakamura K., Inouye M. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis assembly an functions. Ann Rev Biochem. 47:481-523.
- 10.- Faundez G. Aron L and Cabello F. Chromosomal DNA, Iron-Transport Systems, Outer membrane Proteins and Enterotoxin (Heat labile) Production in Salmonella typhi strains. J. Clin. Microb. 1990. 28:894-897.
- 11.- Ferro-Luzzi Ames G., Negri Spudich E. and Nikaído H. 1974. Protein composition of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Effect. of lipopolysaccharide mutations. J. Bacteriol. 117:406-416.
- 12.- Freudl R. and Cole S:T. 1983. Cloning and molecular Characterization of the ompA gene from Salmonella typhimurium. Eur. J. Biochem. 134:497-502.
- 13.- Germanier, R. Typhoid fever. In: Bacterial vaccines, Germanier R (ed). New York: Academic Press 1984. pp 137-165.
- 14.- González C.R. 1991. Respuesta proliferativa *in vitro* inducida por porinas de Salmonella en un modelo murino. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. UNAM. pp5-60.
- 15.- Gonzalez, C.R, Isibasi A, Ortiz, V, Blanco F., Moreno, J y Kumate J. 1989. Cell-mediated immune response to porins from Salmonella typhi in mice. 7th. International Congress of Immunology Berlin R.F.A.
- 16.- Haller, I., Henning U. Mutants of Escherichia coli K-12 lacking all "Major" Proteins of the outer cell envelope membrane. FEBS LETTERS. 1975. 55:161-164.

- 17.- Hornick, R.B, Greisman, S.E, Woodward, J.E, Dupont, H.L, Drawings, A.T and Sayder, W.J 1970. Typhoid Fever pathogenesis and immunological control. *N. Engl. J. Med.* 283:686-691.
- 18.- Hucksteps R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. E y S. Livinstong L.T.D. London pp 4-9.
- 19.- Isibasi, A. Ortiz, V, vargas, M. Paniagua J. Gonzalez, C. Moreno J y Kumate J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- 20.- Isibasi A. Ortiz V. Paniagua, J. Pelayo R. Mui., M. Gonzalez C.R. Garcia J.A y Kumate J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins vaccine (En prensa).
- 21.- Isibasi, A. Ortiz V, Paniagua J. Vargas M, Gonzalez C y Kumate J. 1988. The role of outer membrane proteins from Gram-negative as vaccine with special emphasis in typhoid fever Monoclonal antibodies against. *S. typhi* porins. En: Cañedo L. E. Todd L.E. Parcker L y Jaz Jaz Jeds. Cell function and disease, Plenum Press. My. USA pp 281-292.
- 22.- Jap, B.K 1989. Molecular design of Pho E porin and its functional consequences. *J. Mol. Biol.* 205:407-419.
- 23.- Johnson W. 1972. Ribosomal Vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fraction isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 5:947-952.
- 24.- Koshi P. Hirvas L and Vaara M. Complete sequence of the ompH gene encoding the 16 kDal cationic outer membrane protein of *Salmonella typhimurium* 1990. *Gene* 88:117-120.
- 25.- Kumate J. 1979. Inmunidad, Inmunización y Vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp 227-247.
- 26.- Kumate J. 1980. Fiebre tifoidea. En: Kumate J. Y Gutierrez G. Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
- 27.- Kussi N. Nurminen M y Saxen H. 1979. Immunization with outer membrane protein in experimental Salmonellosis in mice. *Immunol.* 25:863.
- 28.- Laemmli, U.K 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- 29.- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J. Farr A.L., y Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 30.- Makela P.H., Saxen H, Valtonen M. and Valtonen. V. 1988. *Salmonella* complement an mouse macrophages. *Immunol Lett.* 19:217-222.
- 31.- Mandrell, R.E y Zallinger, W.D. 1989. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection of vaccination. *Infect. Immun.* 57:1590-1598.
- 32.- Miura T and Mizushima S. 1969. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from seroplast membrane of *Escherichia coli* k-12. *Biochem. Biophys. Act.* 150:159-161.
- 33.- Muzuno T., Chou M y Inouye, M. 1984. A unique mechanism regulating gene epression, Transnational inhibition by a complementary RNA transcript (mic

RNA) Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:1966-1970.

34.- Nabholz, M and Mac Donald, H.R. 1983. Cytolytic T lymphocytes Ann. Rev. Immunol. 1:273-306.

35.- Nikaído H. 1983. Proteins forming large Channels form bacterial and mitochondrial outer membranes; porins and phages lambda receptor protein. Methods in Enzymology. 97:85-100.

36.- Nikaído, H. y Vaara, M. 1985. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev 49:1-32.

37.- Ortiz, V. Isibasi A., García O y Kumate J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immuneresponse to outer membrane proteins isolated from Salmonella typhi in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27:1640-1645.

38.- Osborn M. J and WU. H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacterial. Ann Rev Microbiol. 34:369-432.

39.- Páez R. García J.A: Paniagua J. Isibasi, A. and Kumate J. 1992. XXV. Congreso Nacional de Ciencias Farmaceuticas. Quintana Roo. México.

40.- Paniagua, S.F. 1990. Aislamiento y Caracterización de porinas de Salmonella typhi capaces de inducir inmunidad protectora en un modelo murino. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Inmunología. Facultad de Medicina. UNAM. México D.F.

41.- Paniagua J. Isibasi A. Pelayo R. Ortiz V. Muy M. González C., García J.A. Ialas S y Kumate J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de Salmonella typhi 9,12, Viid. Ensayos de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. Arch. Invest. Med. (Mex) 20:315-320.

42.- Peréz M.A. y Cabrera R. 1974. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoidea. Rev Sal. Pub. de Méx. 15:185-194.

43.- Puente J.L Flores V, Fernandez M, Fucha and Calva E. Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from Salmonella typhi. Gene 1987 61:73-83.

44.- Reed, L.T. y Muench H.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points Am. Hyg. 27:493-497.

45.- Robbins, J. D and Robbins, J. E. 1984. Re-examination of the immunopathogenic role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of Salmonella typhi. J. Infect. Dis. 150:436-449.

46.- Sandford G.R. 1979. Infectious diseases. Ed. Burgess Pub. Co. USA. pp 55-130.

47.- Schmitges C.J. and Henning U. 1976. The major protein of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Heterogeneity of protein. I. Eur. J. Biochem. 63:47-52.

48.- Schnaitman, C.A. 1971. Effect of ethylen diamine tetraacetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of the cell wall of Escherichia coli J. Bacteriol. 108:553-556.

49.- Schnaitman C.A. 1974. Outer membrane proteins of Escherichia coli. III

Evidence the major proteins of E. coli O111 outer membrane consist of four distinct polypeptide species J. Bacteriol. 118:442-453.

50.- Schnaitman C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli by polyacrylamide electrophoresis. J. Bacteriol. 104:882-889.

51.- Schweizer, M. y Henning U. 1977. Action of major outer, cell envelope membrane protein in conjugation of Escherichia coli k-12. J. Bacteriol. 108:553-563.

52.-Schweizer M, Hindennach I, Gartenw and Henning U. 1978. mJOR proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane interaction of protein II with lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 82:211-217.

53.- Takeshi M. Chou M.Y., and Inouye M. DNA sequence of the promoter region of the ompC gene and the amino acid sequence of the signal peptide of pro-OmpC protein of Escherichia coli FEBS LETTERS. 1983. 151:159-163.

54.- Tommassen J. and Lugtenberg, B. 1980. Outer membrane protein of Escherichia coli K-12 is co-regulated with alkaline phosphatase. J. Bacteriol. 143:151-157.

55.- Tully, J.G. Gaines, S and Tigertt W. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever IV. Role of H antigen in protection. J. Infect. Dis. 112:118-124.

56.- Unanue E.R and Cenottini J.C. 1989. Antigen presentation FASEB 3:2496-2502.

57.- Warren J.R. and Groarty J. Structure and function of an OmpC Deletion Mutant porin from Escherichia coli K-12. Biochem. 1990. 29: 5344-5351.

58.- Zaror I, Gomez I, Castillo G, Yudelevich A and Venegas A. Molecular cloning and expression en E. coli of a Salmonella typhi porin gene FEB 1988. 229:77-81.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA