

11281 3
78



Universidad Nacional Autónoma de México

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA

RESPUESTA PROLIFERATIVA *in vitro* INDUCIDA POR PORINAS DE *Salmonella* EN UN MODELO MURINO

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA
P R E S E N T A
CESAR RAUL GONZALEZ BONILLA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO.

1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCION.	5
2.1. Generalidades de la respuesta inmunológica.	
2.2. Fiebre Tifoidea.	
2.2.1. Historia.	
2.2.2. Generalidades.	
2.2.3. Respuesta inmune.	
2.2.4. Vacunas.	
2.3. Salmonellosis murina.	
2.3.1. Generalidades.	
2.3.2. Locus Ity.	
2.3.3. Locus Lps.	
2.3.4. Locus Xid.	
2.4. Proteínas de membrana externa.	
2.4.1. Generalidades.	
2.4.2. Clasificación.	
2.4.3. Papel como inmunógenos.	
2.5. Trabajos previos en el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación del IMSS.	
2.5.1. Modelos experimentales.	
2.5.2. Mecanismos de protectores propuestos.	
3. OBJETIVOS.	34
3.1. General.	
3.2. Específicos.	
4. HIPOTESIS.	35
5. MODELO EXPERIMENTAL.	36
6. MATERIALES Y METODOS.	38
6.1. Animales de experimentación.	
6.1.1. Ratones.	
6.1.2. Esquemas de inmunización.	
6.2. Métodos analíticos y bioquímicos.	
6.2.1. Cepas bacterianas.	
6.2.2. Cultivo y cosecha de las cepas bacterianas.	
6.2.3. Obtención y purificación de proteínas de membrana externa (FME).	
6.2.4. Obtención y purificación de porinas.	
6.2.5. Digestión de porinas.	
6.2.6. Antígenos en papel de nitrocelulosa.	
6.2.7. Obtención de lipopolisacárido (LPS).	
6.3. Métodos analíticos:	
6.3.1. Determinación de lipopolisacárido (LPS).	
6.3.2. Cuantificación de proteínas.	
6.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	
6.3.4. Electrotransferencia.	

6.4.	Métodos inmunológicos.	
6.4.1.	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).	
6.4.2.	Obtención y cultivo de células linfoides.	
6.4.3.	Obtención de linfocitos T.	
6.4.4.	Obtención de células presentadoras de antígeno.	
6.4.5.	Ensayos de activación <i>in vitro</i> por mitógenos.	
6.4.6.	Ensayos de activación antígeno-específicos.	
6.4.7.	Evaluación de la activación de linfocitos mediante dimetil-difenil bromuro de tetrazolium (MTT).	
6.4.8.	Ensayo de proliferación de esplenocitos con porinas transferidas a papel de nitrocelulosa.	
7.	RESULTADOS.....	50
7.1.	Aislamiento y caracterización de Antígenos.	
7.1.1.	Proteínas de Membrana Externa.	
7.1.2.	Porinas.	
7.1.3.	Péptidos.	
7.2.	Determinación de las condiciones de cultivo.	
7.2.1.	Estimulación de linfocitos por Concanavalina A.	
7.2.2.	Comparación entre la incorporación de ³ HTDr y el método colorimétrico utilizando MTT.	
7.2.3.	Estimulación de esplenocitos por lipopolisacárido.	
7.2.4.	Condiciones de cultivo de los linfocitos T.	
7.3.	Ensayos antígeno-específicos.	
7.3.1.	Ratones inmunizados con <i>Salmonella typhimurium</i> .	
7.3.2.	Ratones inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhimurium</i> .	
7.3.3.	Ratones inmunizados con PME de <i>Salmonella typhi</i> .	
7.3.4.	Efecto del lipopolisacárido.	
7.3.5.	Ensayos en papel de nitrocelulosa.	
7.4.	Determinación de anticuerpos.	
8.	DISCUSION.....	116
8.1.	Logros.	
8.1.1.	Purificación de antígenos.	
8.1.2.	Ensayos de activación.	
8.2.	Limitaciones.	
8.3.	Perspectivas.	
9.	BIBLIOGRAFIA.....	125

INDICE DE FIGURAS

2.1	Arreglo de las proteínas de membrana externa en <i>Escherichia coli</i>	29
7.1.	Comportamiento electroforético de las FME de <i>Salmonella typhi</i>	51
7.2.	Perfil cromatográfico de las FME de <i>Salmonella typhi</i>	52
7.3.	Comportamiento electroforético de las porinas de <i>Salmonella typhi</i>	54
7.4.	Comportamiento electroforético de los péptido de porinas de <i>S. typhi</i> . Tinción con azul de Coomassie.....	55
7.5.	Comportamiento electroforético de los péptido de porinas de <i>S. typhi</i> . Tinción con nitrato de plata.....	56
7.6.	Estimulación de esplenocitos de ratón NIH por concanavalina A.....	59
7.7.	Estimulación de células de ganglio de ratón NIH por concanavalina A.....	60
7.8.	Estimulación de esplenocitos por concanavalina A. según días de cultivo.....	61
7.9.	Estimulación de esplenocitos por concanavalina A. Efecto de la concentración del Suero Fetal Bovino.....	62
7.10. A.	Determinación del número de células por MTT. D. O. 490nm.....	65
7.10. B.	Determinación del número de células por MTT. D. O. 490nm.....	65
7.11. A.	Activación de linfocitos por concanavalina A determinada por incorporación de ³ HIDr.....	67
7.11. B.	Activación de linfocitos por concanavalina A determinada por MTT.....	68
7.11. C.	Comparación entre la incorporación de ³ HIDr y el MTT.....	69
7.12	Estimulación de linfocitos T por concanavalina A.....	74
7.13	Estimulación de linfocitos T por células alogénicas.....	76
7.14	Estimulación de linfocitos por con A. Efecto de la concentración de EFB.....	88
7.15. A.	Estimulación de esplenocitos por porinas. inmunización con FME de <i>S. typhi</i> . Según días de cultivo.....	89
7.15. B.	Estimulación de esplenocitos por porinas. inmunización con FME de <i>S. typhi</i> . Según días de cultivo.....	90
7.16. A.	Persistencia de la estimulación de linfocitos por porinas....	91
7.16. B.	Persistencia de la estimulación de linfocitos por porinas....	92
7.17. A.	Estimulación de esplenocitos por porinas. Adición de concanavalina A.....	96
7.17. B.	Estimulación de esplenocitos por porinas. Adición de concanavalina A.....	97
7.18.	Efecto de la polimixina B. Determinación de la dosis óptima.....	101
7.19.	Efecto de la polimixina B en la estimulación por diversos mitógenos.....	102
7.20. A.	Estimulación de esplenocitos por FME en nitrocelulosa.....	106
7.20. B.	Estimulación de esplenocitos por FME en nitrocelulosa.....	107
7.21.	Estimulación de esplenocitos por porinas en nitrocelulosa.....	108
7.22. A.	Anticuerpos contra porinas ratón C57Bl/6 immune.....	112
7.22. B.	Anticuerpos contra porinas ratón C57Bl/6 testigo.....	113
7.23. A.	Anticuerpos contra porinas ratón BALB/c immune.....	114
7.23. B.	Anticuerpos contra porinas ratón BALB/c testigo.....	115

INDICE DE TABLAS

2.1.	Características de las porinas de <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i>	27
7.1.	Peso molecular aproximado de los péptidos.....	57
7.2.	Estimulación de esplenocitos por concanavalina A. Efecto de diferentes lotes de Suero Fetal bovino.....	63
7.3.	Estimulación de esplenocitos por lipopolisacárido de <i>Salmonella typhi</i> 0901.....	71
7.4.	Estimulación de linfocitos T por concanavalina A.....	73
7.5.	Estimulación de linfocitos T por células alogénicas.....	75
7.6.	Estimulación de esplenocitos por porinas de <i>Enterobacterias</i> . Inmunización con <i>S. typhimurium</i>	78
7.7.	Estimulación de linfocitos por porinas de <i>Enterobacterias</i> . Inmunización con <i>S. typhimurium</i>	79
7.8.	Estimulación de esplenocitos por porinas de <i>Enterobacterias</i> . Inmunización con porinas de <i>S. typhimurium</i>	82
7.9.	Estimulación de esplenocitos por porinas de <i>Enterobacterias</i> . Inmunización con porinas de <i>S. typhimurium</i>	83
7.10.	Estimulación de linfocitos por porinas de <i>Enterobacterias</i> . Inmunización con porinas de <i>S. typhimurium</i>	84
7.11.	Estimulación de linfocitos por porinas. Inmunización con PME de <i>S. typhi</i>	85
7.12.	Estimulación de esplenocitos por porinas. Inmunización con PME de <i>S. typhi</i>	93
7.13.	Estimulación de esplenocitos por porinas. Adición de concanavalina A.....	94
7.14.	Estimulación de esplenocitos por porinas. Adición de concanavalina A. Efecto al sexto día de cultivo.....	95
7.15.	Estimulación de linfocitos T por porinas.....	98
7.16.	Estimulación de linfocitos T por porinas. Efecto de la eliminación de linfocitos T.....	99
7.17.	Estimulación de esplenocitos por porinas. Efecto de la polimixina B.....	103
7.18.	Estimulación de esplenocitos por péptidos de porinas de <i>S. typhi</i>	111
8.1.	Péptidos que se obtiene por ruptura con BrCN en porinas de <i>Escherichia coli</i>	124

ABREVIATURAS.

³ HFDr	Timidina tritiada.
ACF	Adyuvante completo de Freund.
APS	Persulfato de amonio.
BHI	Infusión cerebro-corazon.
C. P. M	Cuentas por minuto.
Con A	Concanavalina A.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
DL ₅₀	Dosis letal al 50%.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
H-2	Complejo de Histocompatibilidad del ratón.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxiethyl) 1-piperazín-etano-sulfónico.
IL	Interleucina.
Ity	Gene que codifica la susceptibilidad a la infección por <i>Salmonella typhimurium</i> .
KDO	Acido 2-ceto-3-desoxioctulónico.
LB	Linfocito B.
LPS	Lipopolisacárido.
Lps	Gene que codifica la respuesta a LPS.
LT	Linfocito T.
LTC	Linfocito T citotóxico.
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil bromuro de tetrazolium.
NK	Célula asesina natural (Natural Killer).
PBS	Regulador de fosfatos salinos.
PME	Proteínas de membrana externa.
PNC	Papel de nitrocelulosa.
pol B	Polimixina B.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poli(acrilamida) en presencia de SDS.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SFB	Suero Fetal Bovino.
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilén diamino.
TES	Tris-EDTA-SDS.
TH	Linfocito T cooperador o inductor.
Tris	Hidroximetil-aminometano.

RESUMEN.

Los experimentos que aquí se describen se llevaron a cabo para definir el papel de las proteínas de membrana externa (PME) de *S. typhi* y *S. typhimurium* en la inducción de inmunidad celular. Se examinó la proliferación antígeno específica de linfocitos de ratones NIH inmunizados con *Salmonella typhimurium* inactivada por acetona, PME de *S. typhi* o porinas de *S. typhimurium* mediante un ensayo de incorporación de $^3\text{HTDr}$. Se observó importante reactividad cruzada en las respuestas proliferativas contra porinas provenientes de *Salmonella* o *E. coli* en los tres sistemas de inmunización. Sin embargo, la incorporación de $^3\text{HTDr}$ fué mayor en presencia de porinas de *S. typhi* o *E. coli* en relación a las de *S. typhimurium*, estos resultados fueron compatibles con los obtenidos en la determinación de anticuerpos por el método de ELISA. Para disminuir el efecto mitogénico del lipopolisacárido que contamina las preparaciones de PME, linfocitos provenientes de animales inmunizados con PME de *S. typhi* se cultivaron en presencia de polimixina B. Algunos experimentos utilizando ratones BALB/c y C57Bl/6 inmunizados con PME de *S. typhi* dieron resultados similares a los realizados con ratones de cepa abierta. La diferencia en la magnitud de la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a porinas de distintas fuentes puede estar involucrada en la susceptibilidad a la infección murina por *Salmonella*.

Con el fin de localizar los determinantes antigénicos capaces de generar respuesta inmune celular, se realizaron ensayos de acti-

vación de linfocitos de ratones NIH inmunizados con PME de *S. typhi*, cultivando estas células en presencia de PME separadas por SDS-PAGE, transferidas a papel de nitrocelulosa y transformadas en suspensiones finas; se determinó que las proteínas cuyos pesos moleculares se encuentran entre 36 y 41 KDa (porinas) inducen mayor activación en comparación a las proteínas de pesos moleculares menores.

De la digestión con BrCN de las porinas resultaron 4 péptidos, de los cuales se probaron tres en el papel de nitrocelulosa, encontrando que el péptido de 10 KDa genera la mayor activación linfocítica.

ABSTRACT.

The current studies were undertaken to define the role of the outer membrane proteins (OMPs) from *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* in the induction of cell-mediated immunity. Antigen specific proliferation of lymphoid cells from spleen and lymph nodes of NIH mice immunized with acetone-killed *Salmonella typhimurium* OMPs or porins was examined using a $^3\text{HTDr}$ incorporation assay. Important cross-reactivity was observed between the lymphocytic responses against porins obtained either from *Salmonella* or *E. coli* in any of these three systems. Nevertheless, the degree of $^3\text{HTDr}$ incorporation was higher in the presence of *S. typhi* or *E. coli* purified proteins than when the cells were cultured with *Salmonella typhimurium* antigens, these results are compatible with those obtained by measuring antibody responses by ELISA. To avoid the mitogenic activity of the lipopolysaccharide that contaminate the OMPs and porins preparations, lymphocytes from animals immunized with *S. typhi* OMPs were cultured with polymycin B and they were then activated in the presence of antigen. Some experiments were done immunizing BALB/c and C57Bl/6 mice with *S. typhi* OMPs and similar results were obtained as those performed in the outbred mice experiments. The difference in the magnitude of lymphocytic activation with porins from different sources may be related to susceptibility of mice to *Salmonella typhimurium* infection.

Activation assays with lymphocytes from OMP-immunized NIH mice were performed in order to identify the antigenic determinants capable to induce cellular immunity. These lymphocytes were cultured with OMPs, proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and added to the culture in fine suspensions. Proteins between 36 to 41 KDa (porins) induced more lymphocyte activation than other proteins.

Four peptides were obtained treating the porins with BrCN. Three were tested in the nitrocellulose assay, the 10 KDa peptide was found to activate immune lymphocytes.

2. INTRODUCCION

2.1. Generalidades de la respuesta inmunológica.

El sistema inmunológico está constituido por una gran variedad de estirpes celulares articuladas en una intrincada red de interacciones que permiten finalmente, diferenciar lo propio y lo ajeno; asegurando la cohesión funcional interna del organismo y el equilibrio con el medio ambiente.

La respuesta inmunológica se inicia con la fagocitosis del antígeno por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos, y otras células presentadoras de antígeno (CPA), digieren las fracciones protéicas a péptidos (15, 154) 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: en la endógena, preferentemente relacionada a los antígenos virales, los péptidos antigénicos se expresan en moléculas de histocompatibilidad de clase I, en tanto que por la vía exógena, que comprende aquellos antígenos que se captan mediante la fagocitosis, los péptidos se expresan en moléculas de clase II (143).

Esta primera fase, llamada de procesamiento y presentación del antígeno (70), es indispensable, pues los linfocitos T inductores, responsables de dirigir la respuesta inmunológica, son incapaces de distinguir al antígeno nativo.

Los linfocitos T inductores o cooperadores (TH) (CD4⁺) reconocen al antígeno unido a moléculas de histocompatibilidad de clase II (H-2 I-A e I-E en el ratón y HLA DR, DQ y DP en el humano).

La activación de estas células no solo depende de la unión del complejo receptor-(TcR)-CD2-CD3 al antígeno asociado a moléculas de histocompatibilidad, ya que existen otras moléculas en la superficie de los linfocitos T que intervienen en la regulación de la adhesión con la CPA.

Una vez activados los TH proliferan y producen diversas linfoquinas que conducen la fase efectora de la respuesta inmunológica (124). En el ratón se han demostrado dos subpoblaciones de linfocitos cooperadores, de acuerdo a su capacidad de producción de diferentes interleucinas (IL) los TH1 se relacionan con la hipersensibilidad de tipo retardado, ya que elaboran principalmente interleucina 2, interferón gamma y linfotoxina; en cambio los TH2, producen fundamentalmente interleucinas 4, 5 y 6, las cuales son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B (84).

Aún cuando los linfocitos B (LB) reconocen al antígeno en su forma nativa, para iniciar su activación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos, necesitan la participación de los mediadores solubles producidos por los linfocitos cooperadores. Por su parte, los linfocitos B son capaces de procesar y presentar antígenos, lo cual aumenta la eficiencia del sistema inmune, sobre todo en respuestas secundarias(65). En cambio, los linfocitos T no procesan ni presentan antígenos de manera habitual, aunque en condiciones particulares son capaces de hacerlo (64).

Algunos de los mediadores solubles mejor estudiados son los siguientes: La IL-2 que es un factor de crecimiento de linfocitos T (125), promueve el crecimiento de clones específicas contra el antígeno, tiene función de factor de crecimiento y diferenciación

de linfocitos T citotóxicos (LTC) y en la expansión de células asesinas naturales (NK) (100, 126). El interferón gamma que tiene efecto antiviral (108), induce la activación de macrófagos (123) y promueve la expresión de diversos genes; de manera notable, los del Sistema Principal de Histocompatibilidad (57).

La IL-3 es uno de los varios factores estimulantes de colonias que regulan la hematopoyesis (79). La IL-4 induce la producción de IgG y de IgE, aumenta la expresión de moléculas de clase II. La IL-5 induce la proliferación de los linfocitos B y la secreción de IgM, la IL-6 interviene en la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas y la IL-7 induce la proliferación de timocitos y linfocitos B inmaduros (98).

La fase efectora de la respuesta inmunológica puede dividirse en dos ramas: la humoral, depende las actividades biológicas de los anticuerpos y el complemento, y la celular que involucra los fenómenos de hipersensibilidad retardada y citotoxicidad mediada por células.

Los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) participan en la fase efectora celular. A diferencia de los linfocitos T inductores, reconocen antígenos en el contexto de moléculas de clase I de histocompatibilidad (H2 K, D en el ratón y HLA B, C y A en el humano). Los LTC al activarse secretan linfocinas, como la interleucina 2 y el interferón gamma, aunque en menor proporción que los TH. Los LTC no proliferan *in vitro* en presencia de antígenos solubles, reconocen antígenos en el contexto de moléculas de clase I, se activan y expanden frente a aloantígeno y tienen la propiedad de lisar células infectadas por virus y células tumorales (87); además, se les ha descrito función supresora (82).

Otros mecanismos efectores no específicos, pero de gran importancia, dependen de los macrófagos: la eliminación de agentes infecciosos mediante la fagocitosis, cuyo mecanismo bactericida fundamental es la producción intracelular de peróxido de hidrógeno (142), y depende de la activación que los macrófagos presentan debido al efecto de algunas sustancias endógenas como el interferón gamma (114) y otras exógenas como los muramildipéptidos y lipopolisacáridos (LPS). Además, el macrófago libera al medio productos biológicamente activos como la interleucina 1, que es mediador de algunos efectos de la endotoxina, el interferón alfa que presenta actividad antiviral, el factor de necrosis tumoral de propiedades similares a la linfotoxina y algunos componentes del complemento.

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

Las interacciones pueden suceder entre células; o bien, entre células y matrices extracelulares. Las moléculas que enlazan al citoesqueleto con medio extracelular se conocen como Integrinas, las cuales son glicoproteínas constituidas por heterodímeros de subunidades $\alpha\beta$ (46).

Las integrinas se dividen en tres subfamilias, de acuerdo al tipo de cadena β que expresan, las cuales se designan como integrina $\beta 1$, integrina $\beta 2$ e integrina $\beta 3$. La homología entre las tres clases de cadena β es hasta del 49%. Cada subfamilia comparte un solo tipo de cadena β y presenta diferentes cadenas α ; que además tienen también una alta homología.

La familia de las integrinas está constituida por alrededor de

diez glicoproteínas, algunos de sus ligandos como la fibronectina, colágena, vitronectina, fibrinógeno y factor de von Willebrand, presentan secuencias de RGD (Arg-Gly-Asp) que son reconocidos por las moléculas VLA (del inglés very late antigens) que expresan las subunidades $\beta 1$ o $\beta 3$.

Las glicoproteínas que expresan la subunidad $\beta 2$ constituyen la subfamilia de LFA-1, Mac1 y p150,95 (CD11/18), las cuales intervienen en los mecanismos de adhesión interleucocitaria (46).

2.2. Fiebre Tifoidea.

2.2.1. Historia.

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

Sin embargo, durante años, el padecimiento se confundió con el tifo y no fue sino hasta 1782 cuando Ruxham diferenció ambas entidades clínicas como la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo) (43).

En 1837, Gerhard, estableció las bases del diagnóstico diferencial entre el tifo y la fiebre tifoidea; Jenner en 1850, puntualizó que las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos, eran específicas de la fiebre tifoidea (117).

William Budd, en 1856 determinó que la fiebre tifoidea se transmite a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminados con materia fecal proveniente de individuos enfermos (45).

En 1880, Eberth logró aislar a bacilo tifoídico en secciones de ganglios linfáticos mesentéricos e hígado de pacientes con fiebre tifoidea. Pfeiffer, en 1885, realizó el primer aislamiento

del bacilo a partir de heces (45). En el mismo año, Pfeiffer y Kolle demostraron que el suero de pacientes convalescientes protegía a los cobayos contra dosis letales de bacilo tifoidico y, en 1895, Widal describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (117).

2.2.2. Generalidades.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión masiva de *Salmonella typhi*. Se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen la 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% (59).

La infección se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria; ya que este microorganismo afecta solo al ser humano y no hay reservorios animales, el elemento más importante en la cadena de transmisión es el portador asintomático. Esta enfermedad continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos países industrializados. Se estiman 12 millones de casos anuales con una incidencia de 500 casos/100,000 habitantes en Africa y Asia.

En la región de las Américas alrededor de 1990, se presentarán 89,591 casos aproximadamente, que representan una incidencia de 20.8 casos /100,000 habitantes; la incidencia a llegado a ser hasta

de 150 casos/100,000 habitantes en Chile. En México se reportaron 11,078 casos en 1987, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes (5).

El grupo de edad más afectado por la enfermedad es el de los 15 a 44 años, donde se presentan aproximadamente el 58.62% de los casos, lo cual representa más 500,000 días laborables perdidos.

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae* y especie *typhi*, Gram negativo, móvil, mide dos a tres μm , citofílico anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos. Tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno "H" o flagelar y el antígeno somático "O" que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica; de acuerdo a 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 se encuentra el antígeno "Vi", el cual es de naturaleza sacarídica, forma parte de la membrana externa y es indicador de virulencia. La fórmula: 9, 12, Vi, d. denota a *S. typhi* en forma abreviada (21).

Otros componentes, de antigenicidad poco estudiada, forman parte de la membrana externa: la lipoproteína de Braun y las porinas.

2.2.3. Respuesta inmune.

Salmonella typhi penetra al organismo a través de la boca, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, penetra a la

membrana basal intestinal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por macrófagos y transportada a los linfáticos regionales donde se multiplica activamente, tiene una fase de bacteremia, 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 (43).

Aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida, se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas es provocada por la liberación de endotoxina; entre otros efectos se ha comprobado que induce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (45).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas, los cuales no correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones, a excepción de algunos estudios que sugieren que los anticuerpos contra el antígeno H son un indicador de resistencia a la fiebre tifoidea (136).

Se ha descrito que los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de *S. typhi* a la pared intestinal; sin embargo, sólo son protectores ante inóculos pequeños de la bacteria. Frente a la invasión por grandes cantidades de salmonella, los mecanismos de inmunidad celular, fundamentalmente la activación de macrófagos, son indispensables para el control de la infección (60, 86).

La respuesta inmune celular contra *S. typhi* ha sido analizada principalmente mediante la inhibición de la migración de leu-

cocitos (LMI), utilizando extractos crudos de la bacteria que contiene gran variedad de antígenos, componentes con actividad mitogénica para células B y probablemente para linfocitos T; por tanto, su interpretación es difícil, ya que además dependen de la secreción de linfocinas mal caracterizadas. También se ha estudiado la respuesta proliferativa inducida por la bacteria o sus fracciones, pero los resultados se encuentran influenciados por la presencia de endotoxina y otros contaminantes en los preparados antigénicos (58, 88, 112).

Desde 1965 existen reportes de la importancia que tiene la inmunidad celular en el control de la infección por *Salmonella*; En 1974, Kumar y cols. realizan una serie de experimentos para determinar la inmunidad celular en individuos normales, vacunados con TAB (vacuna inactivada con calor-fenol) o pacientes con fiebre tifoidea. Encuentran que existe una proporción elevada de personas normales que tienen la prueba de LMI positiva; los vacunados con TAB tienen niveles altos de anticuerpos, pero una positividad comparable con las personas normales, y los pacientes con fiebre tifoidea presentan una proporción mayor de positividad. La falta de correlación entre los niveles de anticuerpos y la inmunidad celular se confirma en otros estudios realizados por Dham y Thompson en 1984 y Rajagopalan y Kumar en el mismo año (23, 112). En 1984, Rajagopalan, encuentra además que la respuesta celular a antígenos de *S. typhi*, medida por transformación blastoide, en personas vacunadas con TAB es incluso mayor antes que después de recibir la vacuna, por lo que sugiere que existe algún mecanismo supresor (111). Dham y Thompson (1982) encuentran que también los portadores crónicos de *S. typhi* presentan inmunidad celular deficiente

hacia antígenos crudos de la bacteria (22).

Estos resultados, y los obtenidos en el modelo murino, donde se conocen cuando menos tres genes que regulan la resistencia a la infección por *S. typhimurium* sugieren que en el humano también pudiese existir alguna susceptibilidad genética a la fiebre tifoidea (42).

2.2.4. Vacunas.

La inmunización experimental con suspensiones de *S. typhi* viva fue realizada con éxito en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y un año después por Bauner y Peiper en ratones. Después, Klikovich empleó bacilos muertos con el mismo propósito, estimulando a Wright en Inglaterra y simultáneamente a Pfeiffer y Kolle en Alemania a utilizar, por primera vez (1897), vacunas inactivadas para la inmunización de humanos. Así, la vacuna de Pfeiffer y Kolle, preparada en medio sólido, estaba constituida por bacteria fenolada inactivada por calor a 56°C.

Al aplicar estas vacunas en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica, generaron una disminución significativa en la morbilidad, así como atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que adquirieron la enfermedad (107). En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas de bacterias vivas atenuadas administradas por vía oral, aplicándola a miembros del ejército Francés, donde desafortunadamente se presentaron decesos entre los individuos vacunados (34, 60).

La utilización de las vacunas tifoídicas elaboradas con bacterias inactivadas continuó durante décadas sin demostrarse su efecto protector real, pues se carecía de modelos animales que probaran su

eficacia y, además, no era posible relacionar el efecto protector con algún indicador serológico. Esto no se logró sino hasta 1955, cuando bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética. En estos lugares se investigó la eficacia de tres vacunas preparadas con células enteras de *Salmonella typhi*: inactivadas con acetona, calor-fenol o alcohol. La vacuna K, inactivada con acetona, confirió mayor protección y más duradera. La vacuna inactivada con calor y fenol, designada con la letra L, mostró menor eficacia que la K y la inactivada con alcohol fué la menos efectiva (20, 40, 66, 73, 110, 137).

Aunque la protección inducida por una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable, el empleo de dos dosis proporcionaba una inmunidad más confiable y de mayor duración (52). Lo cual fué confirmado por Hornick y cols. en voluntarios humanos en 1968 (44).

Por otro lado, recientemente, Murphy y Levin (1989) en un estudio epidemiológico sobre la respuesta inmune celular a *Salmonella typhi* Ty2 y a polisacárido de *Salmonella typhi* en individuos vacunados y no vacunados de un lugar hiperendémico (Santiago, Chile) y otro no endémico (Baltimore, Maryland), mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada, encontraron que es posible diferenciar a ambos grupos. Sin embargo, la respuesta fué mayor hacia el polisacárido, lo que sugiere que la vacuna a base de *Salmonella typhi* Ty2 no induce inmunidad celular eficiente (85).

Además, el hecho de que las vacunas parenterales tienen reacciones secundarias importantes debido a la presencia de endotoxina y protegían en forma efectiva sólo ante inóculos menores o iguales

a 10^5 bacterias, ha motivado la búsqueda de nuevos inmunógenos. Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran con bacterias vivas. Una de ellas se prepara con una cepa de *S. typhi* dependiente de aminoácidos aromáticos (113) y otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (Ty21a) (35).

La efectividad de ambas vacunas se evaluó en voluntarios humanos, los resultados de la protección conferida por la cepa dependiente de estreptomina fueron contradictorios (66, 67).

En contraste, la vacuna de Germanier protegió al 87% de los individuos inmunizados cuando la dosis de desafío fue de 10^7 bacterias (DI₅₀). En Alejandría, Egipto, se logró inducir protección en el 95% de la población estudiada. Sin embargo, en Chile (1983), al aplicarla a una población infantil a razón de tres dosis administradas en cápsulas de capa entérica con intervalos de 2 o 21 días entre cada dosis, sólo indujo protección del 51 y 67%, respectivamente (33, 34, 146).

Recientemente, Cryz y cols. (1989) reportaron la obtención de una variante de *Salmonella typhi* Ty21a que contiene antígeno "Vi" (homopolímero lineal de ácido 2-N-acetil galacturónico), y que por tanto, puede ser un inmunógeno más eficiente (19).

A pesar de estos avances, es importante señalar que aún se desconoce la naturaleza de los antígenos de *S. typhi* relacionados directamente con la protección y la respuesta inmune que generan en el humano. Las investigaciones encaminadas a identificar tales antígenos han sido numerosas; la mayoría se han dirigido hacia el estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático "O" (endotoxina o lipopolisacárido),

el flagelar "H" y el capsular "Vi".

Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O", tenía un papel importante en la inducción de inmunidad protectora. Sin embargo, una vacuna a base del oligosacárido de repetición del lipopolisacárido (LPS) generó protección escasa y de corta duración en el modelo murino, a pesar de unir el polisacárido a proteínas (128).

Por otro lado, se ha demostrado que el antígeno flagelar "H" tampoco está relacionado directamente con la inmunidad protectora. Tully y cols. en 1962, al inmunizar chimpancés con una cepa rugosa de *S. typhi*, indujeron la producción de anticuerpos contra el antígeno "H"; sin embargo, aún a títulos altos éstos no fueron protectores (136).

Anderson en 1968, encontró que en los ratones inmunizados con una mutante de *S. typhi* sin flagelos obtenían el mismo grado de protección que los inmunizados con cepas móviles (4).

Aunque varios investigadores han demostrado la falta de correlación entre los anticuerpos anti-Vi y un estado inmune protector otros estudios revelan que el antígeno "Vi" por si solo es capaz de inducir protección (115, 130, 148).

En 1934 Felix y Pitt informaron la presencia tanto de dicho antígeno en cepas de *S. typhi* aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, como la de sus anticuerpos homólogos en el suero de estas personas (30). Cuando el antígeno "Vi" se administró por vía parenteral, no solamente indujo títulos elevados de anticuerpos sino que protegió contra la fiebre tifoidea, cuando se hicieron los estudios de campo en Nepal y en Sudáfrica (2, 56).

El inconveniente de esta vacuna es que no induce memoria,

pues por su naturaleza polisacarídica se comporta como antígeno T-independiente. Debido a ésto se ha sugerido conjugarlo químicamente a proteínas para conferirle características de antígeno T-dependiente (130), pues se sabe que los antígenos proteicos, a diferencia de los polisacáridos, inducen respuesta más prolongada con anticuerpos de mayor afinidad y favorecen la respuesta inmune celular; aspectos primordiales en el control de las infecciones intracelulares (25). Por otro lado, se subraya la importancia que éste tiene en la virulencia de la cepa infectante, así como la conveniencia de conservarlo durante la preparación de vacunas (108).

Youmans y Youmans en 1965, demostraron que la fracción ribosomal de *Mycobacterium tuberculosis* inducía inmunidad protectora en el ratón contra el reto del microorganismo homólogo. Estos resultados condujeron a tratar de aislar estas fracciones de diferentes bacterias e investigar su capacidad protectora (151). En 1970, Venneman y cols. reportaron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhimurium* generaban protección contra la bacteria virulenta en el ratón, (144). Molinari y Larralde obtuvieron resultados similares (80). En trabajos posteriores, Molinari y Cabrera demostraron que las fracciones ribosomales de *S. typhi* también inducían protección en ratones (81).

Con el fin de encontrar a los antígenos responsables de la protección inducida por estas fracciones ribosomales se han venido realizando varios estudios, con resultados muy diversos. En los primeros trabajos al respecto, Venneman y cols. acreditaron al ARN ribosomal como el antígeno protector. Johnson presentó evidencias de que eran las proteínas ribosomales las que protegían a los

ratones (51); en tanto que, Smith y Biegly sugirieron que ambos antígenos, el ARN y las proteínas, se requerían para obtener una buena protección (127); sin embargo, en trabajos efectuados por Eisenstein y Misfeldt y Johnson, se demostró que las fracciones ribosomales de *Salmonella* se encontraban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular (26, 77). Más aún, en trabajos posteriores, Misfeldt y Johnson demostraron que las proteínas de la envoltura celular de *Salmonella typhimurium* protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria, en un grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales (75, 76). Estos experimentos ponen en duda la efectividad de las fracciones ribosomales y apoyan lo sugerido por Mates y Yosipovici, en el sentido de que los antígenos realmente protectores de *Salmonella* se localizan en la superficie bacteriana (72).

2. 3. Salmonellosis murina.

2. 3. 1. Generalidades.

Ante la falta de un modelo experimental en el que el agente causal sea *S. typhi*, la salmonellosis murina, causada por *Salmonella typhimurium* constituye la mejor alternativa para el estudio de la fiebre tifoidea, pues tiene una patogenia semejante (27).

La salmonellosis murina, de manera semejante que la fiebre tifoidea en el hombre, se adquiere por vía oral (41). El período de incubación es de 3 a 6 días, el cuadro clínico puede variar desde una infección leve a una enfermedad aguda y fatal; Los ratones se muestran menos activos, adoptan una postura encorvada con distensión abdominal, pelaje áspero, pérdida de peso, a veces diarrea,

esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía. (55)

La patogenia en el ratón también es semejante a la fiebre tifoidea humana, la bacteria coloniza el intestino delgado sin causar síntomas apreciables, entra a los tejidos submucosos atravesando el epitelio vellosos a través de las células M de las placas de Peyer; de aquí, se disemina vía linfáticos a todo el torrente circulatorio y sistema fagocítico mononuclear, donde es fagocitada por macrófagos de bazo e hígado (células de Kupffer). Estas células son el principal sitio de multiplicación de la *Salmonella* en los siguientes días de la infección (28).

La cantidad de bacterias en hígado y bazo llega a ser aproximadamente de 10^8 bacterias/organo, la infección conduce bacteremia incontrolable y choque endotóxico, lo que causa rápidamente a la muerte (93).

La inmunidad celular es primordial en el control de la infección por *S. typhimurium*. Se ha demostrado que el grado de hipersensibilidad tardía contra antígenos proteicos o polisacarídicos de la bacteria está en relación directa con el nivel de protección (131). La transferencia pasiva de linfocitos específicos contra antígenos de *S. typhimurium* confiere resistencia a ratones no inmunizados, la protección es efectiva aún empleando antígenos irrelevantes, siempre que se incluya un refuerzo de inmunización contra el antígeno al tiempo de retar con la bacteria; también es posible transferir inmunidad pasiva mediante sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con concanavalina A. Por tanto, es posible que la activación de macrófagos sea el evento más importante para la eliminación de las bacterias fagocitadas y el control de la infección (32, 37, 86, 105, 109).

En 1983, Udhayaumar y Muthukkaruppan describen que las cepas virulentas de *S. typhimurium* generan inmunidad celular mas eficiente que las cepas no virulentas. Para ello, inmunizaron ratones BALB/c con dosis subletales de *S. typhimurium* M525 (virulenta) o *S. typhimurium* M206 (no virulenta). Siete días después cultivaron el bazo o el hígado y encontraron mayor número de bacterias en los ratones que habían recibido la cepa virulenta. Estos ratones presentaban además, DTH mayor y respondían mejor al reto con otra cepa de bacteria virulenta (141).

En 1987, los mismos autores encuentran que los ratones BALB/c inmunizados con una dosis subletal de *S. typhimurium* M525 son capaces de montar DTH contra las porinas (139). Mas tarde, publicaron algunos experimentos donde demuestran que la inmunización de ratones BALB/c con PME de *S. typhimurium* confiere protección hasta 50 DL₅₀ de la bacteria virulenta (140). En experimentos posteriores demuestran que las porinas de *S. typhimurium* C5 son capaces de generar protección en ratones BALB/c contra el reto de 10 DL₅₀ de la bacteria virulenta. El efecto protector desaparece con 50 DL₅₀ y se correlaciona con el número de bacterias recuperadas de bazo o hígado y con la inducción de hipersensibilidad tardía (DTH) (138).

Recientemente, Matsui y Arai reportaron una serie de experimentos en los que determinan la producción de IL-2 en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con *S. typhimurium* LT2 en presencia de porinas de diversos serotipos de *Salmonella* y *E. coli* o bien bacterias completas inactivadas por luz ultravioleta. Encontraron que la producción de IL-2 fue mayor en presencia del antígeno homólogo, por lo que concluyen que la acti-

vación es seroespecífica. La hipersensibilidad tardía, determinada mediante inflamación de los cojinetes plantares, no dió los mismos resultados (73).

Se ha demostrado que existe influencia del complejo principal de histocompatibilidad sobre la susceptibilidad del ratón a las infecciones bacterianas en general (153) y a la infección por *S. typhimurium* en particular (42).

Así, Hormaeche y Harrington en 1985 calcularon la DL₅₀ para el reto con *Salmonella typhimurium* en diversas cepas ratones congénicos de la línea C57 y encontraron que los ratones H-2^k son más resistentes que los H-2^b y los H-2^d. La diferencia en la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* en estos ratones se manifiesta en fases tardías de la enfermedad, puesto que todos son Ity^s, ésta no parece estar relacionada con los mecanismos de activación de macrófagos, sino con la generación de inmunidad celular (42).

La resistencia innata a la infección por *S. typhimurium* en el ratón esta determinada también por varios locus no relacionados con el H-2 (89).

2.3.2. Locus Ity.

En el desarrollo de la infección por *S. typhimurium* en ratones existe la influencia de un gen de susceptibilidad, denominado Ity^s, codificado en el cromosoma 1, el alelo que confiere resistencia se denomina Ity^r. Se desconoce la forma exacta como actúa, pero parece ser importante en la fase inicial del padecimiento. Ity^r determina una mayor capacidad de los macrófagos de ratones resistentes para eliminar la salmonella intracelularmente.

Se ha demostrado que los linfocitos T no juegan un papel importante en la actividad de este gen (93, 94).

El gene *Ity* parece regular también la respuesta de ratones a *Leishmania donovani*, *Mycobacterium bovis* (BCG) y a *Mycobacterium lepraemurium*(6).

Los ratones homocigotos para el alelo que confiere la susceptibilidad (*Ity^{s/s}*) no pueden controlar la replicación temprana de la *Salmonella* en bazo e hígado y mueren rápidamente (menos de 10 días de post-inoculación), observándose además, un aumento paralelo en el peso del bazo (109), mientras los ratones resistentes (*Ity^{r/s}* o *Ity^{r/r}*) pueden controlar bien el crecimiento bacteriano en el sistema fagocítico mononuclear (129)

2.3.3. Locus *Lps*.

Estudios genéticos han demostrado que la respuesta a LPS en diferentes tipos de células está controlada por la expresión del loci *Lps* (16, 92) el cual se encuentra en el cromosoma 4, estrechamente unido al locus de la proteína urinaria mayor (Mup-1) (17, 18, 149).

Los ratones que son homocigotos o heterocigotos para el alelo normal *Lpsⁿ* (C3H/BBFeJ, BALB/c, C57BL/6) responden a bajas dosis de endotoxina, mientras los animales homocigotos para el alelo defectivo *Lps^d* (C3H/HeJ) no responden a LPS (92, 96).

El hecho de que el ratón C3H/HeJ sea resistente a los efectos letales del LPS proporciona un modelo importante para investigar el control genético de la resistencia a la endotoxina tanto *in vivo* como *in vitro* (38, 145).

La baja respuesta mitogénica de los ratones C3H/HeJ a LPS es

intrínseca a la célula B y no se debe a la presencia de células supresoras o a la ausencia de células T cooperadoras; Además, hay evidencias que sugieren que la interacción del LPS con las células B de C3H/HeJ produce una señal inhibitoria más que iniciar una actividad celular (116).

Aunque estos ratones no responden a los efectos mitogénicos y policlonales del LPS se a visto que dan respuesta a otros mitógenos de linfocitos B como son el Sulfato Dextrán, Poly-I y PPD. Además, son altamente susceptibles a infección por *S. typhimurium* a pesar de ser *Ity^F* (97).

Esta susceptibilidad parece estar controlada por el alelo *Lps^d*, O'Brien y Rosenstreich proponen que la multiplicación no controlada de *S. typhimurium* puede resultar de la incapacidad de los macrófagos *Lps^d* de ser activados por el LPS sobre la superficie celular de *S. typhimurium* (98).

2.3.4. Locus *Xid*.

Este tercer loci es un alelo recesivo ligado al cromosoma X y confiere susceptibilidad a *S. typhimurium* solamente en pocas cepas de ratones (CBA/H) (84).

La susceptibilidad inata a *S. typhimurium* en estos ratones es una consecuencia en la respuesta disminuida y retardada de anticuerpos IgG contra la bacteria.

En fases más tardías de la infección, el control depende de la producción de anticuerpos y del desarrollo de inmunidad celular.

Así, en ratones con inmunodeficiencia asociada al cromosoma X (tipo humoral) y en los ratones desnudos (tipo celular) se presenta una enfermedad letal en fase tardía (95); además, se sugiere que un

factor más de resistencia natural opera a nivel de células similares a las asesinas naturales (NK) (100).

Como resultado de la presencia de uno o más factores de susceptibilidad o resistencia la enfermedad progresa con inóculos bacterianos de diferente magnitud. Las cepas Ity^B (BALB/c, C57Bl/6) tienen una $DL_{50} < 10$ bacterias, en tanto que en las cepas resistentes (CBA, A/J) es $> 10^5$ (27).

2.4. Proteínas de membrana externa.

2.4.1. Generalidades.

En los últimos años, las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas han cobrado gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el establecimiento del papel que desempeñan en la relación huésped-parásito. Su importancia se pudo entender gracias al advenimiento de métodos específicos que permitieron separar la membrana externa de la citoplasmática. Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* empleando esferoplastos preparados con lisozima y EDTA. En su investigación, dichas estructuras fueron lisadas por choque osmótico y posteriormente su membrana externa se separó de la citoplasmática en un gradiente de sacarosa (78). El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME (102). Por su parte, Schnaitman describió una metodología que evita la utilización de esferoplastos consistente en llevar a cabo la destrucción de las bacterias en una prensa francesa, antes de conseguir la sedimentación de la envoltura celu-

lar y, posteriormente, la solubilización de la membrana citoplasmática con un detergente no iónico (122).

La identificación de las PME se efectuó por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida. Schnaitman fue el primero en reportar que *E. coli* contenía una proteína principal, la cual constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana (121); poco después, él y otros investigadores, demostraron por electroforesis que en realidad no era una sino cuatro (9, 120).

Schmitges y Henning describieron una proteína principal que se podía separar, electroforéticamente, en dos bandas. En la actualidad se sabe que el número de las PME varía dependiendo de la información genética de la bacteria y que su expresión puede verse afectada por las condiciones de cultivo (118).

2.4.2. Clasificación.

Las PME que más se han estudiado, son las de *E. coli* y *S. typhimurium*. Di Rienzo, Nakamura e Inouye y Osborn y Wu, hicieron una revisión extensa de ellas y las clasificaron en proteínas principales y secundarias o menores (24, 101).

De las proteínas principales se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo se expresan 5 de ellas con más de 100 000 copias por célula. Dentro de las proteínas principales se cuentan:

- 1) Las proteínas matrices o porinas, que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana. En el Tabla 2.1, se muestran las características gene-

TABLA 2.1
CARACTERÍSTICAS DE LAS PORINAS DE
Salmonella typhimurium y *Escherichia coli*

~~~~~ <i>Salmonella typhimurium</i>			
CARACTERÍSTICA	OmpF	P O R I N A OmpC	OmpD
GENE ESTRUCTURAL	ompF	ompC	ompD
	min 21	min 46	min 28
PESO MOLECULAR	35 kDa	36 kDa	34 kDa
COPIAS POR CELULA	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵
RECEPTOR PARA FAGOS	-	PH42, PH105 PH221	PH42, PH31 PH51
PUNTO ISOELECTRICO	4.77	4.78	-
FORMA OLIGOMERICA	TRIMERO	TRIMERO	TRIMERO
DIAMETRO DEL PORO	1.4 nm	1.4 nm	1.4 nm
~~~~~ <i>Escherichia coli</i> K12			
CARACTERÍSTICA	OmpF	OmpC	PhoE
GENE ESTRUCTURAL	ompF	ompC	phoE
	min 20.7	min 46	min 5.9
PESO MOLECULAR	37.2 kDa	36 kDa	37.78 kDa
COPIAS POR CELULA	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵
RECEPTOR PARA FAGOS	Tul1, T2, TF1 TF2, TF5, K20	TP2, TPS, PA-2 TF6, Tulb, TA	TC23, TC45
PUNTO ISOELECTRICO	5.9-6.2	4.41	-
FORMA OLIGOMERICA	TRIMERO	TRIMERO	TRIMERO
DIAMETRO DEL PORO	1.4 nm	1.4 nm	1.4 nm
OTRAS	SE REPRIME EN ALTA OSMOLARIDAD	SE EXPRESA EN ALTA OSMOLARIDAD	SE DEPRIME EN BAJOS FOSFATOS
~~~~~			

rales de las mismas (90).

2) La proteína modificable por calor, involucrada con los procesos de conjugación y que actúa como receptor de fagos y colicinas.

3) La lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la péptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana (10).

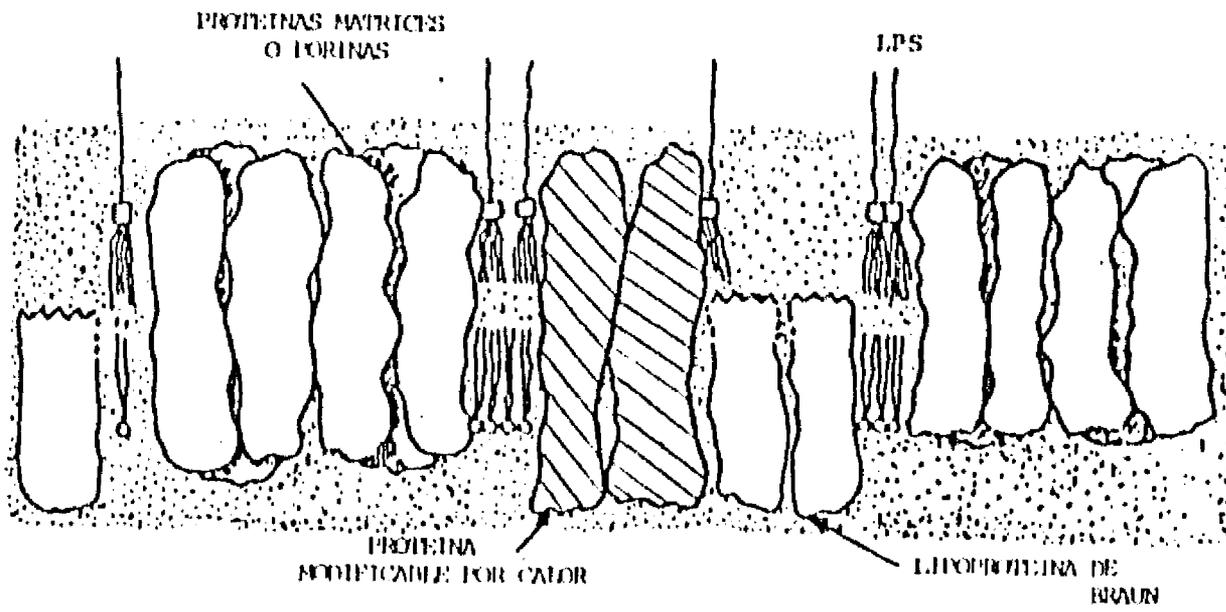
En la figura 2.1, se muestra la disposición de los componentes de la envoltura celular de *Escherichia coli*.

Con respecto a las proteínas menores, se ha demostrado que éstas intervienen como acarreadores en el transporte activo de moléculas y que están relacionadas con la replicación celular. Entre las menores se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad enzimática (fosfolipasa A).

#### 2.4.3. Papel como inmunógenos.

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevaron a investigar su eficacia como inmunógenos protectores; Frasch y cols. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos: los anticuerpos anti-PME de la bacteria presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento (31). Buchanan y Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger a chimpancés contra la uretritis gonocócica se encontraba presente en la membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* (12) y posteriormente, comprobaron que los anticuerpos dirigidos contra las PME conferían protección específica a cobayos en que previamente se había inducido una infección gonocócica experimental (11).

FIGURA 2.1  
ARREGLO DE LA PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA  
EN *Escherichia coli*.



Kussi y cols. detectaron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S. typhimurium* protegían al ratón contra una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (61, 62).

## 2.5 Trabajos previos en el Laboratorio de Inmunquímica de la Unidad de Investigación del IMSS.

### 2.5.1 Modelos experimentales.

Ya que existen experiencias alentadoras en la inducción de protección con PME en otras bacterias gram-negativas, en el Laboratorio de Inmunquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S., y en el Laboratorio de Investigación del Instituto Nacional de Higiene de la S.S., se realizan estudios tendientes a la obtención de una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir de PME de *S. typhi*.

Estas proteínas, obtenidas mediante la solubilización con un detergente no iónico, tienen pesos moleculares de 14 a 70 KDa con pI de 4.0 a 6.0, y presentan un 4% de contaminación con lipopolisacárido (LPS) (48).

Las porinas, que como se ha mencionado conforman la mayor proporción de las PME, purificadas por cromatografía de exclusión molecular, electroelución e inmunoabsorbente tienen un pI de 4.0 a 5.0 y pesos moleculares de 114 a 128 KDa en estado nativo (cuando se encuentran asociados en forma de homotrimeros) y de 36 a 41 KDa en su forma monomérica, con una contaminación por LPS del 0.01%. y ha sido posible purificarlas mediante inmunoabsorbentes con anticuerpos monoclonales (106).

Se cuenta con evidencias de que estas proteínas tienen un papel importante en la inducción de inmunidad ante la infección por *Salmonella typhi*. Algunas de las observaciones más relevantes son las siguientes:

1. Los pacientes con fiebre tifoidea 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 dirige hacia las porinas (36 a 41 KDa) (99).

2. La vacunación de ratones NIH con 10 µg a 30 µg de PME de *S. typhi*, induce protección del 100% al reto con 500 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,V1:d y *S. typhi* Ty2; y del 30% al reto con la misma dosis de *S. typhimurium*(47).

3. La administración pasiva de suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9,12,V1:d, confiere protección del 100% al reto con 100 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,V1:d y *S. typhi* Ty2; y del 80% al reto con *S. typhimurium*(47).

4. El suero de conejo anti-PME utilizado en el ensayo de protección pasiva reconoce por inmunoelectrotransferencia, todas las PME de ambas cepas de *S. typhi* empleadas en el reto, pero solamente a las porinas de *S. typhimurium*(47).

5. Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d (50) confieren una protección del 60% al reto con 20 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,V1:d, mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no producen ningún efecto (103).

6. La administración de vacuna antitifoidea oral induce la producción de anticuerpos anti-porinas (7).

7. La vacunación de ratones NIH con 10 µg de porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d indujo protección de 100% contra el reto de 500

DL₅₀ con la misma bacteria (49).

### 2.5.2. Mecanismos protectores propuestos.

La protección activa y pasiva a través de anticuerpos se explica porque los anticuerpos anti-porinas probablemente son capaces de activar al complemento, ya que la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo sobre la superficie bacteriana y el complejo C5-C9 (MAC) puede insertarse en la membrana y ejercer su efecto lítico; ésto no sucede con los anticuerpos dirigidos contra el antígeno somático "O", ya que la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en las unidades de repetición oligosacáridicas "O", lejos de la membrana bacteriana. Lo anterior explica la falta de correlación que existe entre títulos altos de anticuerpos anti-O y un estado de inmunidad protectora.

Los resultados de protección activa en forma cruzada para *S. typhimurium*, confirman que las PME son responsables de la respuesta inmune específica, ya que los epítopes compartidos entre las PME de ambas salmonellas confieren protección al reto de 500 DL₅₀ durante los primeros 5 días.

Puesto que al sexto día la protección disminuye al 25% al reto con *S. typhimurium*, se sugiere que es necesaria la inducción de respuesta inmune hacia los epítopes específicos para el control de la infección.

Los resultados de protección mediante la administración pasiva de suero de conejo anti-PME de *S. typhi* demuestran la importancia que tiene la respuesta inmune humoral durante la fase de bacteremia. Los anticuerpos dirigidos contra las porinas, aparentemente son los que juegan un papel importante en la protección ya que el

suero anti-PME por inmunoelectrotransferencia solamente reconoció las porinas de *S. typhimurium* demostrando que la protección cruzada observada se debe a los anticuerpos que reconocen los epítopes compartidos entre las porinas de ambas salmonellas.

Además, los anticuerpos monoclonales anti-LPS no son protectores, lo que apoya la suposición de que las porinas son los inmunógenos que inducen protección en el modelo murino. La protección pasiva obtenida con anticuerpos monoclonales anti-porina no fue muy alta, debido probablemente a la baja concentración en que fueron administrados.

La protección activa con las porinas de *S. typhi* probablemente se deba a la inducción de una respuesta inmune celular específica. De manera semejante a lo que sucede en el modelo murino de infección por *Listeria monocytogenes* (13) el mecanismo que se propone incluye la liberación de INF $\gamma$  e IL-2 por linfocitos TH1 antígeno-específicos, que activan macrófagos capaces de destruir bacterias, así como clones antígeno específicos de linfocitos CD8⁺ que ejercen actividad citotóxica sobre macrófagos infectados con *S. typhi*.

### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1 General.

- Evaluar la capacidad de las proteínas de membrana externa o porinas de *Salmonella typhimurium* y de *Salmonella typhi* para inducir respuesta proliferativa específica *in vitro* de linfocitos murinos.

#### 3.2 Específicos.

- Obtener proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* con el máximo grado de pureza posible.

- Obtener porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* con el máximo grado de pureza posible.

- Establecer el papel que juega el lipopolisacárido en relación a las porinas, en los modelos de activación de linfocitos *in vitro*.

- Obtener los patrones electroforéticos de proteínas de membrana externa de *S. typhi*.

- Purificar fracciones peptídicas de PME mediante separación por electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia a papel de nitrocelulosa.

- Utilizar suspensiones de papel de nitrocelulosa conteniendo PME para activar linfocitos inmunes en un modelo *in vitro*.

-A partir de péptidos de porinas identificar los determinantes antigénicos responsables de la inducción de la respuesta inmune celular.

#### 4. HIPOTESIS.

Dado el carácter intracelular de la infección por *Salmonella* y la falta de correlación de la respuesta humoral con el desarrollo de protección, la presencia de linfocitos T específicos debe ser primordial para el control del proceso infeccioso.

A pesar de que las porinas son las proteínas más abundantes en la membrana externa de *Salmonella*, en la infección juegan un papel secundario en la respuesta inmune, ya que otros antígenos están más expuestos. Sin embargo, son efectivas en la inducción de inmunidad protectora, pues en el caso de que las porinas sean administradas puras, inducirán mecanismos de cooperación más eficientes; tanto en la rama humoral como en la celular, mediante la producción de interferón gamma, que promoverá a su vez la activación de macrófagos.

Este fenómeno puede ser puesto en evidencia en modelo de activación *in vitro* de linfocitos, utilizando como antígeno PME separadas electroforéticamente y transferidas a papel de nitrocelulosa.

## 5. MODELO EXPERIMENTAL.

El presente trabajo pretende responder a las siguientes preguntas:

1. ¿ Las células linfoides murinas son capaces de reconocer a las porinas de *Salmonella* en el contexto de la bacteria completa ?
2. ¿ Las PME de *Salmonella typhi* son capaces de generar una respuesta inmune celular?
3. ¿ Las porinas purificadas de *Salmonella* generan respuesta inmune celular?
4. ¿ La activación *in vitro* de células linfoides es antígeno específica o se debe a lipopolisacárido contaminante?
5. ¿ En que porción de las porinas se encuentran los determinantes antigénicos inmunodominantes?

Para contestar a la primera pregunta, se inmunizaron ratones con *Salmonella typhimurium* inactivada con acetona, diez días después se obtuvieron células linfoides y se cultivaron en presencia de porinas; la activación se determinó mediante incorporación de ³HTDr. La segunda y tercera preguntas se contestaron inmunizando ratones con PME o porinas, respectivamente y cultivando las células linfoides en presencia de porinas. La pregunta cuatro se contestó cultivando células linfoides de ratones inmunizados con PME de *Salmonella typhi* en presencia de porinas y polimixina B, y estimulando poblaciones de linfocitos T, provenientes de ratones inmunes, con porinas en presencia de células presentadoras de

antígeno. La última cuestión se abordó al tratar las porinas con BrCN; los péptidos obtenidos fueron separados mediante SDS-PAGE y transferidos a papel de nitrocelulosa. De esta manera se evaluó su capacidad para activar linfocitos provenientes de ratones inmunizados con PME de *S. typhi*.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

#### 6.1.1. Ratones.

Se emplearon ratones NIH de ambos sexos de 10 a 15 semanas de edad, proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene; así como ratones BALB/c y C57Bl/6 hembras de 10 semanas de edad proporcionados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

La singenicidad de los ratones se comprobó mediante cultivo mixto de linfocitos y trasplantes de piel.

#### 6.1.2. Esquemas de inmunización.

a) Un grupo de ratones NIH recibió *Salmonella typhimurium* inactivada con acetona y resuspendida en solución salina fisiológica (SSF), 200 mil bacterias en 200  $\mu$ l por vía intraperitoneal el día cero, el día 10 se sacrificaron y se obtuvieron las células linfoides. Los ratones testigo recibieron SSF.

b) Un grupo de ratones NIH se inmunizaron con 100  $\mu$ g de porinas de *Salmonella typhimurium* en adyuvante completo de Freund (ACF) (Sigma Co.) en los cojinetes plantares el día cero. El día 10 se obtuvieron células linfoides. Los ratones testigo recibieron ACF en SSF.

c) Un grupo de ratones NIH, uno de ratones BALB/c y otro de C57Bl/6 recibieron PME de *S. typhi*, 30  $\mu$ g en SSF por vía intraperitoneal, los días cero y siete, el día 14 se obtuvieron las células linfoides. Los ratones testigo recibieron SSF.

## 6. 2. METODOS BACTERIOLOGICOS Y BIOQUIMICOS.

### 6. 2. 1. Cepas bacterianas.

Se emplearon las siguientes cepas : *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea; *Salmonella typhimurium* y *Salmonella typhi* 0901 donadas por el Instituto Nacional de Higiene y *Escherichia coli* K12 donada por el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos. La caracterización bioquímica de las bacterias se realizó en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la S. S. A.

### 6. 2. 2. Cultivo y cosecha de las cepas bacterianas.

Las bacterias empleadas para la obtención de FME y porinas se cultivaron a 37°C durante 8 h. (fase de crecimiento logarítmico) en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa, en un incubador rotatorio (New Brunswick Scientific Co.) a 200 rpm. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1650 x g durante 15 min. a 4°C (Sorval, Ins.). La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

Las bacterias empleadas para la obtención de LPS se cultivaron durante 18 h a 37°C en tioglicolato de sodio (Bioxon); posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación, la pastilla bacteriana se secó con acetona y se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

### 6.2.3. Obtención y purificación de las proteínas de membrana externa (PME).

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman (119), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una absorbancia de 1.0 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación a 180 watts (Labline Ultratrip Labsonic System Sonicator) por períodos de 2 min en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.3. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, ésta se centrifugó a 7,000 xg durante 15 min. del sobrenadante se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a 200,000 xg/45 min a 4°C (L8 80 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.), esta 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 xg/45 min./37°C Las PME se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron.

### 6.2.4. Obtención y purificación de porinas.

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (91). Los pasos hasta la obtención de las membranas son los mismos que para la obtención de PME.

La pastilla conteniendo las membranas celulares se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de SDS al 2% y se incubó 30 min a

32°C, y se ultracentrifugó nuevamente.

El sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente y por ultracentrifugación se obtuvo la peptidoglicana, las proteínas unidas a ella se extrajeron incubando 2 h a 37°C con tris 50 mM, pH 7.7 adicionado de 2% de SDS, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y 0.05% de β-mercaptoetanol; después de centrifugar a 100 000 xg/30 min/25°C; el sobrenadante se pasó a través de una columna de 80 x 2.6 cm de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 ml/h. Se recuperaron fracciones de 3 ml en un colector (LKB Instruments.) y las correspondientes a las porinas se dializaron exhaustivamente contra Hepes 0.01 M, se filtraron por 0.2 μ (Millipore), se caracterizaron electroforéticamente, se les determinó la concentración de proteína y lipopolisacárido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### 6.2.5. Digestión de porinas.

La digestión de porinas se realizó según lo describe Titani (133). Dentro de la campana de extracción de gases se colocaron un aproximadamente 100 mg de BrCN dentro de un vial de vidrio, se taparon y se trasladaron hasta la balanza analítica en donde se determinó su peso exacto.

Se adicionó 1 ml de ácido fórmico al 70% al vial que contenía al BrCN, teniendo a mano 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).

Esta solución que se adicionó a un segundo vial, en el cual se habían depositado 1 mg de porinas de *S. typhi* previamente liofilizadas. Se agitó la mezcla, y se tapó perfectamente, prote-

giéndola de la luz con una envoltura de papel aluminio.

Transcurridas 20 hrs la mezcla de reacción se dializó exhaustivamente contra PBS pH 7.4.

#### 6.2.6. Antígenos en papel de nitrocelulosa.

Se prepararon los papeles de nitrocelulosa para ser utilizados en cultivo de acuerdo al método descrito por Abou-Zeid (1). Una vez realizada la electroforésis en SDS-PAGE y la electrotransferencia de las PME o los péptidos, se localizaron y recortaron las bandas proteicas, se lavaron exhaustivamente para eliminar el colorante, en seguida se recortó en trozos muy finos cada banda por separado y se colocaron en tubos de cultivo estériles, se adicionó 1 ml de dimetilsulfóxido y se incubó 1.30 h. Después se resuspendió el papel adicionando muy lentamente amortiguador de carbonatos pH 9.5 estéril. Se hicieron tres lavados con Hank's y se guardaron a 4°C hasta emplearlos.

#### 6.2.7. Obtención de lipopolisacárido (LPS).

Se realizó de acuerdo al método descrito por Westphal (150).

Se utilizó *Salmonella typhi* 0901. Una vez que se obtuvieron bacterias de acuerdo al método descrito. Se inactivaron agregando seis volúmenes de acetona a la pastilla bacteriana y dejando que se evaporara. La pastilla bacteriana se resuspendió en agua destilada y se agregó un volumen igual de fenol al 95%, la mezcla se agitó fuertemente a 56 °C durante 15 minutos, se enfrió a 10°C y se centrifuga a 3,000 rpm durante 45 minutos. Se obtuvieron dos fases una fenólica y otra acuosa y la pastilla bacteriana. Se colectó la fase acuosa y se realizaron dos extracciones más. La

fase acuosa se dializo exhaustivamente y se ultracentrifugó a 100,000 x g durante 4 horas. La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada, se determinó la concentración de azúcares por el método de fenól-ácido sulfúrico, se liofilizó y se guardó a 4 °C hasta su uso.

### 6.3. METODOS ANALITICOS.

#### 6.3.1. Determinación de Lipopolisacárido (LPS).

El contenido de LPS presente en las preparaciones de PME y porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto 3-manooctulónico (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis (54), empleando una curva patron mediante un estandar de KDO (Sigma Co.). El método consiste en el tratamiento de la muestra problema con ácido sulfúrico 0.2 N a 100 °C durante 30 minutos para liberar el LPS, posteriormente la muestra se hace reaccionar con ácido peryódico, arsenito de sodio y ácido tiobarbitúrico. El compuesto colorido rojo que se forma se mantiene a temperatura ambiente y en solución agregando dimetilsulfóxido. El color se determina a 548 nm.

#### 6.3.2. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas tanto en las preparaciones de PME (obtenidas por Schnaitman) como en las de porinas purificadas (Nikaido); se realizó de acuerdo al método de Lowry (68) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

### 6.3.3. Electroforésis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de PME y porinas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo al método de Laemmli (63). Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2 %,  $\beta$ -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 amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel separador contenía 11.2 % de acrilamida, 2.5 % de bis-acrilamida, 0.19 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante aproximadamente 6 h, empleando 30 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 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fué transparente.

### 6.3.4. Electrotransferencia.

La electrotransferencia de péptidos y porinas de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Towbin (134) 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).

#### 6.4. METODOS INMUNOLOGICOS.

##### 6.4.1. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-PME y anti-porinas en el suero de los ratones se empleó el método de ELISA, de acuerdo al método descrito por Engvall (29).

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), con 100  $\mu$ l/pozo de una solución de 5  $\mu$ g/ml de PME, porinas y LPS en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio pH 9.6), 2 hrs, a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó dos veces con PBS-Tween al 0.1% (PBS-T) y se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-leche al 2%) y se dejaron dos horas a 37°C, luego, se agregaron 100  $\mu$ l de los sueros problema y se incubó la placa durante 2.0 h a 37°C; después de cuatro lavados con PBS-T se agregaron 100  $\mu$ l del conjugado (inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas a peroxidasa (Sigma Co.) y se incubó la placa 1.5 h a 37°C; después de 4 lavados con PBS-T se agregaron 100  $\mu$ l de solución de sustrato (o-fenilendiamina, H₂O₂ en amortiguador de citratos pH 5.6) y a los 20 min, la reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l de ác. sulfúrico 2.5 N. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatec).

#### 6.4.2. Obtención y cultivo de células linfoides.

Los bazos o gánglios linfáticos de los ratones inmunes y testigos se obtuvieron en condiciones de esterilidad, se depositaron en una caja de petri conteniendo 5 ml de solución de Hanks. Dentro de una campana de flujo laminar, con el objeto de liberar las células esplénicas, se disgregaron los tejidos haciéndolos pasar por una malla de tela de organdi, la suspensión así obtenida, se lavó tres veces con solución de Hanks, a 1200 rpm/10 min ; en la segunda lavada se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio 0.16 M (90 ml) y tris-HCl 0.17 M (10 ml) pH 7.65 ; Por último, el sedimento celular se resuspendió en medio RPMI-1640 o Dulbecco modificado por Eagle (DME) complementado con Gentamicina 10 ug/ml, 2 Beta-mercapto-etanol  $5 \times 10^{-5} M$ , L-Glutamina 2 mM, Penicilina 200 u/ml y SFB 10%. El número de células viables se contó en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripano.

#### 6.4.3. Obtención de linfocitos T.

Se obtuvieron linfocitos T mediante columnas de nylon de acuerdo al método descrito por Trizio (135), según el siguiente modelo experimental:

Se extrajeron bazos de ratones NIH y C57Bl/6 inmunizados con PME de *S. typhi* y de ratones testigo, se obtuvieron las células linfoides y se introdujeron a una columna de nylon de 5 ml, conteniendo 20 mg de nylon, previamente equilibrada con RPMI-1640 al 10% de SFB a 37°C y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 45 minutos, las células no adherentes se eluyeron con RPMI-1640 a 37°C y se concentraron mediante centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos. La pureza de las poblaciones obtenidas se evaluó mediante

inmunofluorescencia con anticuerpos contra Igs de ratón, cultivo mixto de linfocitos y activación por mitógenos. En todos los casos fué mayor al 95%.

#### 6.4.4. Obtención de Células presentadoras de antígeno.

Se obtuvieron células de exudado peritoneal de ratones NIH y C57Bl/6 y se cultivaron en placas de 96 pozos durante dos días, después de los cuales se trataron con mitomicina C, 2µg por cada millón de células, durante 20 minutos y se lavaron los pozos exhaustivamente con solución de Hanks.

Cuando se hicieron experimentos con ratones NIH se utilizaron células de bazo autólogas tratadas con Mitomicina C.

#### 6.4.5. Ensayos de activación *in vitro* por mitógenos.

Las células linfoides purificadas se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, se cultivaron entre 500 ml y 100 ml células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano (NUNC) y se agregaron concentraciones de Concanavalina A tipo IV-S (Sigma Co.) entre 5 y 100 µg/ml o LPS entre 5 y 50 µg/ml en RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB.

#### 6.4.6. Ensayos de activación antígeno-específicos.

Se cultivaron 200 ml células por pozo, en placas de microcultivo de 96 pozos (NUNC) de fondo plano, en un volumen de 200 µl de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 5 días, y utilizando como antígenos: porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* a una concentración de entre 5 y 100 µg/ml,

Como testigo se usó Concanavalina A a una concentración de 10 µg/ml y LPS a 5 µg/ml. En las últimas 18 hrs. del cultivo se agregó 1 uCi de ³HTDr (Amersham International 5 mCi de actividad específica). Finalmente, se usó un cosechador semiautomático (Mini-Mash II) y la incorporación de timidina se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 580).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado adicionando las porinas de las diferentes enterobacterias solubilizadas en un amortiguador de HEPES en volúmenes de 20 µl. Se calcularon la media, la desviación estandar y el error estandar para cada triplicado y los resultados se presentan en coeficientes de estimulación. Para lo cual, en primer lugar se determinan los índices de estimulación que consisten en dividir las cuentas por minuto de las células en presencia de estímulo antigénico entre las cuentas por minuto de las células en ausencia de cualquier estímulo (fondos); Al dividir los índices de estimulación de los ratones inmunes entre los índices de estimulación de los ratones testigos se obtiene el coeficiente de estimulación.

#### 6.4.7. Evaluación de la activación de linfocitos mediante dimetiltiazol-difenil bromuro de tetrazolium (MTT).

El método se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales de las células viables de transformar la sal de tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium en su derivado azul de formazan.

El ensayo se realizó de acuerdo a una modificación al método descrito por Mosmann (83).

Se obtuvieron esplenocitos como se describió anteriormente, se cultivaron a una concentración entre 100 y 500 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos en 200  $\mu$ l en DEM suplementado al 10% de SFB en presencia de 10  $\mu$ g/ml de Concanavalina A, como se describió anteriormente, durante 3 días, al término de las cuales se agregaron 20  $\mu$ l de una solución de MTT 5mg/ml en SSF y se continuó la incubación durante seis horas. Posteriormente se descartaron 100  $\mu$ l de los pozos de microcultivo y se restituyeron con dimetilsulfóxido 1X, se agitaron las placas durante 20 minutos a 37 °C y se leyó la D.O. a 490 nm en un lector de ELISA (Mini-reader II, Dynatec).

#### **6.4.8. Ensayo de proliferación de esplenocitos con porinas transferidas a papel de nitrocelulosa.**

Se colocaron 200 mil células por pozo en placas de 96 pozos de microcultivo en 200  $\mu$ l. Se agregaron concentraciones de porinas de 30  $\mu$ g/ml, o bien diluciones dobles de las suspensiones de papel de nitrocelulosa conteniendo las diferentes bandas de PME o los péptidos. Las células se cultivaron 5 días a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Durante las últimas 18 horas de cultivo se agregó a cada pozo 1  $\mu$ Ci de ³HTDr y al final de la incubación se cosecharon. La incorporación de ³HTDr se determinó en un contador de centelleo líquido.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ANTIGENOS.

#### 7.1.1. Proteínas de Membrana Externa.

De acuerdo al método de Schnaitman (119), se obtuvieron PME de *S. typhi* 9,12,d:V1. El comportamiento electroforético de las PME en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) es consistente con lo reportado anteriormente (47) y se muestra en la figura 7.1 las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares desde 14 KDa hasta 70 KDa, las proteínas entre 36 KDa y 41 KDa corresponden a las proteínas formadoras de canales o porinas.

#### 7.1.2. Porinas.

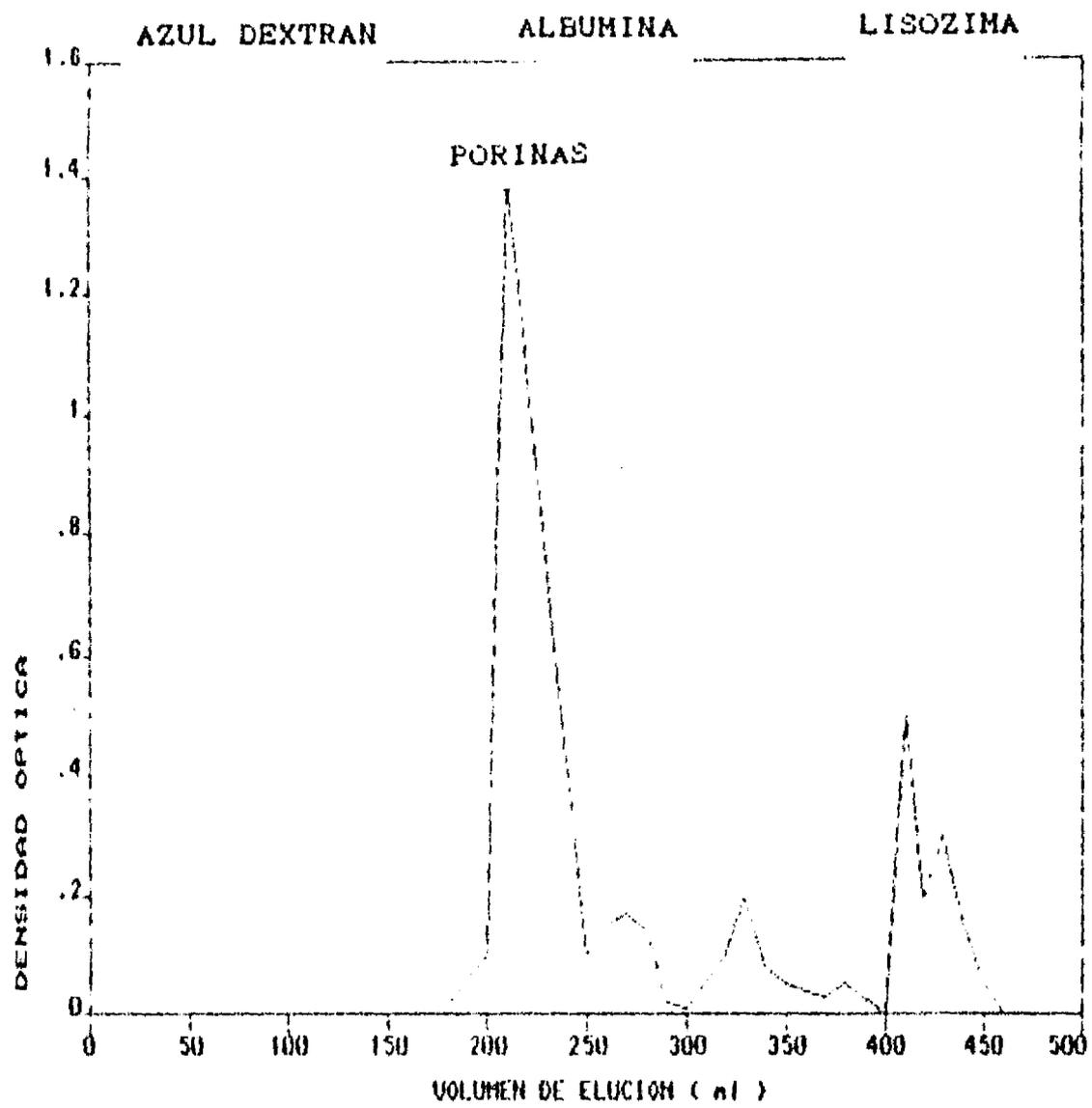
La obtención de porinas mediante la técnica de Nikaido (90) se fundamenta en el hecho de que esas proteínas se encuentran unidas por enlaces iónicos a la peptidoglicana, por lo tanto se pueden separar de ésta mediante la solubilización en un amortiguador que contenga SDS y 0.5 M de NaCl. Las proteínas así obtenidas se purifican mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-200.

La columna de Sephacryl S-200 se calibró con albúmina, azul dextrán y lisozima; el volumen de exclusión fue de 150 ml, aproximadamente. En la figura 7.2. se muestra el perfiles cromatográficos de las porinas de *S. typhi*; el comportamiento cromatográfico de *S. typhimurium* y *E. coli* fue muy semejante. La fracción que eluyó inmediatamente después del volumen de

**FIGURA 7.1**

COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS PME DE *Salmonella typhi*

FIGURA 7.2.  
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LAS PME DE *Salmonella typhi*.



exclusión contenía las porinas probablemente en forma de trimeros (114 KDa a 123 KDa), pues al realizar SDS-PAGE (figura 7.3) se obtuvieron dos bandas proteicas de 38 KDa a 41 KDa.

El método de Karkhanis (54) para determinar el LPS, no fue suficientemente sensible para detectar LPS en las porinas obtenidas por cromatografía. Sin embargo, cuando en otros trabajos se ha empleado una técnica más sensible, como es la determinación de ácido  $\beta$ -hidroximirístico por HPLC, se ha encontrado que la contaminación por LPS es del 0.01% aproximadamente (14).

#### 7.1.3. Péptidos.

El patrón electroforético de los péptidos obtenidos por digestión con BrCN se presenta en las figuras 7.4 y 7.5. Al teñir con azul de Coomassie aparecen cuatro bandas y al teñir con plata se observan siete.

El peso molecular de cada péptido se calculó construyendo una curva de calibración con sustancias de peso conocido de acuerdo a la medición de la distancia recorrida por los éstos.

Interpolando en la curva patrón, el *Rf* promedio de varias electroforesis para los péptidos, se determinaron los pesos moleculares de cada uno de los mismos (tabla 7.1).

La determinación de la concentración de péptidos obtenida tras la digestión se realizó mediante el método de Lowry (68). La concentración de péptidos así obtenida fue de 500  $\mu\text{g/ml}$ .

**FIGURA 7.3.**  
**COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS PORINAS**  
**DE *Salmonella typhi*.**

FIGURA 7. 4.  
COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE LOS PEPTIDOS DE PORINAS  
DE *Salmonella typhi*.  
TINCION CON AZUL DE COOMASIE.

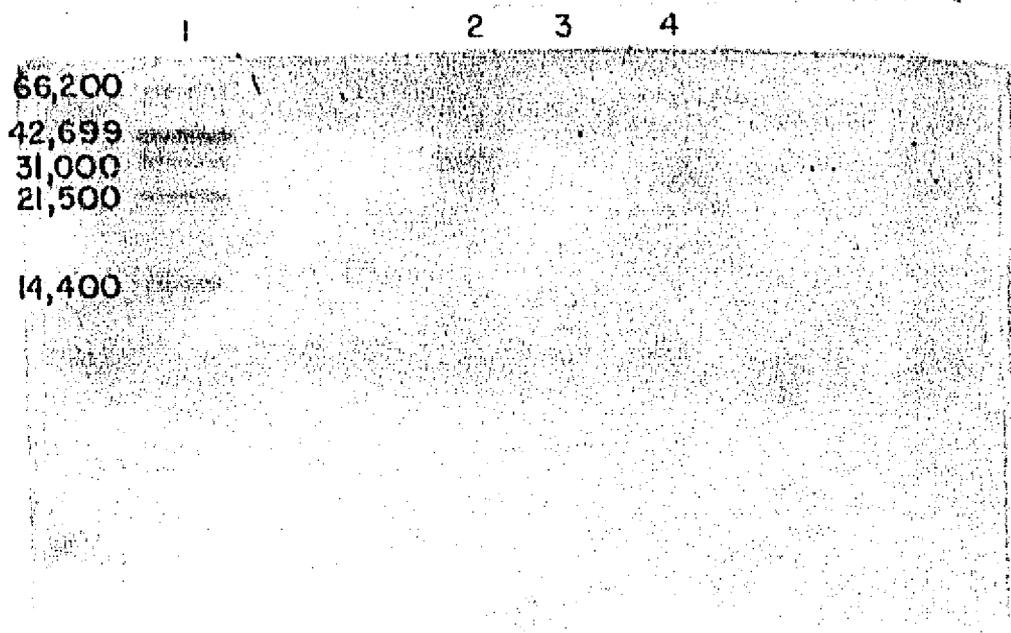
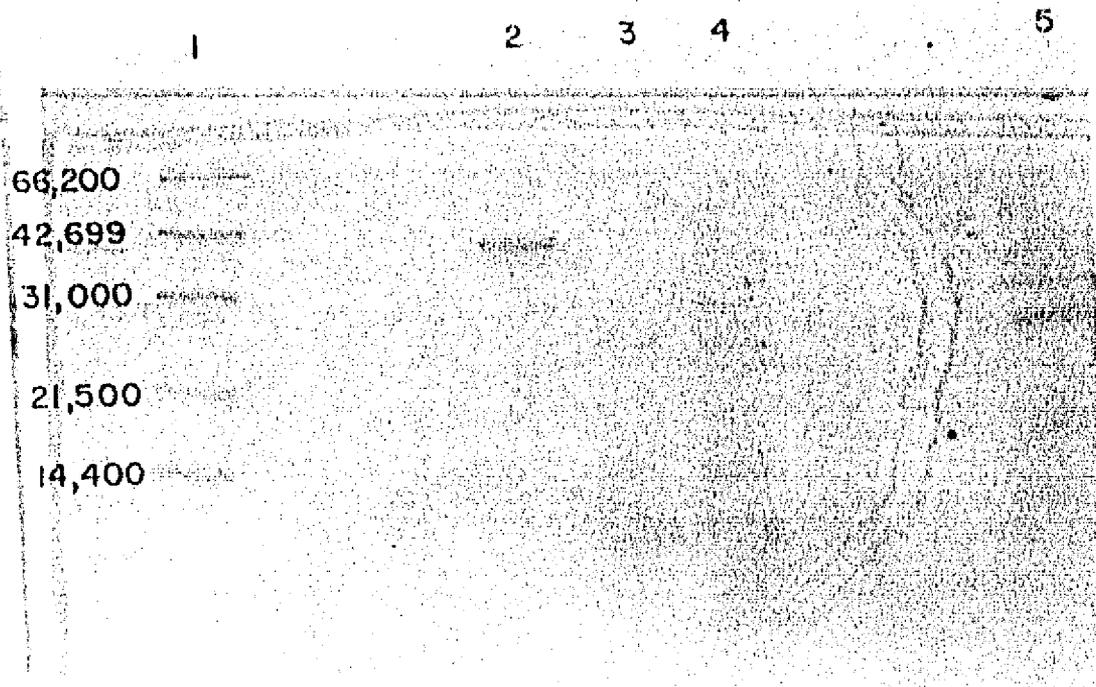


FIGURA 7. 5.  
COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE LOS PEPTIDOS DE PORINAS  
DE *Salmonella typhi*.  
TINCION CON NITRATO DE PLATA.



**TABLA 7.1**  
**PESO MOLECULAR APROXIMADO DE LOS PEPTIDOS DE PORINAS**  
**DE *Salmonella typhi*.**

PEPTIDO	LONGITUD RECORRIDA	Rf	PM (Da)
1	2.1 cm	0.1500	28,983
2	3.0	0.2142	19,040
3	3.4	0.2429	15,791
4	4.4	0.3143	9,902
5	4.6	0.3286	9,018
6	4.8	0.3429	8,213
7	5.2	0.3734	6,816

## 7.2. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO.

### 7.2.1. Estimulación de linfocitos por concanavalina A.

Para determinar las condiciones de cultivo de las células linfoides se realizaron ensayos de estimulación con mitógenos.

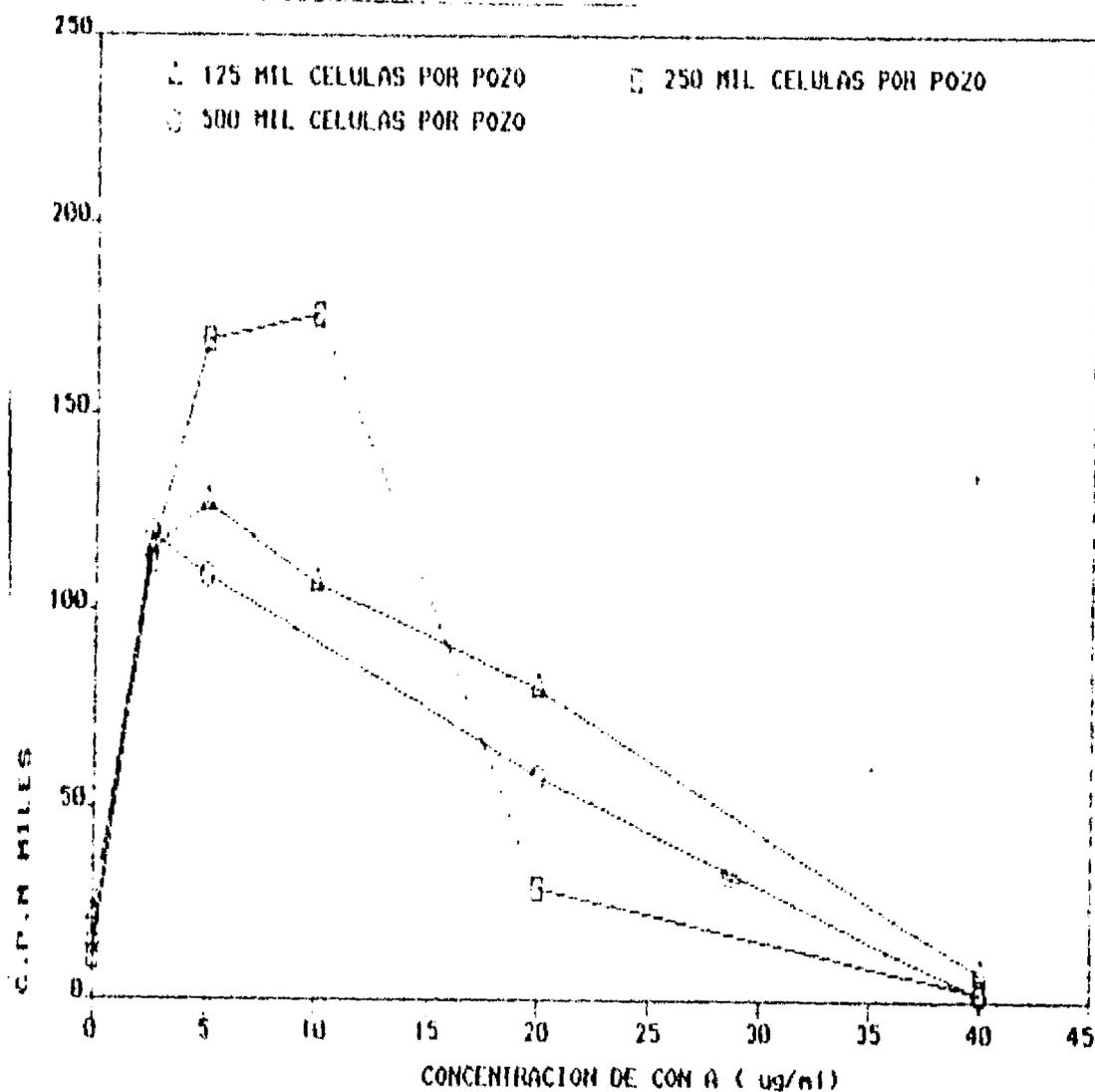
Las figuras 7.6 y 7.7 muestran los resultados de dos experimentos ilustrativos de estimulación de linfocitos mediante Con A, utilizando células de bazo o de ganglios linfáticos, respectivamente. La concentración óptima del mitógeno fue de 10 a 25  $\mu\text{g/ml}$ . La mayor estimulación se obtuvo con 500 mil células por pozo, pero con 200 mil fue muy aceptable. Con estas dos concentraciones de con A se montaron experimentos para determinar los días de cultivo óptimos para obtener la mayor estimulación. En la figura 7.8 se presentan los resultados de un experimento donde se cultivaron 200 mil células por pozo y se cosecharon entre el cuarto y el noveno día, la mayor activación se encontró en el quinto día de cultivo.

Se determinó la concentración de SFB adecuada. En la figura 7.9 se muestran los resultados para dos experimentos diferentes. En ambos casos se cultivaron 200 mil esplenocitos por pozo durante cinco días. La concentración óptima de SFB fue del 10%.

Por último, se evaluó la capacidad de diferentes lotes de SFB de promover la estimulación por mitógenos. En la tabla 7.2 se presentan dos experimentos representativos utilizando Con A a 10  $\mu\text{g/ml}$  y SFB al 10 y 20%.

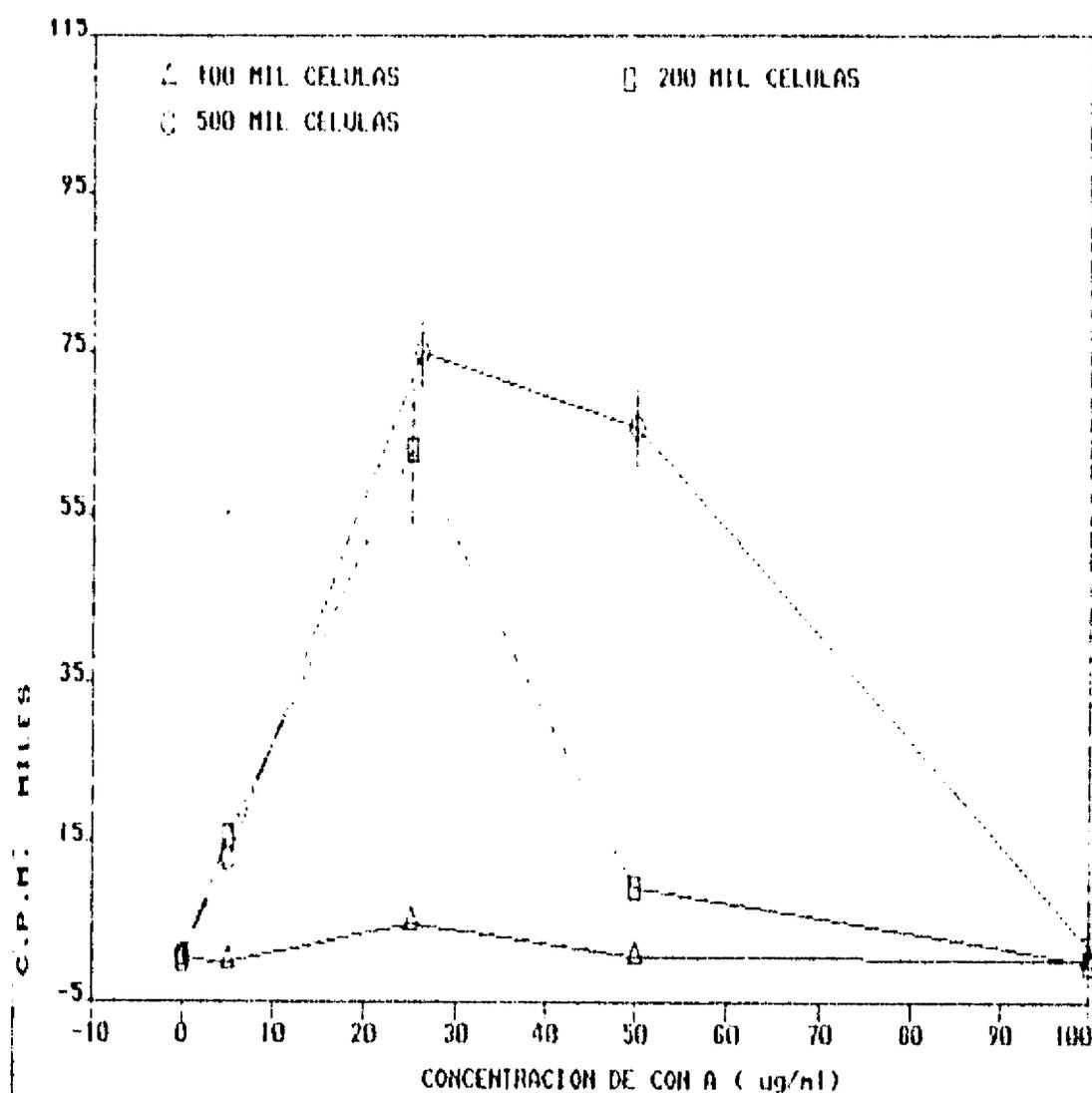
En resumen, se decidió utilizar las siguientes condiciones de cultivo: 200 mil células por pozo, en un volumen de 200  $\mu\text{l}$  durante cinco días de cultivo y SFB al 10%, a 37°C, con 6% de  $\text{CO}_2$  y atmósfera húmeda y Con A a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

**FIGURA 7.6.**  
**ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS DE RATON NIH POR**  
**CONCAVALINA A.**



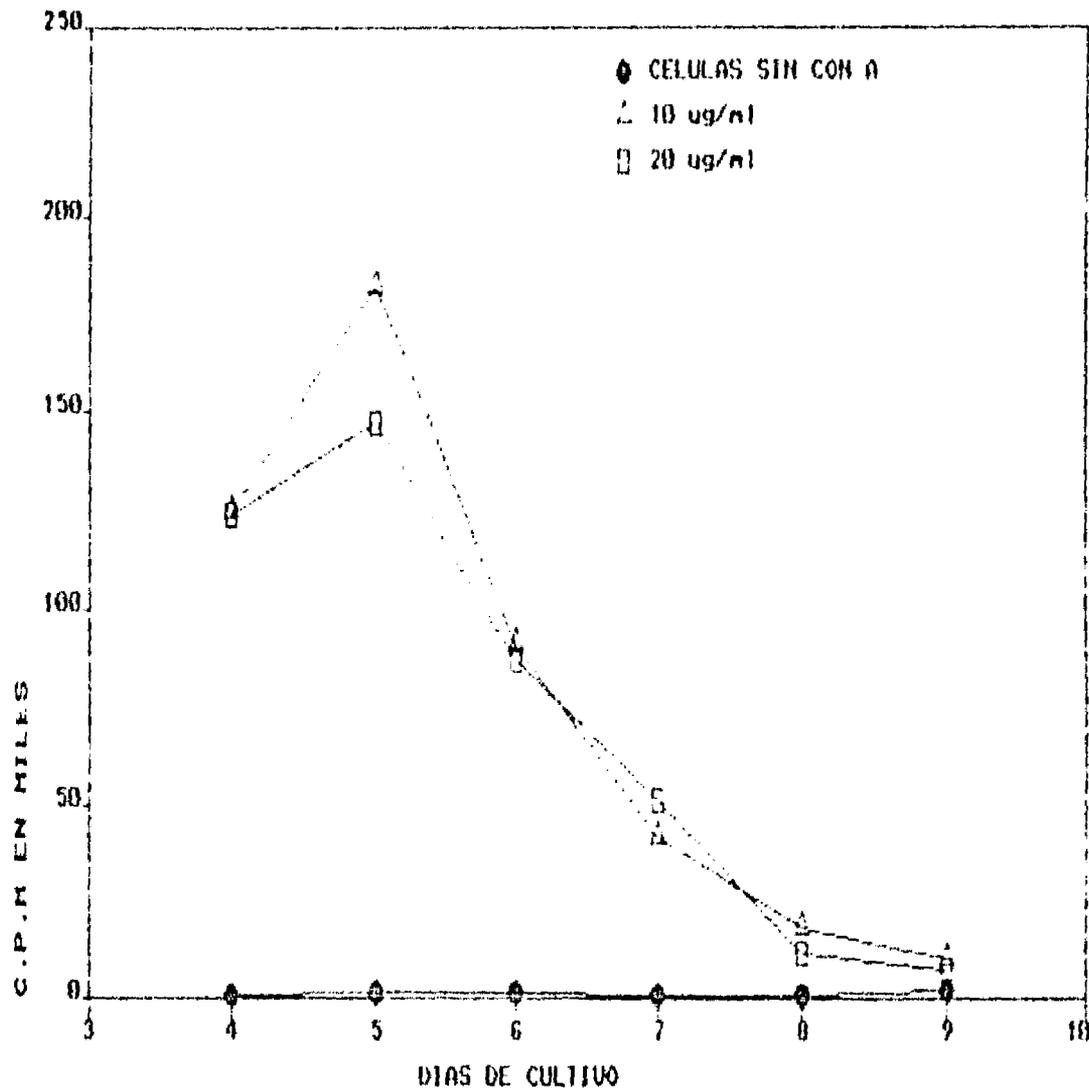
Se obtuvieron células de bazo de ratones NIH normales de 15 a 20 gr, de ambos sexos, y se cultivaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano, entre 500 a 100 mil células adicionando concentraciones de concanavalina entre 0 a 100 µg/ml en un volumen final de 200 µl en RPMI-1640 suplementado con l-glutamina y β-2-mercaptoetanol, penicilina y gentamicina y 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB). Los cultivos se suspendieron al quinto día, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. El grado de activación se determinó midiendo la incorporación del material radiactivo, en un contador de centelleo líquido, los resultados son las medias de triplicados y están expresados en cuentas por minuto (c.p.m.). Todos los experimentos se realizaron por lo menos por triplicado.

FIGURA 7.7.  
ESTIMULACION DE LINFOCITOS DE GANGLIO DE RATON NIH POR  
CONCAVALINA A.



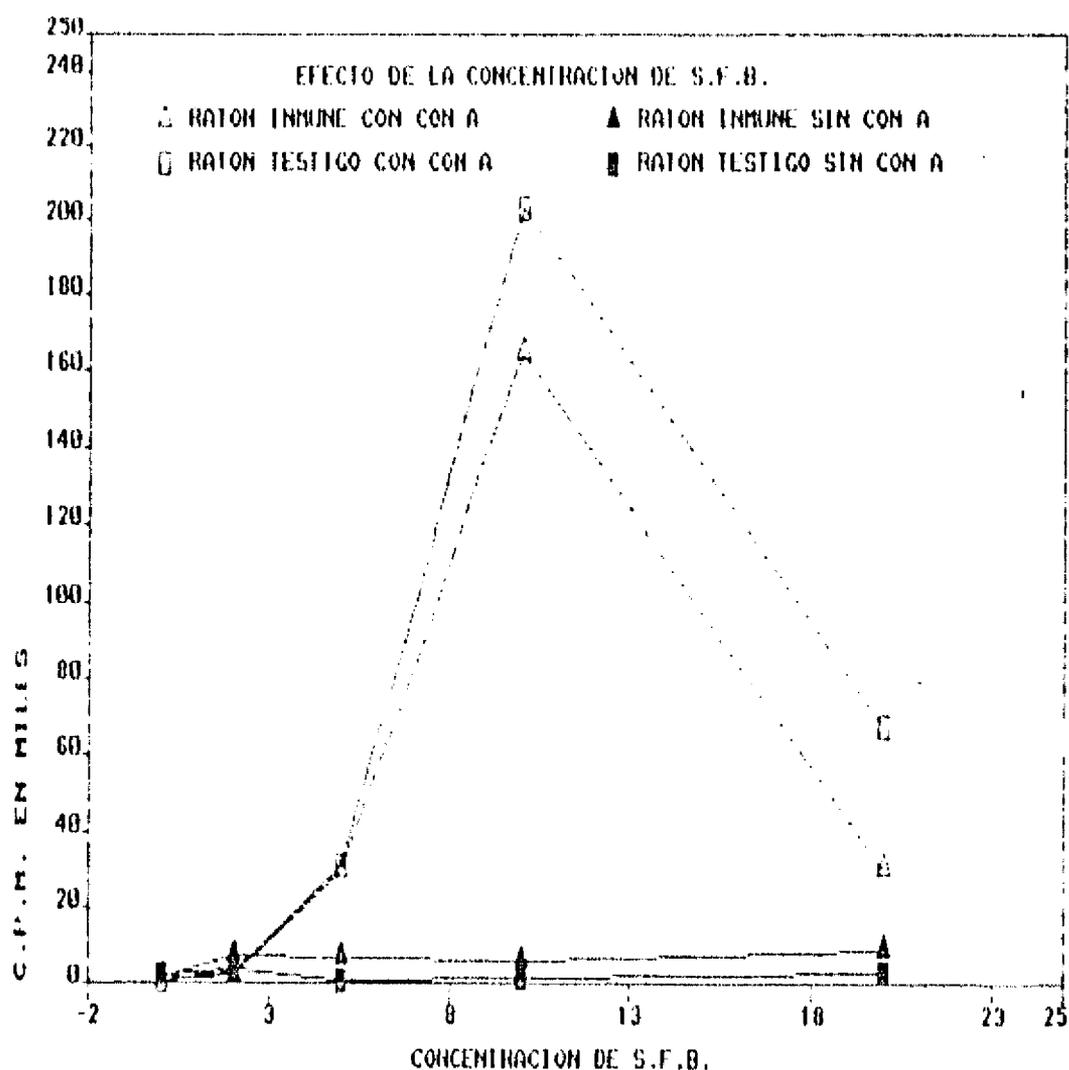
Se obtuvieron células de ganglios linfáticos de ratones NIH normales de 15 a 20 gr, de ambos sexos, y se cultivaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano, entre 500 a 100 mil células adicionando concentraciones de concanavalina entre 0 a 100  $\mu\text{g/ml}$  en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  en RPMI-1640 suplementado con l-glutamina y  $\beta$ -2-mercaptoetanol, penicilina y gentamicina y 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB). Los cultivos se suspendieron al quinto día, 18 horas antes se agregó 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{HTDr}$  por pozo. El grado de activación se determinó midiendo la incorporación del material radiactivo, en un contador de centelleo líquido, los resultados son las medias de triplicados y están expresados en cuentas por minuto (c.p.m.).

**FIGURA 7. 8.**  
**ESTIMULACION DE ESLENOCITOS DE RATON NIH POR**  
**CONCAVALINA A SEGUN LOS DIAS DE CULTIVO**



Se obtuvieron células de bazo de ratones NIH normales de 15 a 20 gr, de ambos sexos, y se cultivaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano, 200 mil células adicionando 10 o 20  $\mu\text{g/ml}$  concanavalina A en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  en RPMI-1640 suplementado con l-glutamina y  $\beta$ -2-mercaptoetanol, penicilina y gentamicina y 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB). Los cultivos se suspendieron entre el cuarto y noveno días, 18 horas antes se agregó 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{HTDr}$  por pozo. El grado de activación se determinó midiendo la incorporación del material radiactivo, en un contado de centelleo líquido, los resultados son las medias de triplicados y están expresados en cuentas por minuto (c.p.m.). Todos los experimentos se realizaron por lo menos por triplicado.

**FIGURA 7.9.**  
**ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS DE RATON NIH POR**  
**CONCAVALINA A.**



Se obtuvieron esplenocitos de dos ratones NIH de 17 gr, se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano a una concentración de 200 mil células por pozo en medio RPMI-1640 suplementado con  $\beta$ -2-mercaptoetanol, L-glutamina, penicilina y gentamicina y a diferentes concentraciones de SFB. Se agregó concanavalina A a 10  $\mu$ g/ml. El cultivo se interrumpió a los cinco días. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr, la incorporación se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se encuentran expresados en C. P. M.

**TABLA 7. 2**  
**ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR CONCAVALINA A**  
**EFEECTO DE DIFERENTES LOTES DE SFB.**

RATON 1	SUERO AL 10%			
	A		B	
	MEDIA	D. E.	MEDIA	D. E.
SIN CON A	1303	215	1337	1507
CON A 10 ug/ml	129147	29082	134535	40923
RATON 2				
SIN CON A	1647	324	1112	801
CON A 10 ug/ml	252787	46243	292197	89233
RATON 1	SUERO AL 20%			
	A		B	
	MEDIA	D. E.	MEDIA	D. E.
SIN CON A	1420	326	3042	918
CON A 10 ug/ml	120028	68338	77333	51086
RATON 2				
SIN CON A	1373	595	808	647
CON A 10 ug/ml	70622	20773	52849	15084

Se obtuvieron esplenocitos de dos ratones NIH de 17 gr, se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano a una concentración de 200 mil células por pozo en medio RPMI-1640 suplementado con  $\beta$ -2-mercaptoetanol, L-glutamina, penicilina y gentamicina y a la concentración de SFB que se indica en la tabla. Se agregó concanavalina A a 10  $\mu$ g/ml. El cultivo se interrumpió a los cinco días. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr, la incorporación se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se encuentran expresados en C. P. M.

### 7.2.2. Comparación de la incorporación de $^3\text{HTDr}$ y el método colorimétrico utilizando MTT.

Se ha descrito que la utilización del MTT es una alternativa para evaluar la activación de linfocitos, pues éste tiene la propiedad de unirse a las proteínas de la cadena respiratoria de las mitocondrias en las células que presentan actividad metabólica formando un compuesto colorido, (83) lo que tiene la ventaja de no ser necesaria la utilización de  $^3\text{HTDr}$  que es un reactivo más caro y de manejo delicado.

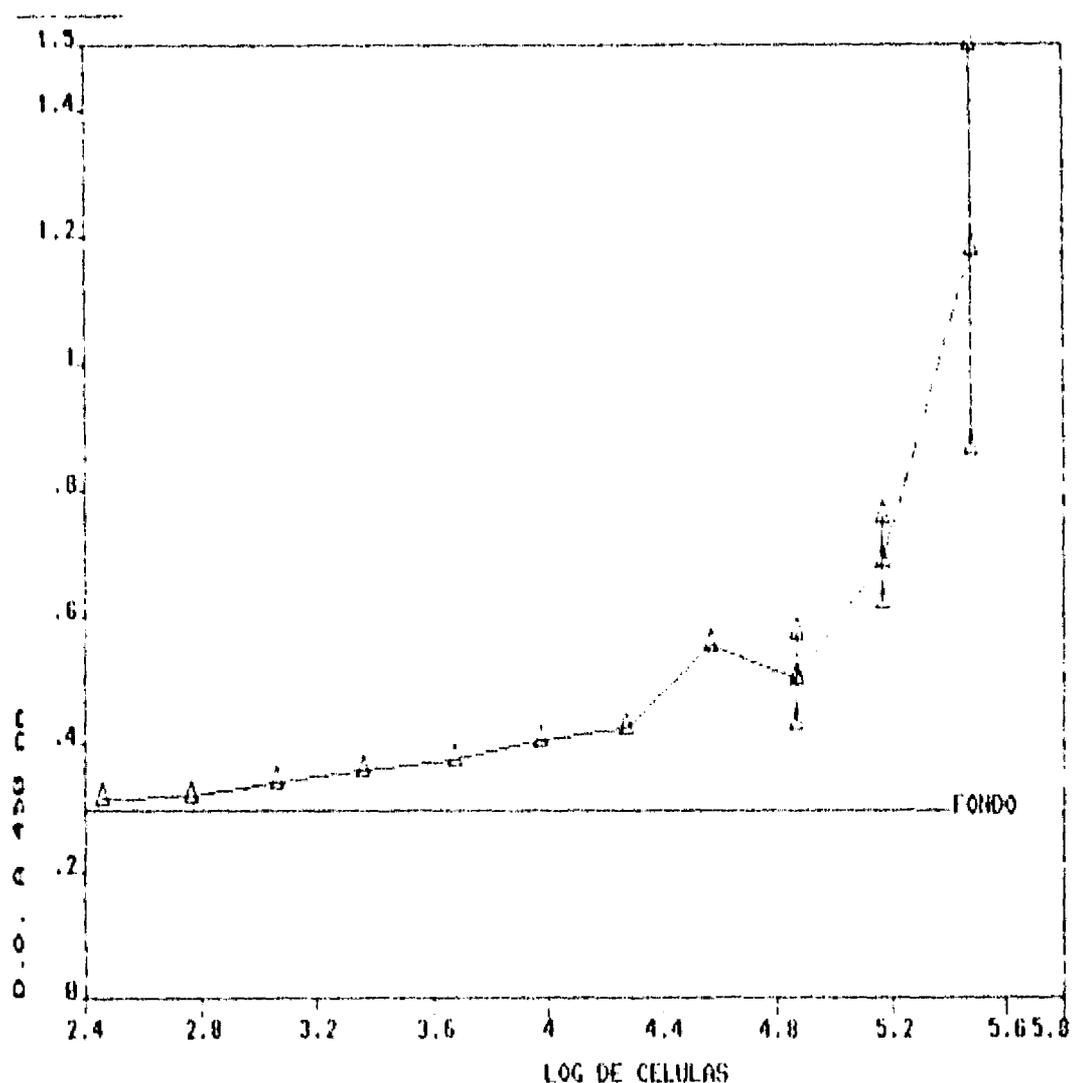
Se compararon ambas técnicas para decidir cual era la mejor a utilizar en los ensayos de estimulación antigénica específica.

Primeramente se trató de determinar el número de células por pozo que el método del MTT es capaz de detectar, las figuras 7.10. A y 7.10. B muestran un experimento ilustrativo donde se cultivaron entre 40 mil y 400 mil células de timoma murino BW5147 en placas de 96 pozos durante 4 horas, al término de las cuales se agregó MTT, se incubaron 4 horas más y se determinó la densidad óptica a 450 y 490 nm. Se observa que existe una relación lineal entre el número de células y la densidad óptica, la diferencia con respecto al fondo comienza a ser importante a partir de 20 mil células por pozo.

Habiendo establecido que mediante el MTT es posible determinar el número de células viables en microcultivo, se realizaron experimentos tratando de comparar esta técnica con la incorporación de  $^3\text{HTDr}$  en los ensayos de estimulación por mitógeno. En las figuras 7.11. A y 7.11. B se presenta un experimento representativo.

Se cultivaron 400, 200, 100 y 50 mil células por pozo en microplacas de 96 pozos de fondo redondo, adicionando concentra-

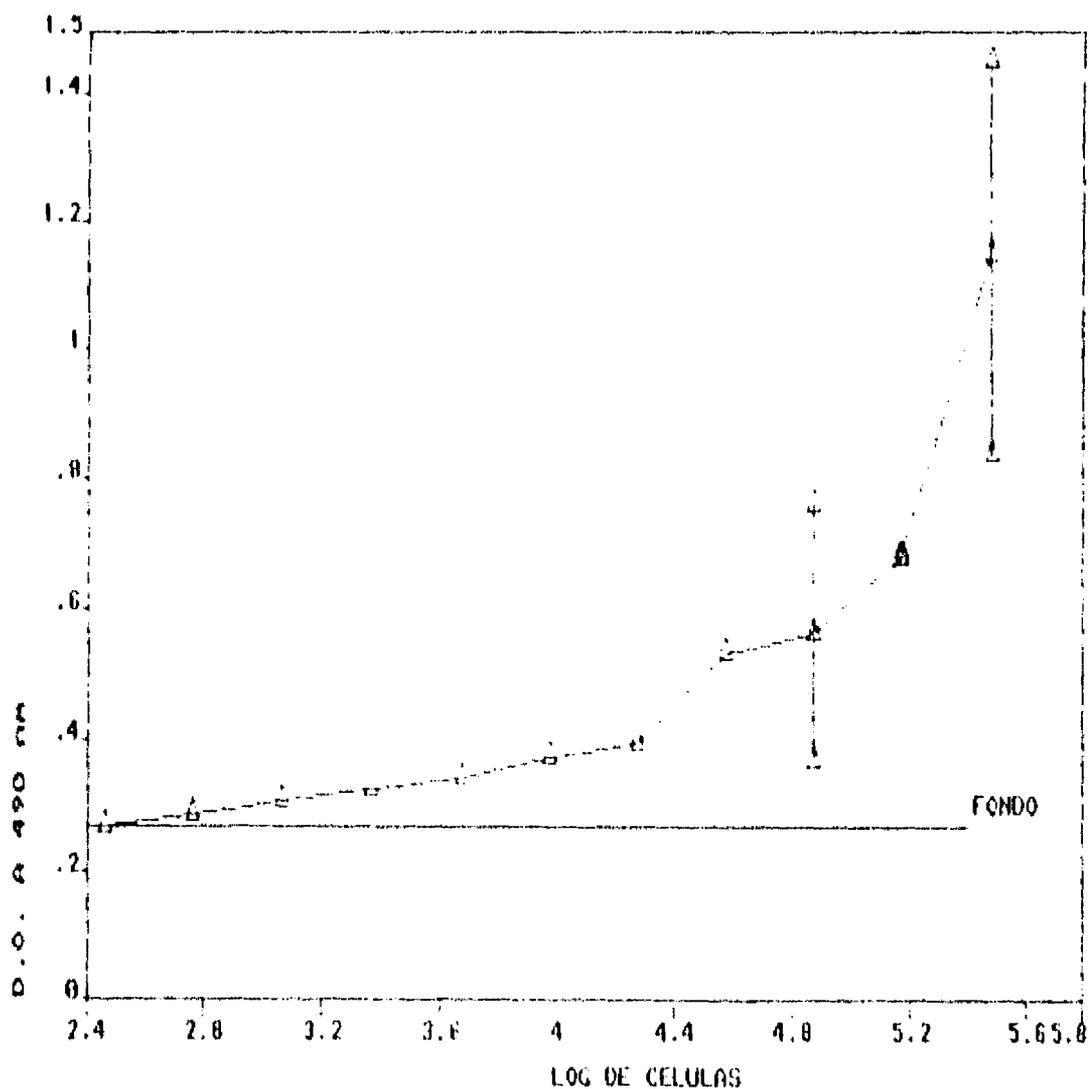
FIGURA 7. 10. A  
DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS POR MTT.



Se cultivaron células BW5147 en cajas de microcultivo de 25 cm² en DME suplementado con SFB al 10%, β-2-mercaptoetanol, penicilina y gentamicina. Se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con HBSS. Se cultivaron diferente número de células en placas de 96 pozos de fondo redondo en un volumen final de 200 μl, agregando 20 μl de una solución de 5 mg/ml de MTT en PBS durante 4 horas. Al final del cultivo se eliminaron 100 μl y se remplazaron por dimetilsulfóxido, se incubaron 30 minutos al final de los cuales se agitaron los pozos y se leyeron a 450 nm.

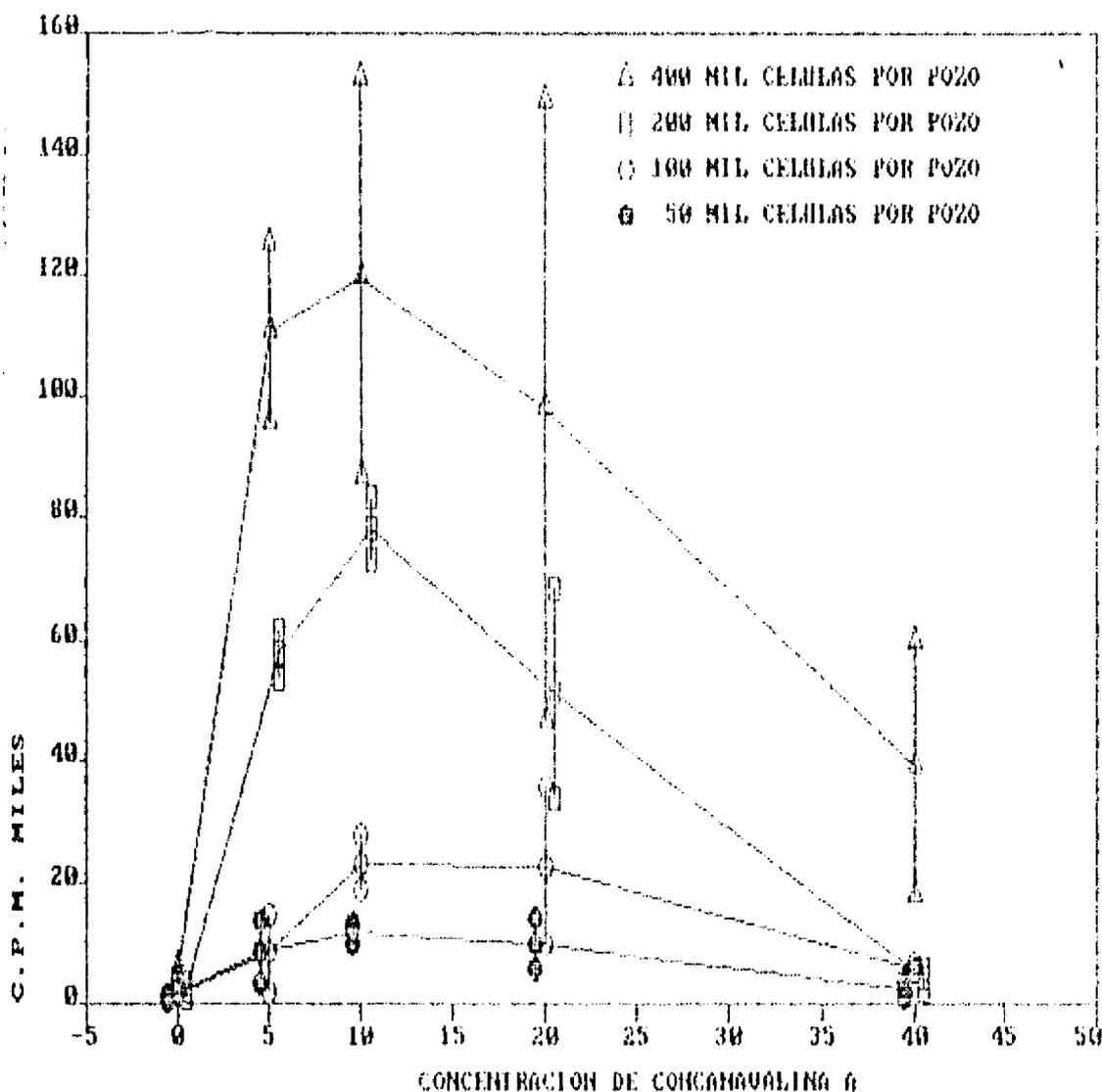
## FIGURA 7. 10. B.

DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS POR MTT.



Se cultivaron células BW5147 en cajas de microcultivo de 25 cm² en DME suplementado con SFB al 10%,  $\beta$ -2-mercaptoetanol, penicilina y gentamicina. Se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con HBSS. Se cultivaron diferente número de células en placas de 96 pozos de fondo redondo en un volumen final de 200  $\mu$ l, agregando 20  $\mu$ l de una solución de 5 mg/ml de MTT en PBS durante 4 horas. Al final del cultivo se eliminaron 100  $\mu$ l y se remplazaron por dimetilsulfóxido, se incubaron 30 minutos al final de los cuales se agitaron los pozos y se leyeron a 490 nm.

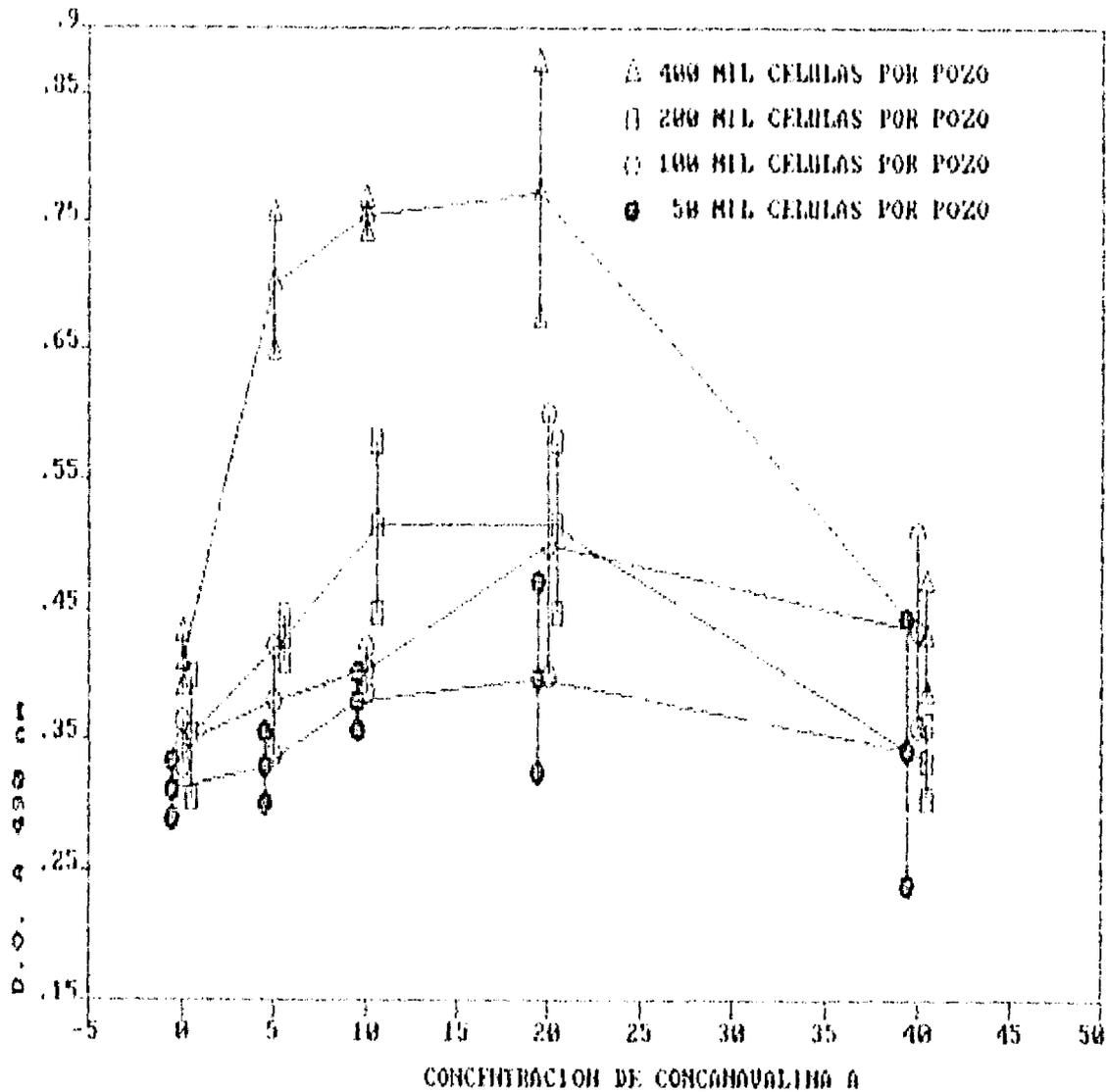
**FIGURA 7. 11. A.**  
 ACTIVACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA  
 DETERMINADA POR INCORPORACION DE  $^3\text{HTDr}$ .



Un ratón NIH hembra de 18 gr se sacrificó por luxación cervical, se obtuvieron esplenocitos, se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio, y se cultivaron entre 50 y 400 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo en DME al 20 % de SFB, suplementado con penicilina, gentamicina y  $\beta$ -2-mercaptoetanol. Se adicionó concanavalina A a 10  $\mu\text{g/ml}$  y se cultivó a 37  $^{\circ}\text{C}$ , al 5% de  $\text{CO}_2$  en atmósfera húmeda durante 3 días, al final de los cuales se agregó 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{HTDr}$  por pozo y se cultivó 18 horas más. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados son las C.P.M. medias de triplicados.

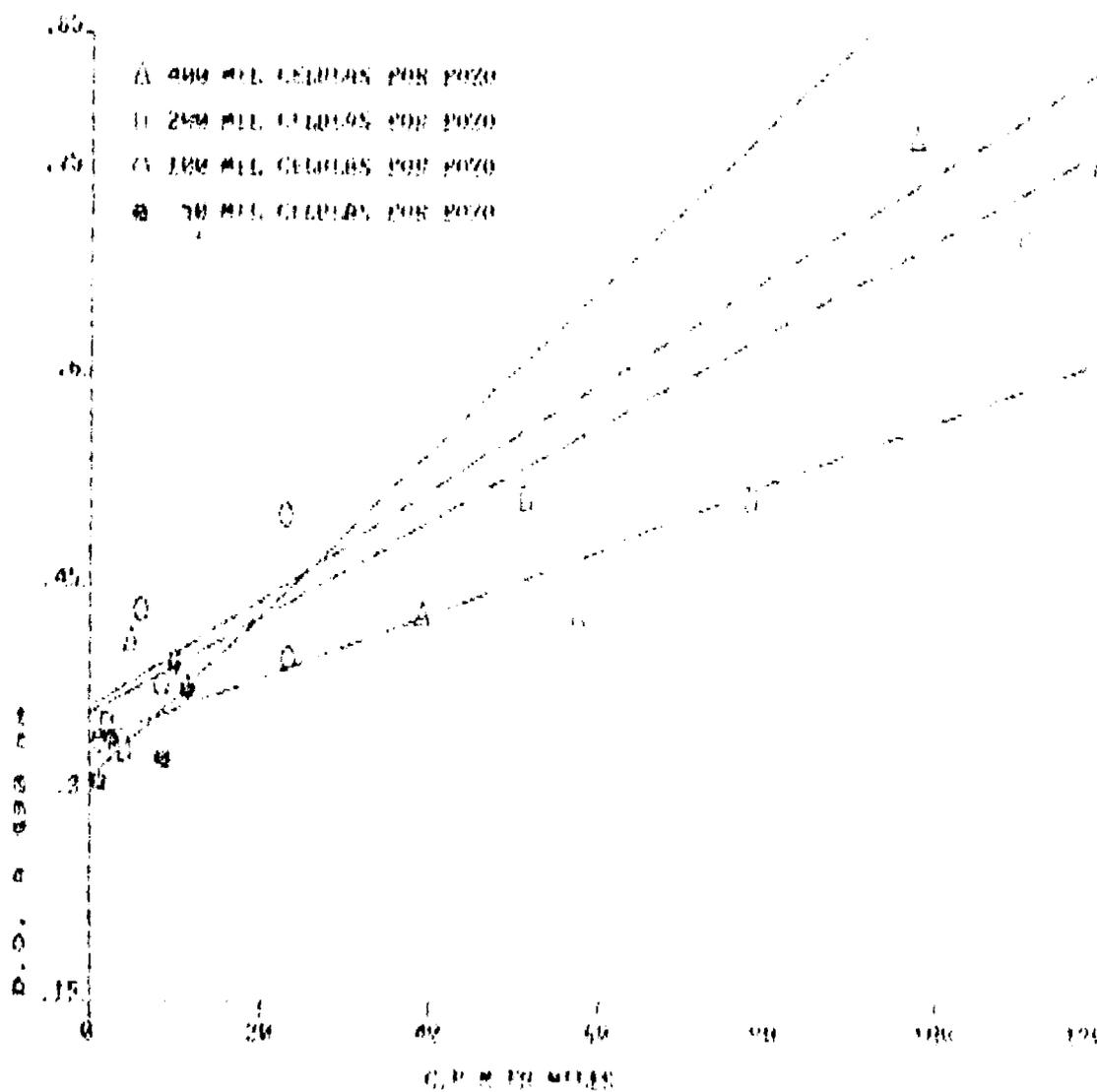
## FIGURA 7. 11. B.

ACTIVACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA.



Un ratón NIH hembra de 18 gr se sacrificó por luxación cervical, se obtuvieron esplenocitos, se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio, y se cultivaron entre 50 y 400 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo en DME al 20 % de SFB, suplementado con penicilina, gentamicina y  $\beta$ -2-mercaptoetanol. Se adicionó concanavalina A a 10  $\mu$ g/ml y se cultivó a 37 °C, al 5% de CO₂ en atmosfera húmeda durante 3 días, al final de los cuales se agregaron 20  $\mu$ l de una solución de 5 mg/ml de MTT en PBS durante 4 horas. Al final del cultivo se eliminaron 100  $\mu$ l y se remplazaron por dimetilsulfóxido, se incubaron 30 minutos al final de los cuales se agitaron los pozos y se leyeron a 490 nm.

FIGURA 7. 11. C.  
 ACTIVACION DE LINFOCITOS POR CONCAVALINA A.  
 CORRELACION ENTRE LA INCORPORACION DE  $^3\text{HTDR}$  Y MTT.



400 mil células  $r = 0.9478$   
 200 mil células  $r = 0.9051$   
 100 mil células  $r = 0.6450$   
 50 mil células  $r = 0.7573$

ciones entre 0 y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Con A, en un volumen final de 200 $\mu\text{l}$ , durante tres días. Se calcularon los coeficientes de correlación entre las dos técnicas, en cada una de las condiciones de estimulación y se encontró que utilizando 400 mil células por pozo, fue de  $r=0.9478$ , de 0.9051 con 200 mil, de 0.6450 con 100 mil y de 0.7573 con 50 mil (figura 7.11.C). Estos resultados se confirmaron en dos experimentos adicionales. Se concluyó que la correlación entre ambos métodos es buena cuando los sistemas de estimulación son muy eficientes, pero que el método de incorporación de  $^3\text{HTDr}$  tiene una mayor sensibilidad, por lo que solo se utilizó este último para los experimentos de estimulación antígeno específica.

#### 7.2.2. Estimulación de esplenocitos por lipopolisacárido.

Ya que las muestras de porinas contienen hasta 0.01 % de LPS contaminante, para tener un testigo de estimulación por este mitógeno, se evaluó la respuesta proliferativa que induce en esplenocitos. En la tabla 7.3 se presenta un experimento donde cultivaron esplenocitos de un ratón NIH normal en presencia de 0.1 a 20  $\mu\text{g}$  de LPS de *S. typhi* 0901. Se observa que la concentración óptima de estimulación se encuentra en 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 7.2.4. Condiciones de cultivo de linfocitos T.

Para evaluar la pureza de los linfocitos T obtenidos mediante una columna de nylon (135), se realizaron ensayos funcionales y de identificación fenotípica.

Se realizó inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos de conejo contra gamaglobulinas de ratón y reveladas con un anticuerpo

**TABLA 7.3**  
**ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR LIPOPOLISACARIDO**  
**DE *Salmonella typhi* 0901.**

CONCENTRACION ug/dl	MEDIA	D. E.	I. E.
0	2297	565	-
0.1	53003	14649	21.9
1	73847	31358	30.6
65	112007	76005	46.3
10	111973	4391	46.1
20	83263	10535	34.4

Se obtuvieron esplenocitos de dos ratones NIH de 17 gr, se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano a una concentración de 200 mil células por pozo en medio RPMI-1640 suplementado con  $\beta$ -2-mercaptoetanol, L-glutamina, penicilina y gentamicina y a diferentes concentraciones de SFB. Se agregaron diferentes concentraciones de LPS de *S. typhi* 0901. El cultivo se interrumpió a los cinco días. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr, la incorporación se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se encuentran expresados en C. P. M.

de cabra contra gamaglobulinas de conejo acoplado a fluoresceína, lo que nos permitió identificar a los linfocitos B contaminantes en las poblaciones no adherentes al nylon. Se detectaron alrededor del 2% de células fluorescentes.

La identificación funcional de los linfocitos T se realizó mediante ensayos de estimulación mediante Con A o células alogénicas, en presencia o ausencia de células presentadoras de antígeno.

En la tabla 7.4 y la figura 7.12 se presentan dos experimentos de estimulación de linfocitos T por Con A. Se purificaron linfocitos T de ratón NIH normal y se utilizaron dos fuentes de células presentadoras de antígeno: células autólogas de exudado peritoneal o de bazo, tratadas con mitomicina C.

Se observó que los linfocitos T, en ausencia de CPA se estimulan pobremente en presencia de Con A; pero al adicionar al sistema éstas células la activación se incrementó de manera notable.

Estos resultados fueron semejantes en los ensayos de estimulación alogénica. En la tabla 7.5 y la figura 7.13 se presentan dos experimentos de estimulación por células alogénicas, tratadas con mitomicina C. Se concluyó que el método de purificación de linfocitos T fue eficiente.

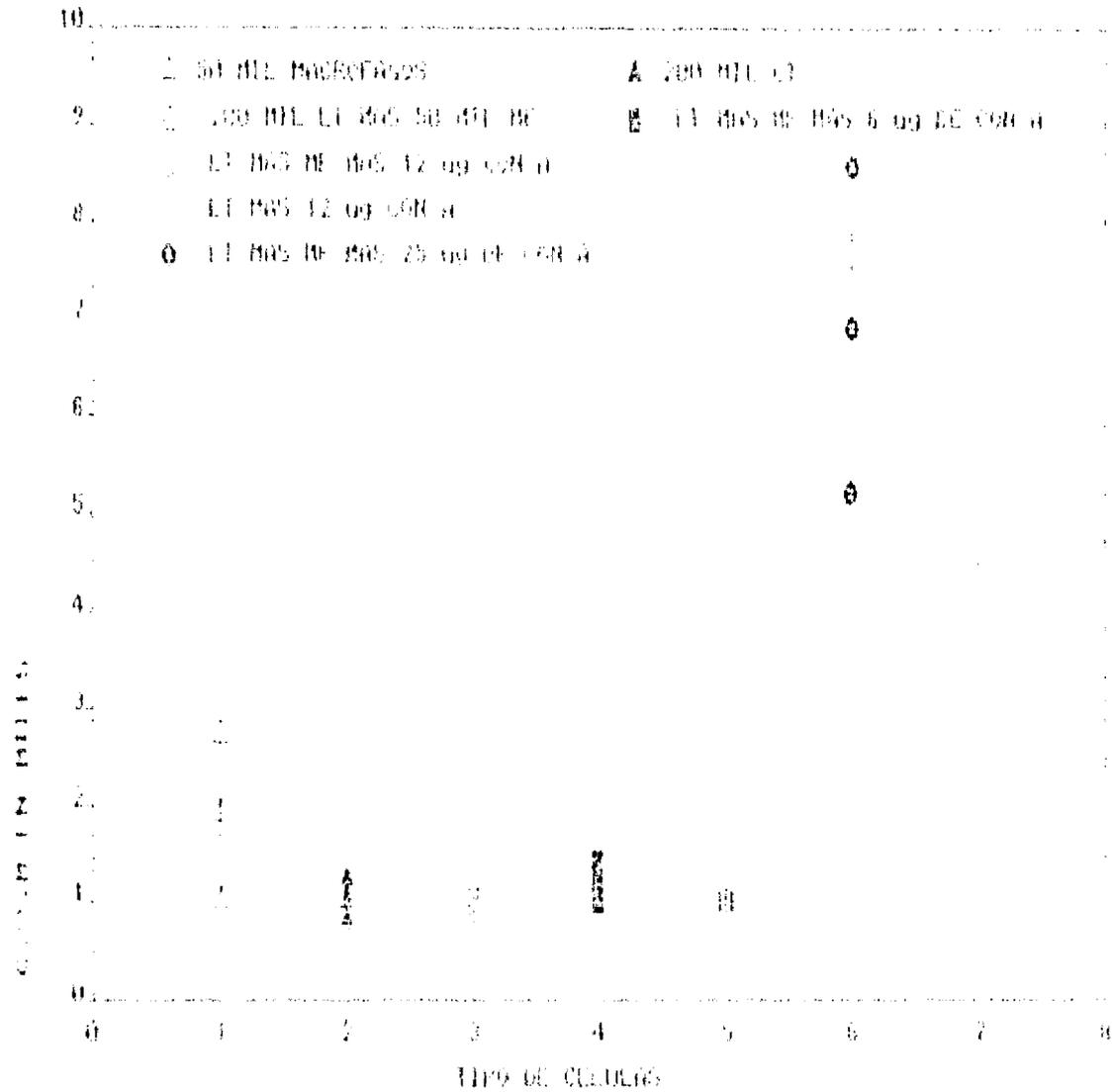
**TABLA 7.4.**  
**ESTIMULACION DE LINFOCITOS T POR CONCAVALINA A.**

FUENTE CELULAR	CONCENTRACION DE CONCAVALINA A ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0		5		10		15		25	
	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.
BAZO NORMAL	167	40	797	115	19 683	7 751	35 536	6 629	29 347	4 123
BAZO + MITOMICINA C	143	40	186	64	2 220	755	7 967	199	8 247	692
LINFOCITOS T	147	49	256	57	3 767	2 678	6 567	2 723	12 443	7 137
LINFOCITOS T+C.F.A	5 502	2 188	9 170	3 116	16 590	820	18 757	5 960	12 417	3 469

Se purificaron linfocitos T de células de ganglio de ratón NIH normal de 10 semanas de edad, mediante una columna de nylon y se cultivaron 200 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano, adicionando diferentes concentraciones de concanavalina A y 50 mil células de bazo autólogas tratadas con mitomicina C como fuente de CPA. Se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda durante cinco días, 18 horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu\text{Ci}$  de ³HTDr. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido.

FIGURA 7. 12.

ESTIMULACION DE LINFOCITOS T POR CONCANAVALINA A.



Se purificaron linfocitos T de células de bazo de ratón NIH normal de 10 semanas de edad, mediante una columna de nylon y se cultivaron 200 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano, adicionando diferentes concentraciones de concanavalina A y células de exudado peritoneal

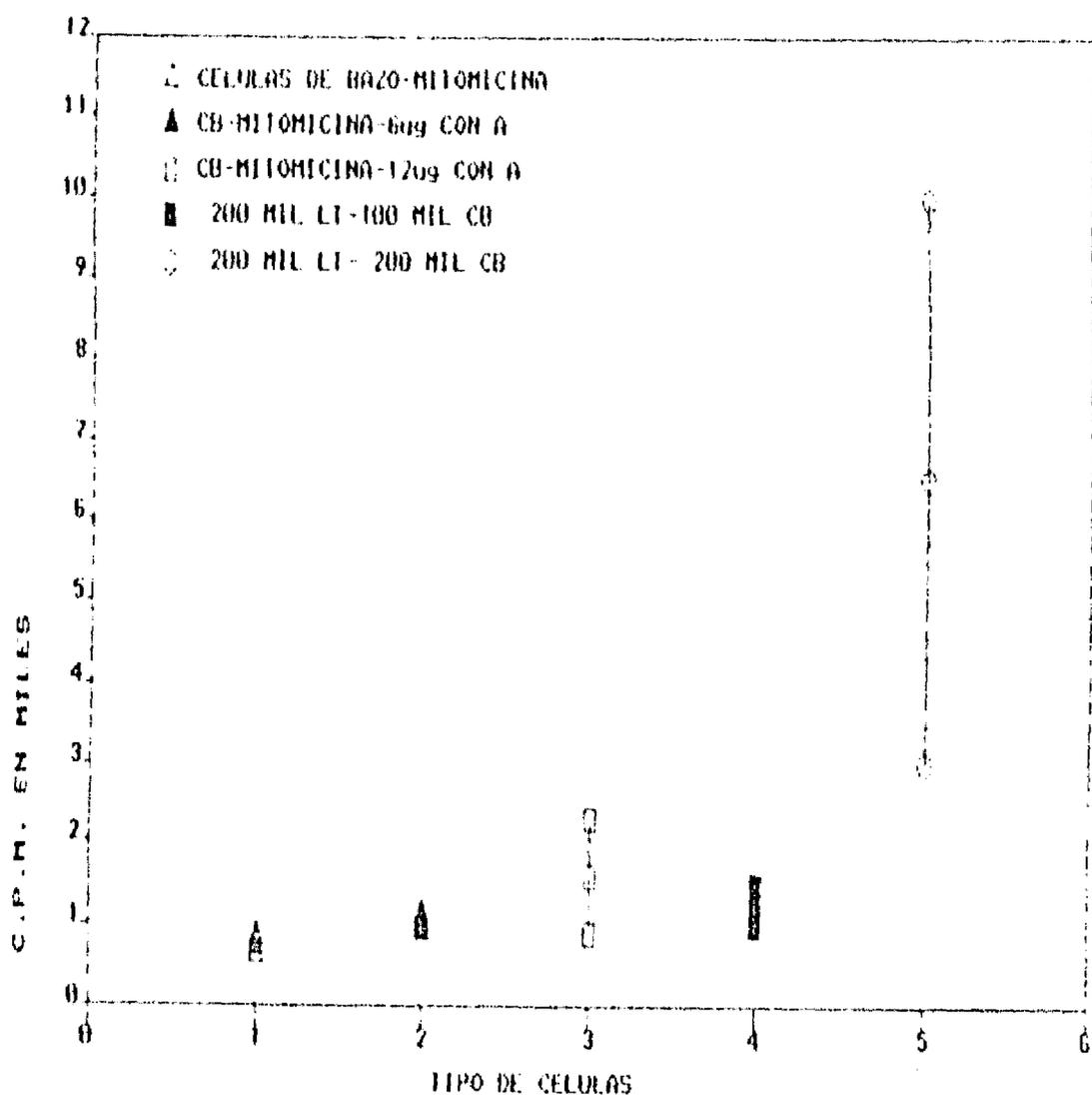
**TABLA 7.5**  
**ESTIMULACION DE LINFOCITOS T POR CELULAS ALOGENICAS.**

INDICADOR EN CULTIVO	NINGUNA		ESTIMULO			CEL. ALOGENICAS		
	MEDIA	E.E.	MEDIA	E.E.	I.E.	MEDIA	E.E.	I.E.
LINFOCITOS T	811	219	-	-	-	5557	2467	66.7
CONC.A.	2500	725	2.0	12157	1967	-	-	-
BAZO ALD	1976	506	-	55617	1290	26.7	-	-
BAZO ALD + MIT C	4414	262	-	387	347	6.9	-	-

Se purificaron linfocitos T de células de bazo de ratón NIH normal de 10 semanas de edad, mediante una columna de nylon y se cultivaron 200 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano, adicionando diferentes concentraciones de concanavalina A y células de bazo de otro ratón NIH tratadas con mitomicina C. Se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda durante cinco días, 18 horas antes de terminar el cultivo se agregó 1 µCi de ³HTDr. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido.

## FIGURA 7.13

ESTIMULACION DE LINFOCITOS T POR CELULAS ALOGENICAS.



Se purificaron linfocitos T de un ratón NIH normal de 10 semanas de edad, mediante una columna de nylon y se cultivaron 200 mil células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano, adicionando diferentes concentraciones de concanavalina A y células de bazo de otro ratón NIH tratadas con mitomicina C. Se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda durante cinco días, 18 horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu$ Ci de ³HTDr. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido.

### 7.3. ENSAYOS ANTIGENO ESPECIFICOS.

#### 7.3.1. Ratonés inmunizados con *Salmonella typhimurium*

Ya que *Salmonella typhimurium* es el agente causal de la salmonelosis murina, se trató de establecer el papel de las porinas en la generación de respuesta inmune celular en huésped natural.

Para determinar si el sistema inmunológico del ratón es capaz de reconocer a las porinas en el contexto de la bacteria total y generar respuesta proliferativa, se inyectaron ratones NIH con *Salmonella typhimurium* inactivada con acetona, 50 000 bacterias por vía intraperitoneal; 10 días después se obtuvieron células linfoides de bazo y ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de concentraciones entre 2 a 150 µg/ml de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* o *E. coli*. En las tablas 7.6 y 7.7 se presentan los resultados de un experimento representativo.

La tabla 7.6 se refiere a la estimulación de esplenocitos. Se observa que la mejor respuesta se presenta cuando se agregaran alrededor de 50 µg/ml de antígeno, existe una reactividad cruzada importante y a concentraciones altas de antígeno existe estimulación también en las células de los ratones testigos, probablemente debido al efecto del LPS contaminante en las porinas.

La tabla 7.7 presenta un experimento de estimulación de células de ganglios linfáticos. Los coeficientes de estimulación no muestran diferencias claras entre el ratón inmune y el testigo, excepto para la concentración de 50 µg/ml de antígeno. En otros tres experimentos realizados utilizando células de ganglios linfáticos se obtuvieron resultados semejantes, esto se debe probablemente a que al extraer el tejido linfoide de diversas regiones

TABLA 7. 6.

## ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.

INMUNIZACION CON *S. typhimurium*

ESTIMULO	RATON INMUNE			RATON TESTIGO			C.E.
	MEDIA	D.E.	I.E.	MEDIA	D.E.	I.E.	
CELULAS SOLAS	837	249	-	657	154	-	
CONCANAVALINA A	14257	4661	124.6	131220	12637	199.7	-
LIFOPOLISACARIDO	1967	612	9.5	3597	706	5.5	-
<i>S. typhi</i> (ug/ml)							
2	6060	588	7.2	4660	979	7.1	1.0
5	6460	574	7.6	3592	990	5.5	1.4
10	10187	2752	12.2	3750	908	5.1	2.4
20	8237	1379	9.8	7760	478	11.8	0.8
50	7450	260	11.2	9457	915	14.4	0.8
100	26417	5754	31.6	26640	10007	40.9	0.8
150	10957	604	12.1	2875	606	4.4	2.0
<i>S. typhimurium</i>							
2	6800	186	10.5	4790	776	7.2	1.4
5	11107	417	12.2	3447	749	5.2	2.5
10	12907	997	13.4	4440	1050	6.8	2.2
20	17500	467	16.1	4467	1175	6.8	2.4
50	9237	868	11.6	2757	464	2.1	5.5
100	12617	2895	15.1	6757	4466	9.5	1.6
150	5667	1867	6.8	14560	14164	22.2	0.2
<i>E. coli</i>							
2	6773	406	8.1	5520	175	6.4	1.0
5	7257	208	6.7	7576	216	5.4	1.6
10	5510	1095	6.7	3466	405	5.2	1.2
20	3503	434	4.2	2110	170	3.2	1.3
50	10667	2940	12.7	1497	478	2.2	5.6
100	30443	17854	26.4	19220	7752	29.4	1.2
150	2667	747	2.4	14600	10649	22.5	0.2

Se inmunizó un ratón NIH de 10 semanas de edad con *Salmonella typhimurium*, 50 000 bacterias inactivadas por acetona, por vía intraperitoneal sin adyuvante, 7 días después se obtuvo el bazo y se cultivaron 200 000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como testigos células de ratones no inmunizados. El cultivo se suspendió al quinto día, 18 horas antes de terminar éste se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr por pozo, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en cuentas por minuto.

**TABLA 7.7**  
**ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR PORINAS.**  
**INMUNIZACION CON *Salmonella typhimurium***

ESTIMULO	RATON INMUNE			RATON TESTIGO			D.E.
	MEGIA	D.E.	D.E.	MEGIA	D.E.	D.E.	
CELULAS SODRE	477	176	-	957	274	-	-
CONC. POLIACETINA A	21427	6209	151.9	123379	5989	122.1	-
CITROPOLISACARIDO	416	114	8.5	1487	292	1.5	-
<i>S. typhi</i> (50 000)							
2	4177	227	8.9	1202	521	1.2	7.1
5	7645	285	6.1	2247	712	2.7	3.5
10	1226	559	8.9	2296	475	1.4	3.7
20	5757	227	11.7	2172	1435	2.2	5.6
50	6647	258	14.9	2174	669	2.2	6.2
100	6157	266	17.3	2075	4621	2.4	12.2
150	6717	279	14.6	2647	1276	2.8	12.8
<i>S. typhimurium</i>							
2	764	171	8.9	1456	169	1.5	5.2
5	5056	541	10.7	2283	216	1.4	4.5
10	2167	214	6.7	2117	247	2.2	3.1
20	4097	214	8.7	1969	226	1.1	2.8
50	2797	214	7.8	826	259	0.9	4.2
100	6267	197	12.2	1566	665	1.5	6.5
150	774	287	1.6	2210	212	2.2	6.7
<i>E. coli</i>							
2	5094	1246	14.9	727	212	0.8	14.2
5	264	261	5.6	1516	192	1.6	3.5
10	1747	278	2.7	2056	427	1.1	1.5
20	1127	411	2.5	819	227	1.2	2.6
50	526	266	1.2	172	82	1.6	0.7
100	756	222	2.4	13026	621	22.6	6.5
150	912	264	2.5	1026	404	1.1	1.7

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

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

del ratón se obtenga un fenómeno de dilución de las células antígeno específicas activadas.

### 7.3.2. Ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhimurium*

Para establecer si las porinas solubles conservan sus propiedades inmunogénicas, se inmunizaron ratones NIH con 100 µg de porinas de *S. typhimurium* en ACF en los cojinetes plantares y 10 días después se obtuvieron linfocitos de bazo y ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*.

En las tablas 7.8, 7.9 y 7.10 se presentan los resultados de experimentos representativos. En la tabla 7.8 se presenta un ensayo donde se cultivaron esplenocitos. Se observa que los coeficientes de estimulación son altos para las tres cepas bacterianas; sin embargo, la estimulación eficiente con porinas de *Salmonella typhimurium* requirió mayor concentración de antígeno en los pozos. La reactividad cruzada es muy importante y las porinas de *E. coli* generaron los mayores índices de estimulación.

En la tabla 7.9 se presenta otro experimento donde no existe una respuesta tan alta, pero se observa que la respuesta es mayor cuando se estimula con porinas de *S. typhi* a pesar de que los ratones fueron inmunizados con porinas de *S. typhimurium*. Hay reactividad cruzada importante con las porinas de *E. coli* y fondos de estimulación muy altos en los ratones testigos, debido en parte a la actividad de LPS.

En la tabla 7.10 se presenta un experimento donde se cultivaron células de ganglios linfáticos. Los coeficientes de estimula-

ción son muy pobres debido a que se presenta activación importante en el ratón testigo y los índices de estimulación no fueron muy altos en el ratón inmune. Esta observación se repitió en varios experimentos y se debe en parte a la actividad del LPS contaminante en las preparaciones de los antígenos. Por otro lado, ya que se obtuvieron ganglios linfáticos de varias regiones del ratón es posible que la cantidad de linfocitos activados de manera específica por el antígeno haya sido menor que cuando se obtuvieron de bazo, presentandose un fenómeno de dilución de la respuesta inmune. Por este motivo se decidió utilizar esplenocitos en los siguientes modelos de activación.

### 7.3.3. Ratones inmunizados con PME de *Salmonella typhi*.

Ya que en el Laboratorio de Inmunoquímica se han realizado ensayos de inducción de protección a través de la administración de PME de *S. typhi* a ratones NIH (47), se decidió evaluar la respuesta inmune celular utilizando el mismo antígeno y esquema de inmunización de esos experimentos. De este modo, ratones NIH de aproximadamente 17 gr recibieron 30 µg de PME de *S. typhi* en PBS, por vía intraperitoneal, los días cero y 15. El día 25 se obtuvieron esplenocitos y se cultivaron en presencia de 20 o 50 mg/ml de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*.

En la tabla 7.11 se presenta un experimento representativo, como en los ensayos inmunizando con porinas de *S. typhimurium*, se observa que los mejores índices de estimulación se presentan al agregar porinas de *S. typhi* y *E. coli*, en tanto que las porinas de *S. typhimurium* generaron las respuestas menores.

**TABLA 7. 8.**  
**ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.**  
**INMUNIZACION CON PORINAS DE *Salmonella typhimurium***

ESTIMULO	Adyuv. Completo			Adyuv. Testigo			C.E.
	MELIA	L.E.	L.E.	MELIA	L.E.	L.E.	
CELULAS SECAS	820	567	-	2062	1678	-	
CONDONAVALINA A	45257	7869	50.7	99144	19132	47.4	-
<i>S. typhi</i> (aguda)							
2	81146	10700	85.4	5177	795	2.5	26.0
5	99675	10856	106.6	1600	601	0.8	141.9
10	41257	2157	47.1	376	4.4	0.4	112.5
20	115950	11996	125.7	1760	893	1.3	97.9
50	52467	5471	100.4	6147	366	2.9	34.1
100	64398	8115	69.9	10175	923	4.9	14.4
<i>S. typhimurium</i>							
2	42600	7657	46.6	7116	675	1.4	10.7
5	28270	4467	30.2	7336	1454	3.7	6.7
10	21265	945	21.1	11957	6801	5.7	3.9
20	64020	12535	66.6	3957	1855	1.9	26.9
50	52770	4138	58.4	1476	740	0.7	32.8
100	49761	5731	54.1	827	367	1.4	129.3
<i>E. coli</i>							
2	87576	23667	25.2	1078	777	0.5	164.7
5	119976	10849	126.4	171	39	0.1	1473.4
10	74761	2917	26.8	722	447	1.4	220.7
20	126497	17619	146.4	606	176	1.3	512.7
50	112127	11149	122.8	922	710	0.2	491.
100	75227	2217	81.5	757	145	0.2	467.4

Se inmunizó un ratón NIH de 10 semanas de edad con porinas de *Salmonella typhimurium*, 100 µg en adyuvante completo, en los cojinetes plantares 7 días después se obtuvo el bazo y se cultivaron 200 000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como testigos células de ratones que recibieron ACF y SSF. El cultivo se suspendió al quinto día, 18 horas antes de terminar éste se agregó 1 µCi de ³H TDr por pozo, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en cuentas por minuto.

TABLA 7.9.

## ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.

INMUNIZACION CON PORINAS DE *Salmonella typhimurium*

ESTIMULO	RATON IMPUNE			RATON TESTIGO			EVE.
	MEDIA	D.E.	I.E.	MEDIA	D.E.	I.E.	
CELESTAB SOLA	104	250	-	5782	1402	-	-
CONCANA, PPA A	58947	7337	13.7	55646	5078	1.4	-
LIFOCOLISACARINA	11134	5710	6.5	4537	1445	6.8	7.7
<i>S. typhi</i> 100 µg							
2	2716	278	3.4	6717	1181	1.7	6.5
5	15767	1717	6.2	5877	247	1.1	7.4
10	10771	1621	3.7	11697	3411	2.2	4.7
20	71217	7568	9.5	19087	1741	1.9	5.1
50	71354	612	0.7	9179	641	1.7	5.5
100	1177	5237	9.7	22736	4711	6.4	2.2
200	11577	317	0.3	7177	489	1.7	6.7
<i>S. typhimurium</i>							
2	11177	1177	1.7	4271	741	1.7	5.4
5	71217	1077	0.4	4577	27	1.3	5.9
10	11174	731	0.7	17427	67	2.5	7.9
20	1177	1746	1.4	1475	1727	2.7	7.5
50	15671	1165	0.1	1767	71	1.7	2.8
100	17777	1416	11.7	17167	289	1.2	7.8
200	21877	452	0.7	7725	524	1.4	4.6
<i>E. coli</i>							
2	24847	7261	1.3	9157	584	1.7	6.7
5	18357	917	6.9	5176	142	1.7	5.1
10	17277	517	5.1	6377	762	1.7	4.8
20	18444	416	5.1	6215	542	1.7	4.4
50	18444	418	5.7	6211	471	1.7	4.6
100	15615	1187	11.0	17746	5056	1.4	4.6
200	17136	175	11.5	1577	179	1.8	4.1

Se inmunizó un ratón NIH de 10 semanas de edad con porinas de *Salmonella typhimurium*, 100 µg en adyuvante completo, en los cojinetes plantares 7 días después se obtuvieron los ganglios linfáticos y se cultivaron 200 000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como testigos células de ratones que recibieron ACF y SSF. El cultivo se suspendió al quinto día, 18 horas antes de terminar éste se agregó 1 µCi de ³H TDr por pozo, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en cuentas por minuto.

TABLA 7. 10.

## ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.

INMUNIZACION CON PORINAS DE *Salmonella typhimurium*

ESTIMULO	RATON IMPUNE			RATON TESTIGO			C.E.
	MEDIA	S.E.	I.E.	MEDIA	S.E.	I.E.	
CELULAS SODAS	14.0	5.35	-	7253	1632	-	-
CONDONACELONA	69237	5771	25.5	57357	1888	17.8	-
LITOPOLYSACARIDO	21237	724	4.7	2979	2180	6.9	5.1
<i>S. typhi</i> (ug/ml)							
2	1074	192	4.5	9127	211	2.6	1.6
5	11226	914	4.7	8212	2299	2.6	1.7
20	17223	1116	5.9	11292	226	4.4	1.2
50	19132	1938	6.6	18277	227	5.5	1.4
100	5192	683	2.5	12755	2545	2.9	0.5
<i>S. typhimurium</i>							
2	14197	1717	6.2	5086	1714	2.6	2.2
5	12576	1195	5.2	14926	2124	3.2	1.6
20	17412	1477	5.5	21246	2114	6.6	0.9
50	2217	189	9.5	2548	1116	1.1	0.9
100	2442	239	1.2	2785	679	1.9	1.2
<i>E. coli</i>							
2	9717	1958	4.2	7785	145	2.2	1.8
5	5727	1125	2.4	8287	184	2.5	0.9
20	6717	724	2.5	8549	716	2.5	1.1
50	5227	222	2.2	11517	5117	3.3	2.7
100	6226	2605	2.6	16067	4698	4.5	0.5

Se inmunizó un ratón NIH de 10 semanas de edad con porinas de *Salmonella typhimurium*, 100 µg en adyuvante completo, en los cojinetes plantares 7 días después se obtuvieron los ganglios linfáticos y se cultivaron 200 000 células por pozo, adicionando diferentes concentraciones de porinas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se incluyeron como testigos células de ratones que recibieron ACF y SSF. El cultivo se suspendió al quinto día, 18 horas antes de terminar éste se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en cuentas por minuto.

**TABLA 7. 11.**  
**ESTIMULACION DE LINFOCITOS POR PORINAS.**  
**INMURIZACION CON PME DE *Salmonella typhi*.**

ESTIMULO	RATON DONOR			RATON TESTIGO			C.E.
	MEDIA	E.S.	I.E.	MEDIA	E.S.	I.E.	
CELLULOSE SULFOS	1798	111	-	1180	154	-	-
CARBOHIDRATO A	47560	51441	125.1	124667	14017	105.7	1.1
PORINAS 20 ug/ml							
<i>S. typhi</i>	107307	1507	29.9	6420	64	5.4	5.5
<i>S. typhimurium</i>	1000	814	1.6	2170	267	1.6	1.4
<i>E. coli</i>	11677	2729	8.3	2857	55	1.1	1.7
PORINAS 50 ug/ml							
<i>S. typhi</i>	94736	1131	21.6	11957	264	1.0	2.7
<i>S. typhimurium</i>	1510	556	4.1	7271	125	1.7	1.6
<i>E. coli</i>	4711	2237	12.6	5137	420	4.4	1.9

Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d, Vi) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió a los cinco días, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C.P.M. Se presenta la media y el error estandar de triplicados.

También se observa una reactividad cruzada importante entre los tres antígenos, aunque es notorio que la menor estimulación se presenta con las porinas de *S. typhimurium*.

La concentración del SFB en el medio de cultivo influye poco en los índices de estimulación antígeno específicos, de manera diferente a lo que sucede en los modelos de activación por mitógenos (figura 7.14).

En las figuras 7.15. A y 7.15. B se presenta el resultado de un experimento donde se siguió la magnitud de la respuesta de acuerdo a los días de cultivo, se observa la mayor estimulación a los cinco días.

En las figuras 7.16. A y 7.16. B se presenta un experimento en el que se evaluó la estimulación de esplenocitos hasta 75 días después de la última inmunización. La magnitud de la respuesta proliferativa disminuye notablemente a los 45 días; sin embargo, se conserva aún 75 días después de la inmunización.

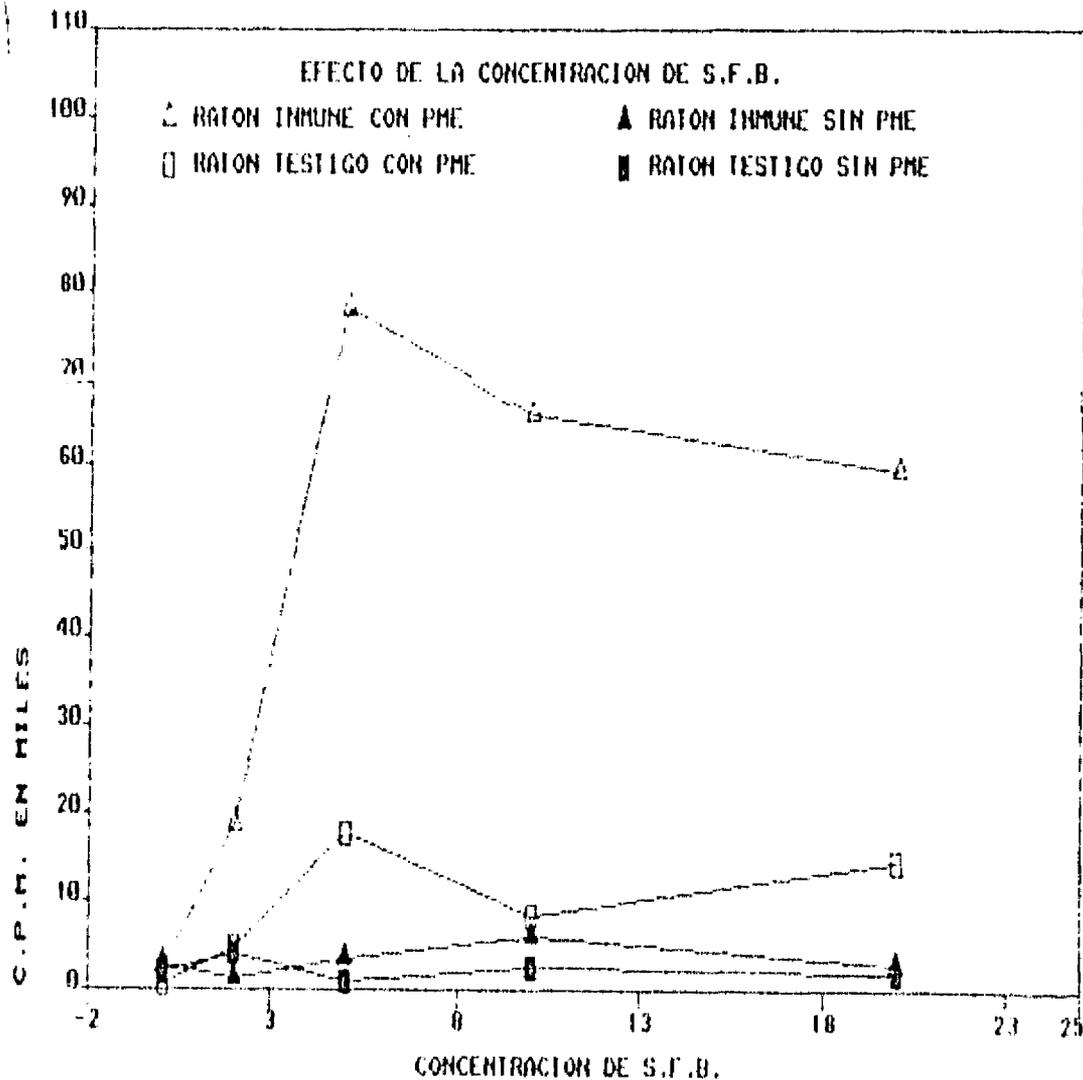
Ya que las porinas de *S. typhimurium* estimularon pobremente a los linfocitos inmunes en cultivo, se realizó un ensayo para descartar que fuesen citotóxicas. Para ello, se cultivaron linfocitos en presencia de 20 o 50  $\mu\text{g/ml}$  de porinas y se cosecharon entre los días cuatro y diez de cultivo, en una placa por duplicado se adicionó Con A a 10  $\mu\text{g/ml}$ . En la tabla 7.12 se presentan los coeficientes de estimulación al cuarto día de cultivo. Si bien el fondo de estimulación en las células inmunes es alto, se observa claramente una estimulación antígeno específica; en la tabla 7.13 se presentan los resultados de la activación al sexto día de cultivo, comparando los resultados habiendo agregado Con A tres días antes de terminar el experimento. Se observa que en el ratón inmune

existe una estimulación adicional. La respuesta en los linfocitos estimulados con porinas de *S. typhimurium* se restituye al nivel de la observada con las otras porinas, lo que descarta su posible toxicidad.

En las figuras 7.17.A y 7.17.B se puede observar el comportamiento de los esplenocitos entre los 4 y 9 días de cultivo.

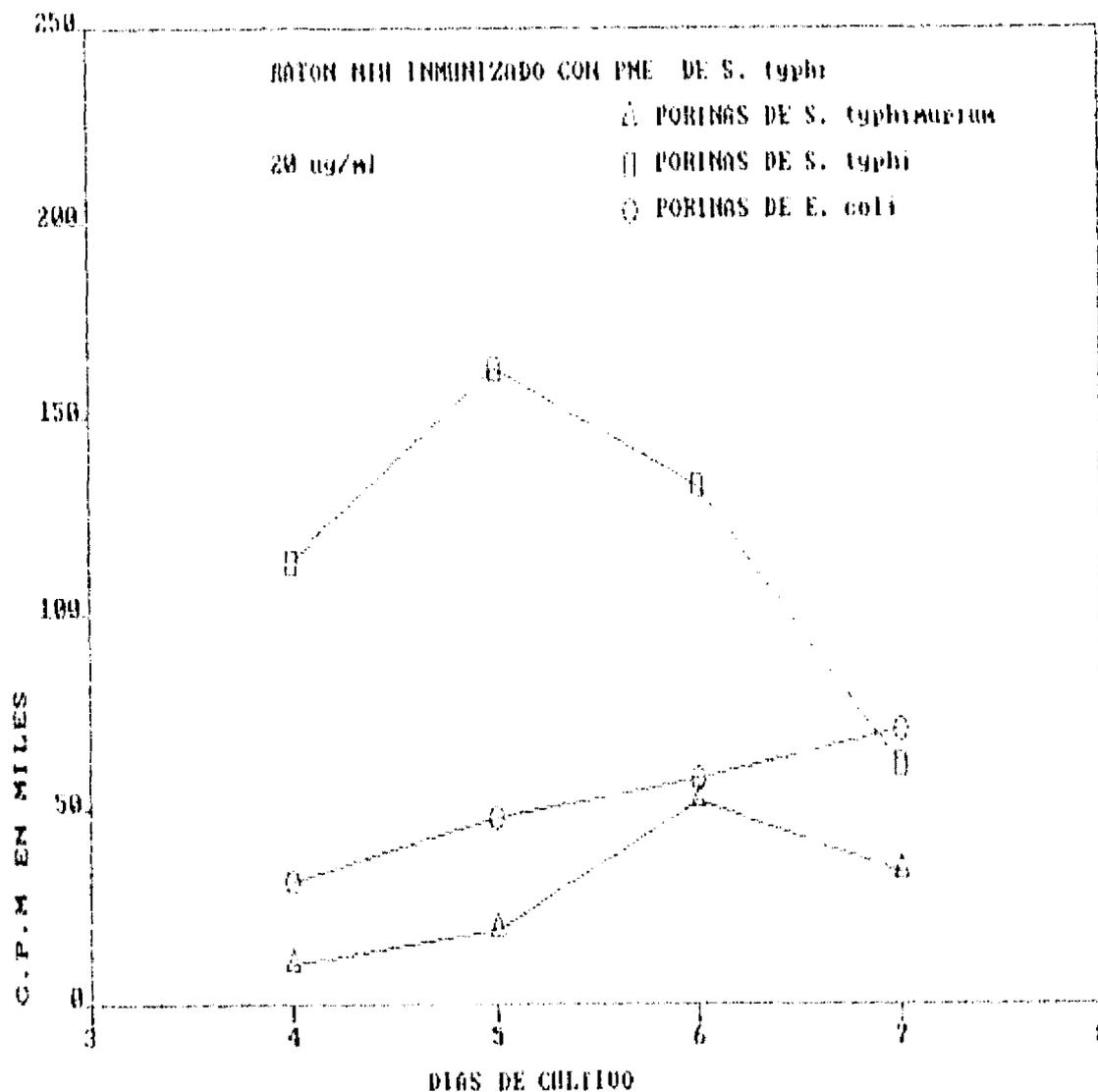
Se realizaron experimentos con linfocitos T de ratones C57Bl/6 inmunizados de la misma manera. La tabla 7.14 presenta un experimento en el que se compara la estimulación de esplenocitos totales y de linfocitos T. Se observa que existe importante reactividad cruzada. Llama la atención que las porinas de *E. coli* presentan los coeficiente de estimulación más altos. En la tabla 7.15 se presenta otro experimento en el que se trató la suspensión de células de bazo con un anticuerpo monoclonal contra Thy1 (71) para eliminar a linfocitos T. Se observa que la respuesta al antígeno se abate casi por completo.

FIGURA 7.14.  
 ACTIVACION DE LINFOCITOS POR PORINAS.  
 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SFB.



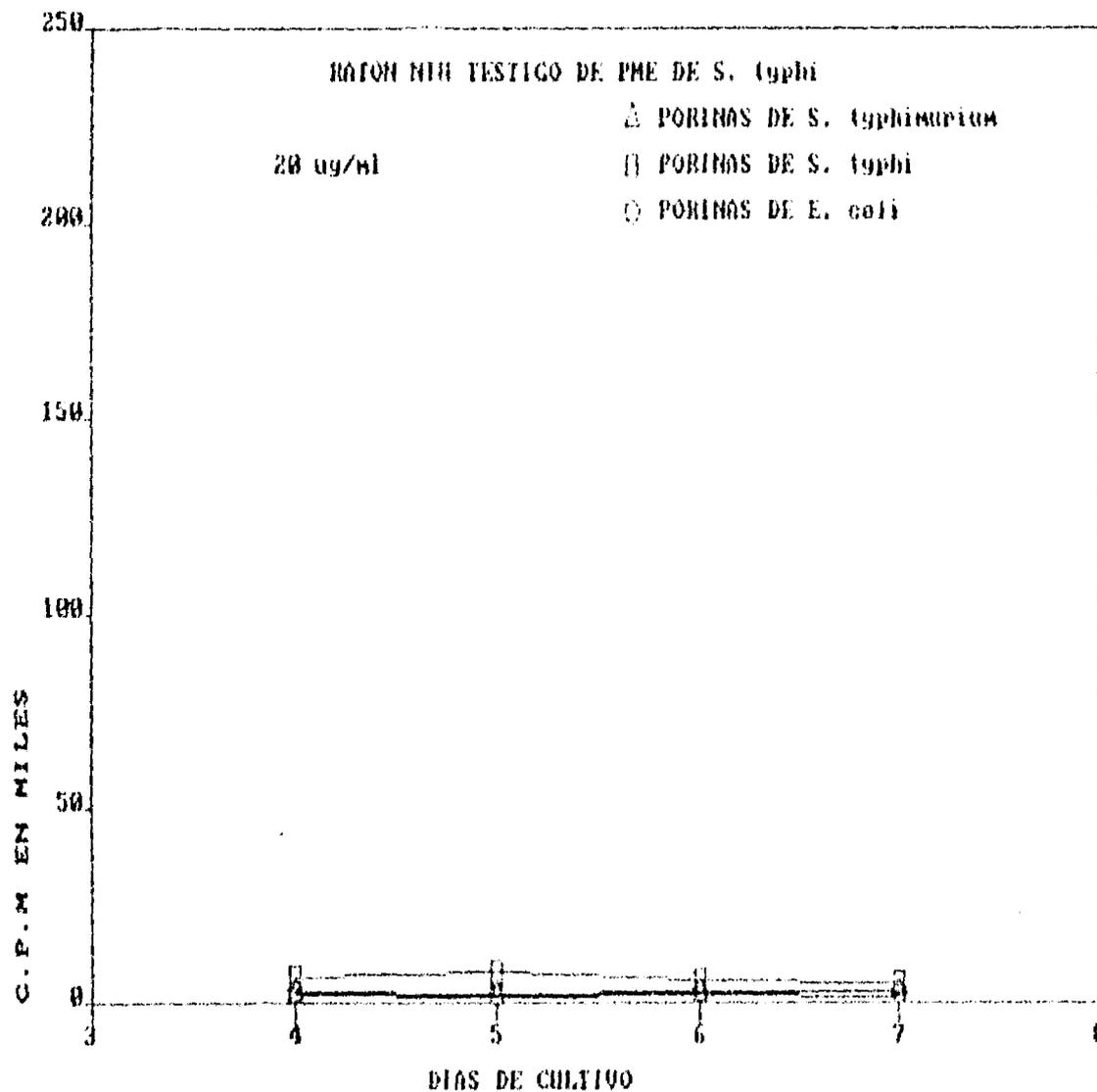
Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PHE de *S. typhi* (9, 12, d, Vi) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30  $\mu\text{g}$  i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de PHE de *S. typhi*, y diferentes concentraciones de SFB, el cultivo se interrumpió a los cinco días, 18 horas antes se agregó 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{HTDr}$  por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C. P. M.

**FIGURA 7.15.A**  
 ESTIMULACION DE ESPLENCITOS POR PORINAS  
 SEGUN DIAS DE CULTIVO.  
 INMUNIZACION CON PME DE *Salmonella typhi*.



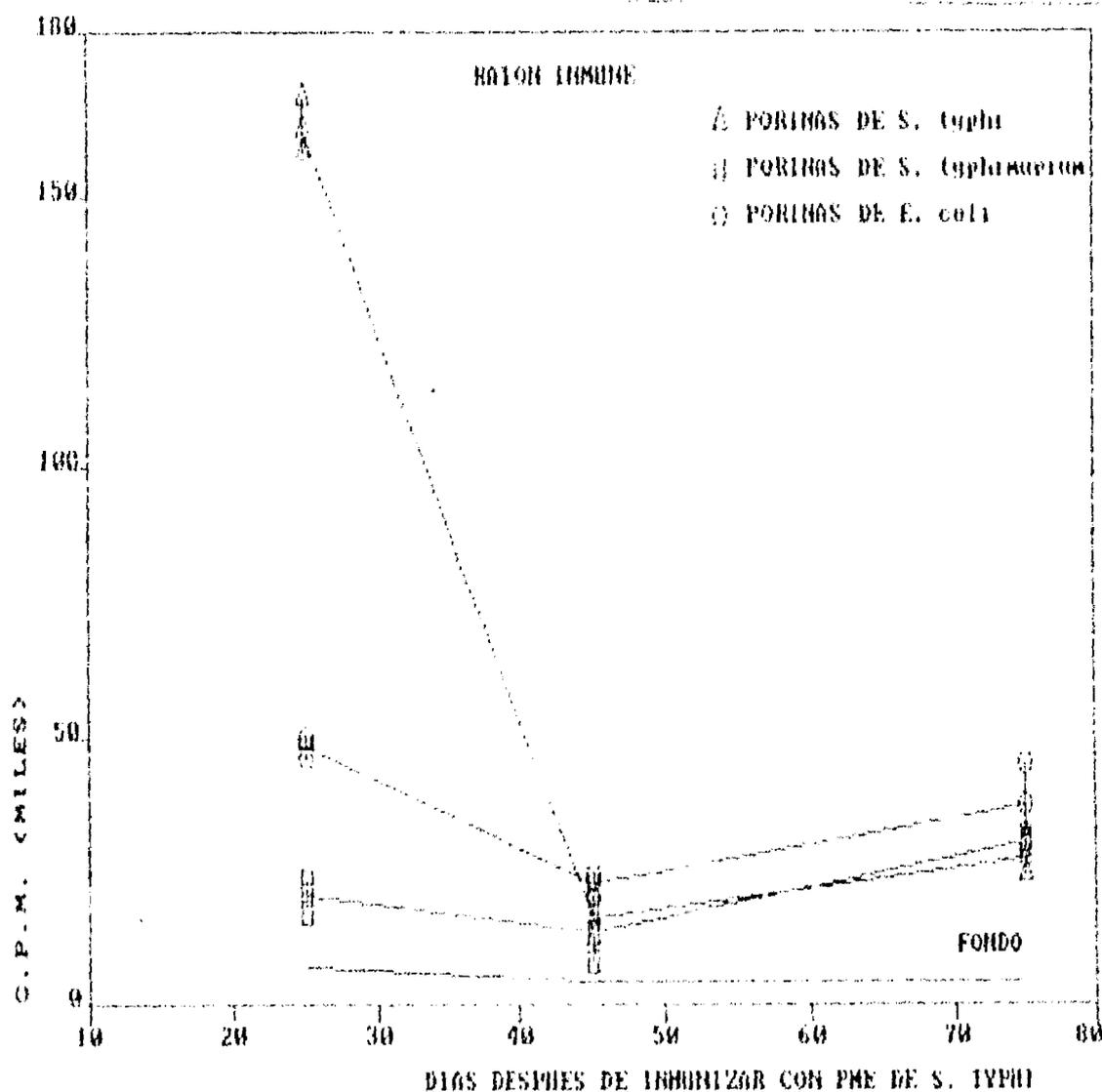
Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d, VI) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió entre 4 y 7 días, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C. P. M.

**FIGURA 7.15. B**  
 ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS  
 SEGUN DIAS DE CULTIVO.  
 INMUNIZACION CON PME DE *Salmonella typhi*.



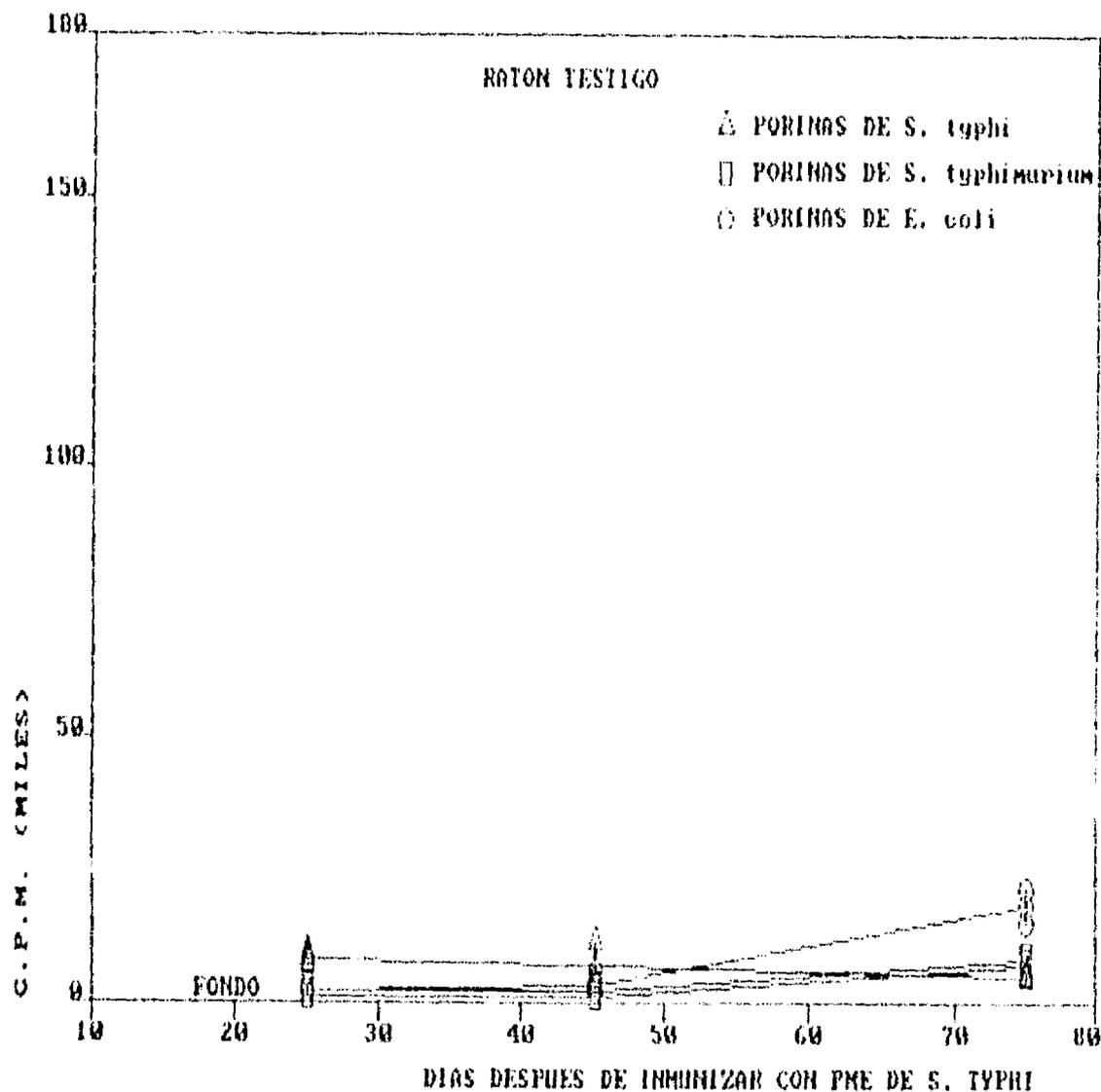
Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d, VI) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30  $\mu$ g i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió entre 4 y 7 días, 18 horas antes se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C. P. M.

**FIGURA 7. 16. A.**  
 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS SEGUN EL  
 TIEMPO POSTERIOR A LA ULTIMA INMUNIZACION.  
 RATONES INMUNES.



Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d, VI) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30  $\mu$ g i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajeron los bazo entre el día 25 y el 45, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió a los cinco días, 18 horas antes se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C.P.M. Se presenta la media y la desviación estándar de triplicados.

FIGURA 7. 16. B.  
 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS SEGUN EL  
 TIEMPO POSTERIOR A LA ULTIMA INMUNIZACION.  
 RATONES TESTIGOS.



Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d, V1) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajeron los bazo entre el día 25 y el 45, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió a los cinco días, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C.P.M. Se presenta la media y la desviación estandar de triplicados.

**TABLA 7. 12**  
ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.

	INHUNE		TESTIGO	
	MEDIA	D. E.	MEDIA	D. E.
CELULAS SOLAS	5520	1378	663	148
CON A 10 ug/ml	33430	8138	18223	1597
CON A 20 ug/ml	44810	1566	11527	946
PORINAS 20 ug/ml				
<i>S. typhimurium</i>	103893	30226	5293	3981
<i>S. typhi</i>	103000	16727	9298	2241
<i>E. coli</i>	126727	26475	19550	817
PORINAS 20 ug/ml				
<i>S. typhimurium</i>	115393	11249	1158	4592
<i>S. typhi</i>	75731	15701	15951	1464
<i>E. coli</i>	97691	22873	16158	3771

Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d:V1) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió a los ocho días, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C. P. M. Se presenta la media y la desviación estandar de triplicados. A una placa testigo, conteniendo las células del mismo raton, se le agregó 10 ug/ml de concanavalina A tres días antes de interrumpir el cultivo.

**TABLA 7. 13.**  
**ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.**  
**EFFECTO DE LA ADICION DE CONCAVALINA A.**

ESTIMULO	RATON IMMUNE			RATON IMMUNE MAS CONCAVALINA A			RATON TESTIGO			RATON TESTIGO MAS CONCAVALINA A			C.E.	C.E.
	MEDIA	E.S.	I.E.	MEDIA	E.S.	I.E.	MEDIA	E.S.	I.E.	MEDIA	E.S.	I.E.	SIN CON A	CON CON A
CELULAS SOLAS	8827	1273	-	8627	1277	-	1646	140	-	1646	140	-	-	-
CON A 10 ug/ml	106158	10773	12.0	160576	37567	16.2	91366	1845	55.5	82069	7900	49.8	0.2	0.4
CON A 20 ug/ml	103573	37952	20.8	159850	11515	14.7	87351	2707	57.0	120707	7743	33.2	0.4	0.2
FORINAS 20ug/ml														
<i>S. typhi</i>	112287	7924	15.6	199155	11421	12.4	24204	514	3.7	31250	2179	19.0	4.1	1.2
<i>S. typhimurium</i>	52065	7155	5.9	105215	31742	21.0	22204	81	1.4	30142	37	16.7	4.1	1.2
<i>E. coli</i>	58146	1995	6.6	24777	1495	26.7	2810	265	1.7	37587	2600	22.8	3.9	1.2
FORINAS 50ug/ml														
<i>S. typhi</i>	112056	1664	12.6	211247	20660	22.9	9416	375	5.7	19922	599	12.1	2.2	2.1
<i>S. typhimurium</i>	26175	3026	4.7	290921	23661	23.7	2692	412	1.8	25812	1565	15.5	3.7	2.1
<i>E. coli</i>	69164	658	1.2	176716	7226	20.0	5977	347	3.8	12057	351	20.6	2.2	1.1

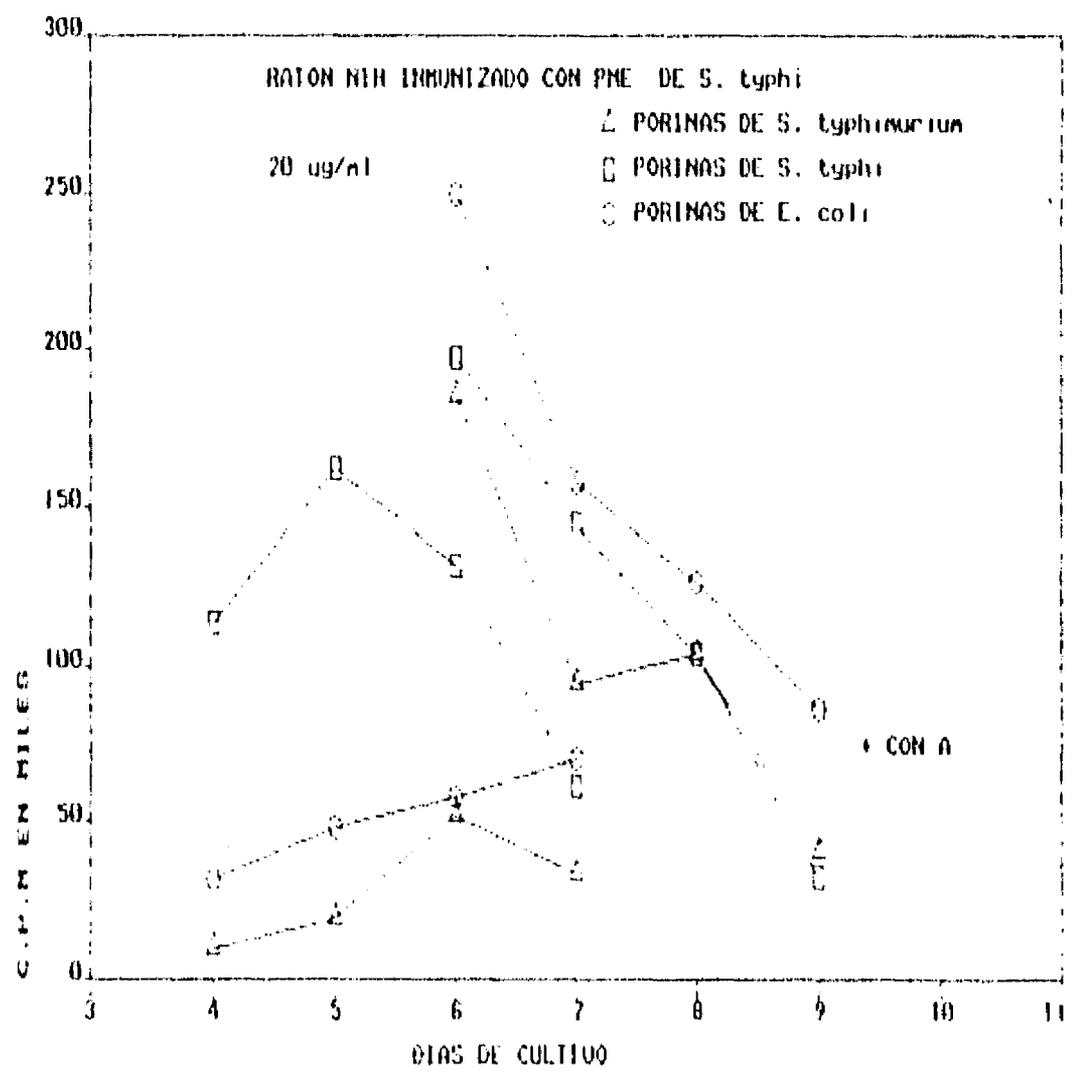
Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PHE de *S. typhi* (9, 12, d:V1) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió a los siete días, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C.P.M. Se presenta la media y el error estandar de triplicados. A una placa testigo, conteniendo las células del mismo raton, se le agregó 10 µg/ml de concanavalina A tres días antes de interrumpir el cultivo.

**TABLA 7. 14.**  
ESTIMULACION DE ESPLEROCITOS POR PORINAS.

	IMUNE		TESTIGO	
	MEDIA	D. E.	MEDIA	D. E.
CELULAS SOLAS	1933	338	295	154
CON A 10 ug/ml	13310	8481	10415	1152
CON A 20 ug/ml	9130	4439	7195	1103
PORINAS 20 ug/n				
<i>S. typhimurium</i>	40160	9239	4207	824
<i>S. typhi</i>	32637	19950	5972	3555
<i>E. coli</i>	86604	12609	15703	4122
PORINAS 20 ug/ml				
<i>S. typhimurium</i>	51755	11060	6723	4902
<i>S. typhi</i>	19767	8703	5220	2026
<i>E. coli</i>	39908	9357	11420	3466

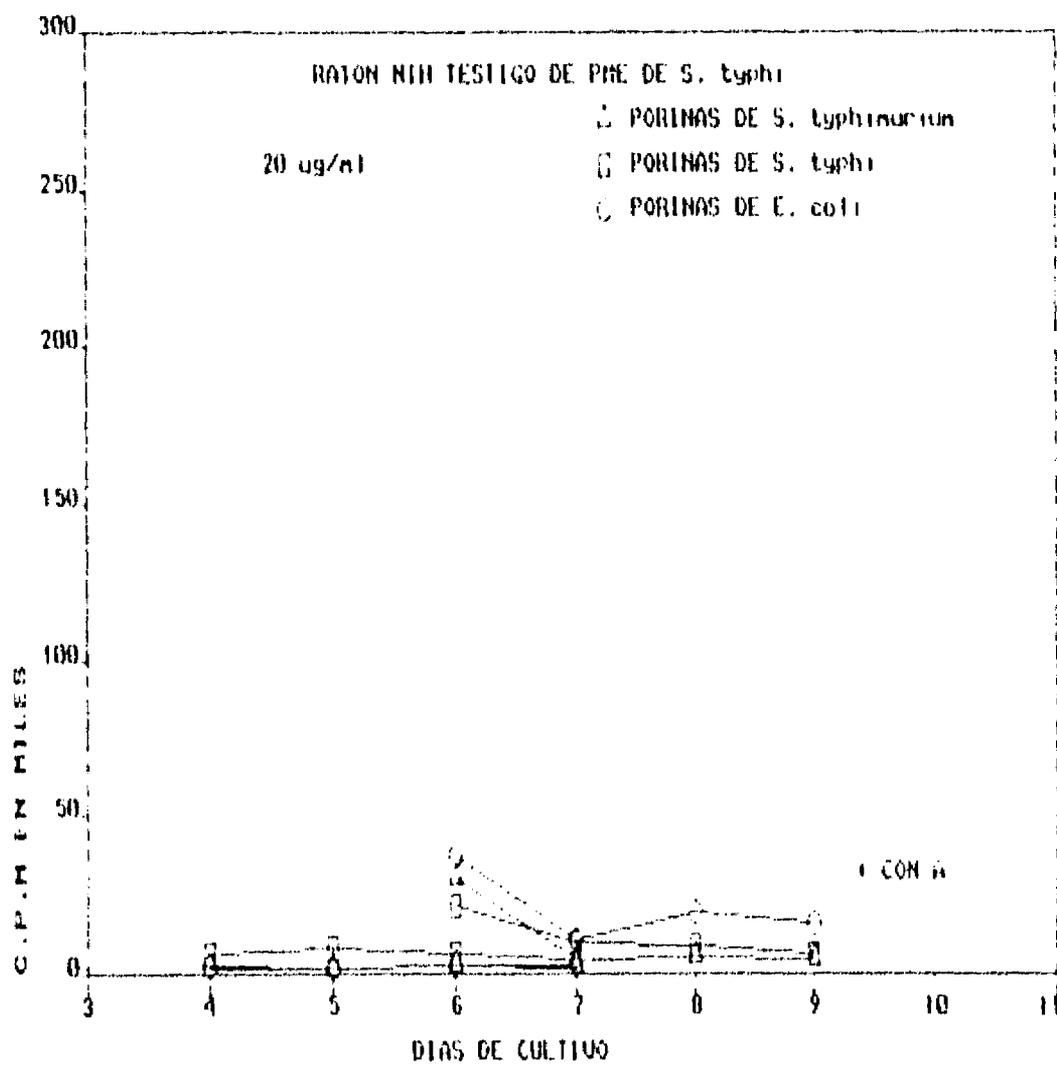
Ratones NIH de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9, 12, d: V1) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i. p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Se extrajo el bazo el día 25, se cultivaron 200 mil células mononucleares en placas de 96 pozos en presencia de diferentes concentraciones de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. El cultivo se interrumpió a los nueve días, 18 horas antes se agregó 1 µCi de ³HTDr por pozo. La incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo. Los resultados están expresados en C.P.M. Se presenta la media y la desviación estandar de triplicados. A una placa testigo, conteniendo las células del mismo raton, se le agregó 10 ug/ml de concanavalina A tres días antes de interrumpir el cultivo.

FIGURA 7. 17. A.  
ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS POR PORINAS.



## FIGURA 7.17. B.

ESTIMULACION DE ESLENOCITOS POR PORINAS.



**TABLA 7. 15.**  
**ESTIMULACION DE LINFOCITOS T POR PORINAS.**

ESTIMULO	RATON INMUNE			RATON TESTIGO			
	MEDIA	D.E.	I.E.	MEDIA	D.E.	I.E.	C.E.
ESPLENOCITOS	3678	4186		2718	3236		
PORINAS							
S. typhi	6055	1184	1.6	756	414	0.3	5.9
S. typhimurium	2616	1453	0.7	725	369	0.3	2.7
E.coli	11950	7655	3.3	2526	1658	0.9	3.5
LINFOCITOS T	508	399		300	106		
LINFOCITOS T MAS CON A	10840	3258	21.3	10356	1021	34.5	0.6
LT MAS CON A MAS CPA	18383	4111	36.2	37750	7677	125.8	0.3
LT MAS LPS MAS CPA	1133	1482	2.2	228	33	0.8	2.9
LT MAS PORINAS							
S. typhi	6523	1655	12.8	526	468	1.8	7.3
S. typhimurium	7755	2801	15.3	1003	732	3.3	4.6
E.coli	8053	3863	15.9	130	43	0.4	36.6

Se obtuvieron linfocitos T de bazo de ratón C57Bl/6 inmunizado con FME de *S. typhi* mediante columnas de nylon y se cultivaron en presencia de CPA ( células singénicas de exudado peritoneal tratadas con mitomicina C) y de porinas solubles de *S. typhi* en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo durante cinco días, 18 horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido.

**TABLA 7.16**  
**EFFECTO DE LA ELIMINACION DE LINFOCITOS T EN LA**  
**ESTIMULACION POR PORINAS.**

ESTIMULO	RATON INMUNE			RATON TESTIGO			
	MEDIA	D.E.	I.E.	MEDIA	D.E.	I.E.	C.E.
CPA	2446	248		976	405		
CPA MAS CONA	5682	512	2.3	3306	112	3.4	0.7
CPA MAS LPS	4261	527	1.7	278	152	0.3	6.1
LT	2407	193		1963	307		
LT MAS CPA MAS CONA	63576	21526	26.4	29375	9570	15.0	1.8
LT MAS CPA MAS LPS	5418	352	2.3	7506	685	3.8	0.6
LT MAS CPA MAS PORINAS							
S. typhi	66571	11882	27.7	8088	605	4.1	6.7
RESPUESTA AL ELIMINAR LINFOCITOS T							
CELULAS SOLAS	4513	505		435	205		
CELULAS MAS CON A	4241	221	0.9	890	98	2.0	0.5
CELULAS MAS LPS	3973	157	0.9	760	476	1.7	0.5
CELULAS MAS PORINAS DE S. typhi	3565	455	0.8	1061	51	2.4	0.3

Esplenocitos de ratón C57Bl/6 inmunizados con PME de *S. typhi* se trataron con una mezcla de anticuerpos monoclonales contra Thy1, L3T4 y Lyt2 y complemento de cobayo, durante 30 minutos. Las células viables se cultivaron en presencia de porinas de *S. typhi* en DME al 10% de SFB suplementado con antibióticos y  $\beta$ -2-mercaptoetanol, durante cinco días en un volumen de 200  $\mu$ l en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano, durante cinco días, 18 horas antes de terminar el cultivo se agregó 1  $\mu$ Ci de  3 HTDr. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido.

#### 7.3.4. Efecto del lipopolisacárido.

Ya que se observó que en todos los modelos experimentales existía una estimulación tanto en los ratones inmunes como en los testigos, que no se podía atribuir al antígeno, se decidió tratar de eliminar el efecto del LPS en los cultivos de esplenocitos.

La polimixina B (pol B) tiene la propiedad de adsorber al LPS y evitar que se presente sus efectos biológicos *in vitro*; sin embargo, es muy tóxica y tiene límites de seguridad muy estrechos. Por esto, se determinó primeramente la concentración máxima no tóxica en cultivo.

Se cultivaron esplenocitos de ratón NIH con Con A a una concentración de 10 µg/ml y pol B entre 2.5 y 200 µg/ml. En la figura 7.18 se presentan los resultados de un experimento representativo. Se observa que a partir de los 15 µg/ml la pol B afecta notablemente la activación de los esplenocitos por el mitógeno. por lo que se decidió utilizarla a 5 µg/ml en todos los ensayos posteriores.

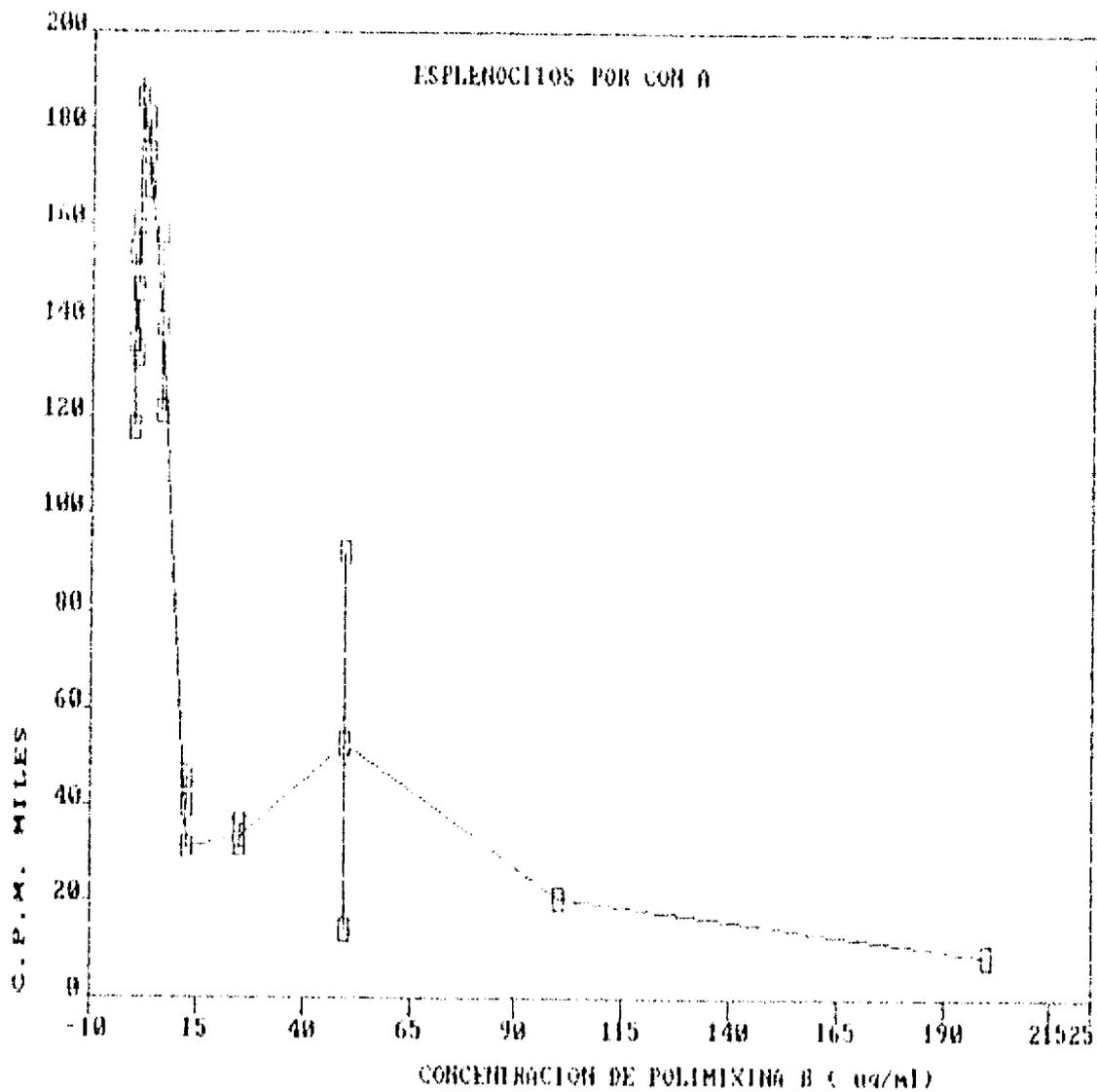
En la figura 7.19 se presenta un ensayo de estimulación de esplenocitos con diversas combinaciones de los mitógenos. Cuando se cultivaron los esplenocitos en presencia de Con A a 10µg/ml y polimixina B a 5 µg/ml no se observó efecto citotóxico, tampoco al cultivarlos con LPS, pol B y Con A. Los linfocitos cultivados en presencia solo de LPS se activan, aunque no en la misma magnitud que con la Con A; en los linfocitos que fueron cultivados en presencia de LPS más pol B, la respuesta proliferativa disminuye notablemente, si bien no se abate completamente.

Con estos resultados se concluye que es posible eliminar de manera parcial el efecto mitogénico del LPS en cultivo.

Una vez determinada la dosis óptima de pol B se realizaron

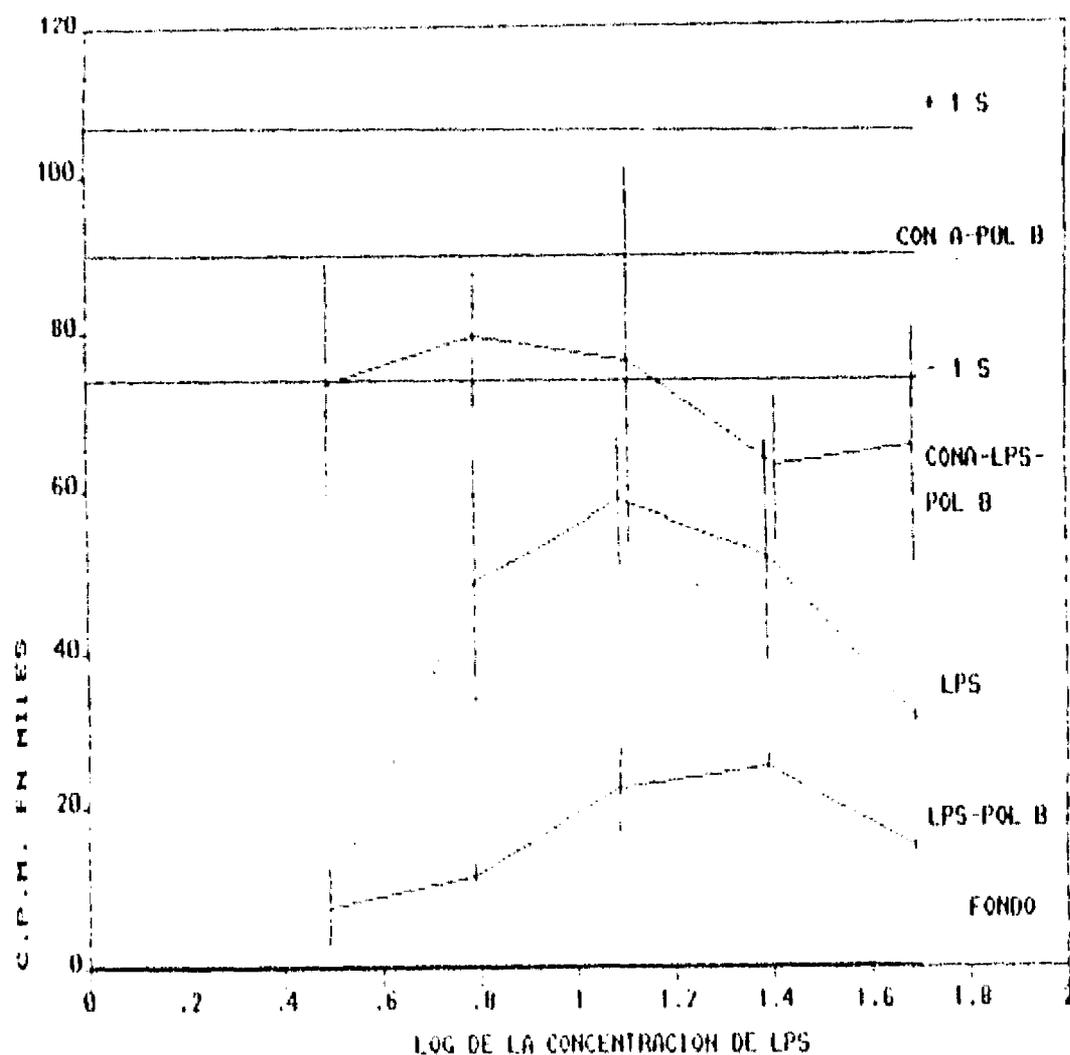
## FIGURA 7. 18

DETERMINACION DE LA DOSIS OPTIMA DE POLIMIXINA B.



Se obtuvieron esplenocitos de ratón NIH normal y se cultivaron 200 mil células en por pozo en placas de 96 pozos de fondo redondo en DME al 10 % de SFB, suplementado con antibióticos y  $\beta$ -2-mercaptoetanol y adicionando 10  $\mu$ g/ml de concanavalina A y diferentes concentraciones de polimixina B. El cultivo se interrumpió a los cinco días, 18 horas antes se adicionó 1  $\mu$ Ci de  3 HTdr, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se encuentran expresados en C. P. M.

**FIGURA 7. 19.**  
**EFFECTO DE LA POLIMIXINA B SOBRE LA ESTIMULACION**  
**POR DIVERSOS MITOGENOS.**



Se cultivaron esplenocitos de ratón NIH normal en presencia de diversas combinaciones de mitógenos (LPS o Con A) con polimixina B. Se utilizó DME al 10% suplementado con antibióticos y  $\beta$ -2-mercaptoetanol en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano en un volumen final de 200  $\mu$ l, durante 5 días, 18 horas antes de terminar el cultivo se adicionó 1  $\mu$ Ci de ³H TDr, la incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados están expresados en C. P. M.

**TABLA 7. 17.**  
EFECTO DE LA POLIMIXINA B SOBRE LA ESTIMULACION DE  
ESPLENOCITOS POR PORINAS.

ESTIMULO	RATON INMUNE			RATON TESTIGO			
	MEDIA	E.S.	I.E.	MEDIA	E.S.	I.E.	C.E.
CELULAS SOLAS	3785	76.0	-	2083	48.3	-	-
CONCANÁVALINA A	292976	14340.0	77.4	224980	20108.0	108.0	0.7
LIFOPOLISACARIDO	92925	5689.0	24.6	21872	310.7	10.5	2.3
PORINAS							
S. typhi	15615	1439.3	4.1	6475	1543.7	3.1	1.3
S. typhimurium	12825	1919.7	3.4	2097	65.3	1.0	3.4
E. coli	21958	774.0	5.8	3252	335.7	1.6	3.7
PORINAS+LPS							
S. typhi	106664	2801.7	28.2	18280	2972.7	8.8	3.2
S. typhimurium	93264	7742.3	24.6	16928	2899.7	8.1	3.0
E. coli	105621	2907.0	27.9	9418	1243.3	4.5	6.2
PORINAS+LPS+POL B							
S. typhi	43088	5144.3	11.4	10557	398.3	5.1	2.2
S. typhimurium	15613	4615.7	4.1	1430	37.0	0.7	6.0
E. coli	24987	3617.0	6.6	4947	475.3	2.4	2.8
PORINAS+POL B							
S. typhi	44517	7186.7	11.8	9940	159.0	4.8	2.5
S. typhimurium	11833	2079.7	3.1	2243	117.7	1.1	2.9
E. coli	11067	527.7	2.9	3638	60.7	1.7	1.7

Un ratón NIH hembra de 18 gramos fue inmunizado con PME de *S. typhi*, 30µg en TRIS 0.01M por vía intraperitoneal, a los 7 días recibió una segunda dosis y mes y medio después se obtuvieron esplenocitos; los cuales se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos, 200 mil células por pozo en presencia de 20 µg/ml de porinas y adicionando 5µg/ml de polimixina B. Se incluyen como testigos pozos con LPS de *S. typhi* 0 901 extraído por el método de Fenol-agua, y pozos con concanavalina A, 10 µg/ml. El cultivo se interrumpió a los cuatro días, 18 horas antes se agregó un µCi de ³HTDr. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se encuentran expresados en cuentas por minuto. Se calculó la media y el error estandar de triplicados.

ensayos adicionándolo al sistema de estimulación por porinas. La tabla 7.17 presenta un experimento donde se cultivaron esplenocitos de ratón NIH inmunizado con PME de *S. typhi* con porinas solubles, porinas mas LPS, porinas mas LPS y pol B o porinas mas pol B. La pol B elimina el efecto del LPS adicionado al cultivo y no se observa efecto en los pozos donde cultivó en presencia de porinas. Por lo que se concluye que la activación que se observa en los ensayos se debe a las porinas y no al efecto del LPS.

#### 7.3.4. Ensayos en papel de nitrocelulosa.

##### a) PME de *Salmonella typhi*.

Una vez que se determinó que las porinas generan respuesta inmune celular específica, se decidió localizar el sitio donde se encuentran los determinantes antigénicos.

El procedimiento de purificación de porinas que se utiliza en el Laboratorio de Inmunoquímica aún no permite la obtención de cantidades ilimitadas de estas proteínas. Por tanto se buscó un método que permitiera la identificación de los péptidos responsables de inducir inmunidad celular utilizando la menor cantidad de antígeno. El procedimiento consiste en la separación de las proteínas por SDS-PAGE, su transferencia a papel de nitrocelulosa y la adición de este al cultivo de linfocitos inmunes.

Primeramente se evaluó el efecto del papel de nitrocelulosa y de los colorantes utilizados para localizar las bandas protéicas, en los ensayos de activación. Pues ambos pudiesen tener efecto tóxico o mitogénico.

Para ello, se inmunizaron ratones NIH con 30  $\mu$ g de PME de *S. typhi* los días 0 y 7 i.p, se sacrificaron el día 14 y se cultivaron los esplenocitos en presencia de suspensiones de papel de nitrocelulosa a las que previamente se les había agregado PME. Como testigos se incluyeron: papel de nitrocelulosa solo o con PME teñido con rojo de Ponceau y lavado con PBS-Tween 20 al 0.1%.

Las figuras 7.20.A y 7.20.B presentan un experimento representativo. Se observa que tanto para el ratón testigo como para el inmune, el papel de nitrocelulosa sin antígeno genera respuesta mitogénica, pero es posible diferenciar claramente la estimulación específica por el antígeno. El rojo de Ponceau no tiene efecto citotóxico; por el contrario, el papel teñido y lavado generó mayor respuesta que el papel que solo contenía a las PME.

b) PME DE *S. typhi* separadas por SDS-PAGE.

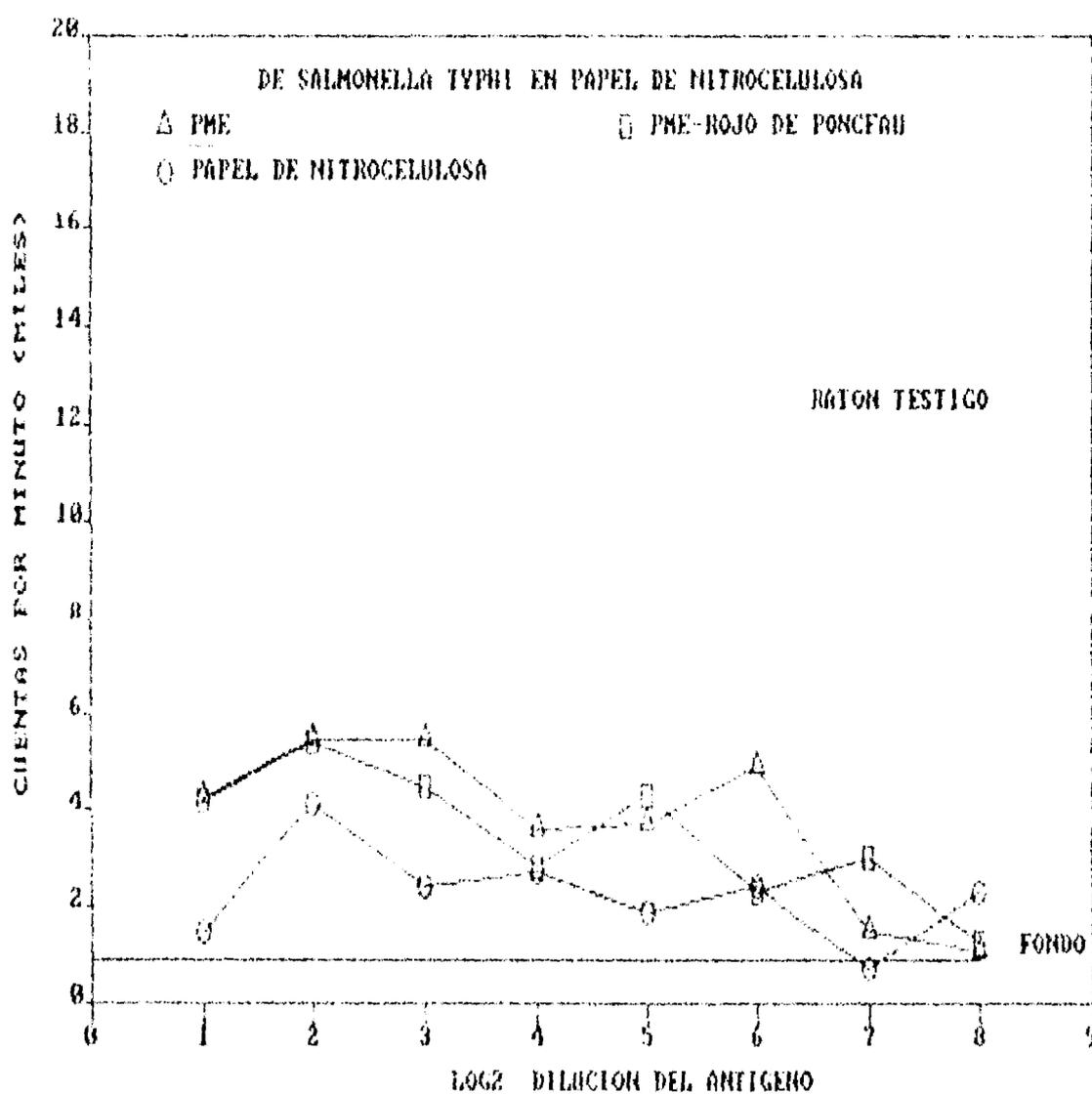
Una vez que se determinó que es posible observar la activación cuando el antígeno se adiciona en papel de nitrocelulosa, se trató de observar cuál de las PME induce mejor respuesta inmunológica.

Para ello, se inmunizaron ratones NIH de la manera descrita y las células linfoides se cultivaron en presencia de papel solo, papel de nitrocelulosa con las PME obtenidas de la separación electroforética y con porinas solubles de *S. typhi*.

En la figura 7.21 se presenta el resultado de un experimento en el que se cultivaron esplenocitos en presencia de dos bandas, la designada como A corresponde a las porinas y la B a otras proteínas con menor peso molecular. Llama la atención que la banda B aparentemente tiene actividad mitogénica, estos resultados se repitieron en varios experimentos.



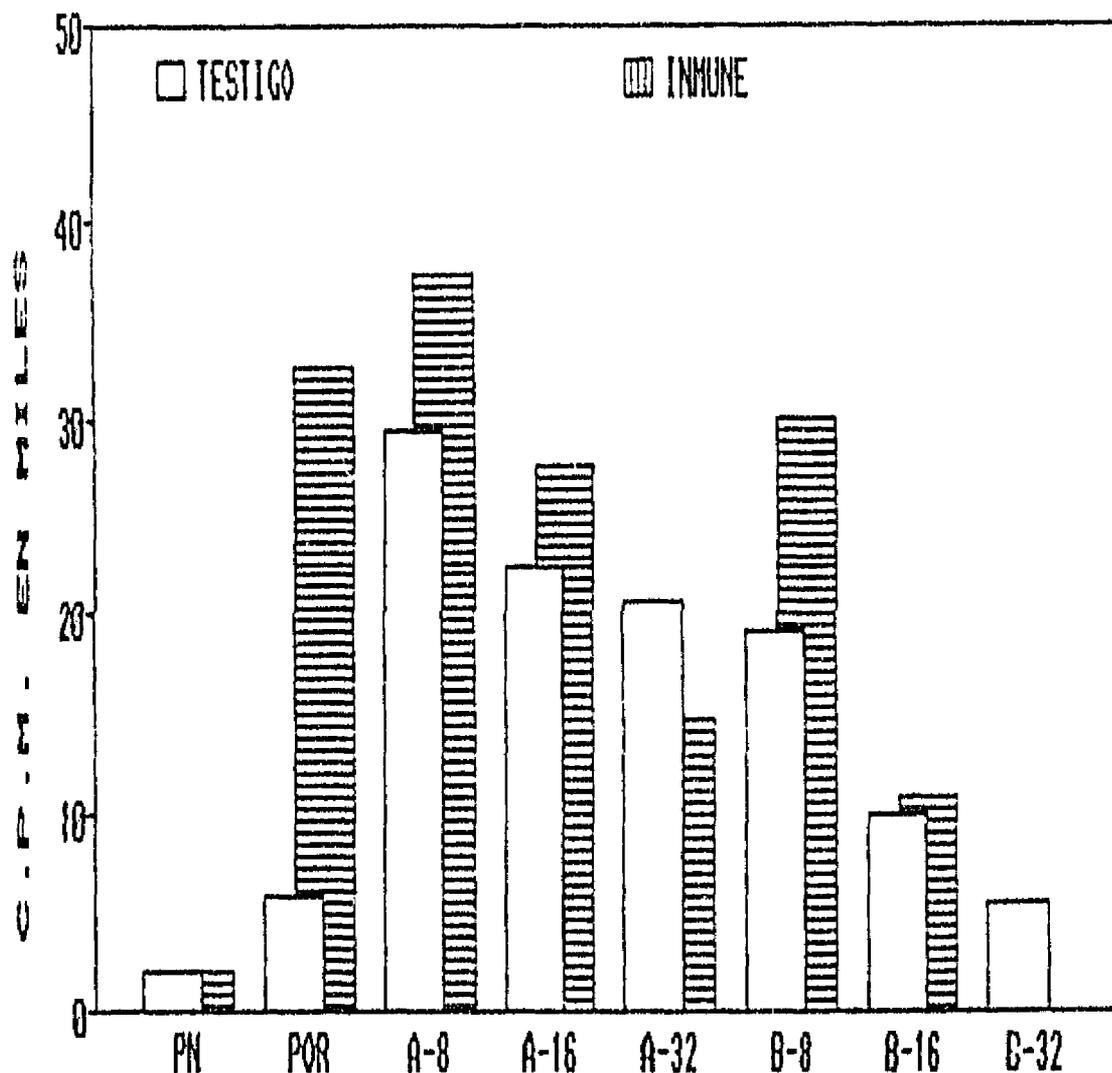
FIGURA 7. 20. B.  
ESTIMULACION DE ESPLENCITOS POR PHE DE *Salmonella typhi* EN PAPEL DE NITROCELULOSA  
RATON TESTIGO.



Se inmunizaron ratones NIH con 20  $\mu$ g de PHE de *S. typhi* los días 0 y 7 i.p., se sacrificaron el día 14. Se cultivaron 200 mil esplenocitos en placas de microcultivo de 96 pozos en presencia de suspensiones de papel de nitrocelulosa solo, papel de nitrocelulosa con PHE y papel de nitrocelulosa con PHE teñido con rojo de Fonceau y lavado con PBS-Tween 20 al 0.1%. El cultivo se interrumpió 5 días y 18 horas antes se adicionaron por pozo 1  $\mu$ Ci de  3 HTdR cuya incorporación se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados están expresados en cuentas por minuto y se presenta la media de triplicados.

## FIGURA 7. 21.

ESTIMULACION DE FORINAS DE *Salmonella typhi*  
SEPARADAS POR SDS-PAGE Y TRANSFERIDAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.



Células mononucleares de ratones NIH inmunizados con PME de *S. typhi*, se cultivaron en presencia de papel de nitrocelulosa con las PME de *S. typhi* obtenidas de la separación electroforética, durante cinco días y 18 horas antes de terminarlo se adicionó 1  $\mu$ Ci/pozo de  3 HTDr, la incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo líquido. Las PME de *S. typhi* se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Para comprobar el corrimiento electroforético se cortó una porción del gel y se tiñó con azul de Coomassie. Para observar las bandas proteicas transferidas se tiñó el papel con rojo de Ponceau y se lavó con PBS-Tween 20 al 0.1%. Se trató cada banda de papel como se describe en los métodos. Los resultados están expresados en C. P. M.

c) Péptidos de porinas de *Salmonella typhi*.

Para tratar de localizar las porciones inmunodominantes en las porinas, los péptidos digeridos por BrCN se corrieron por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa, las regiones conteniendo los péptidos fueron tratadas como se ha descrito y se probaron en ensayos de activación de linfocitos.

En la tabla 7.18 se presenta el resultado de un experimento de un ratón inmunizado con PME de *S. typhi* de acuerdo al esquema descrito, se observa que el péptido de 16 KDa genera la mayor activación de linfocitos.

#### 7.4. DETERMINACION DE ANTICUERPOS.

Para comparar la respuesta inmune humoral respecto a la celular se decidió determinar el nivel de anticuerpos contra porinas en los ratones que se analizaron en los modelos de activación de linfocitos.

En la figura 7.22.A y 7.22.B se presentan la determinación de anticuerpos contra porinas por ELISA en un ratón C57Bl/6 inmunizado con PME de *S. typhi*. En las figuras 7.23.A y 7.23.B se presentan los resultados de un ratón BALB/c inmune y otro testigo, respectivamente. Se observa que la respuesta de anticuerpos a las porinas de *S. typhi* es buena en ambas cepas de ratones, hay reactividad cruzada importante en la respuesta a *E. coli*. Los ratones BALB/c no presentaron reactividad cruzada importante cuando se cultivaron en presencia de porinas de *S. typhimurium*. Estos resultados se repitieron en varios experimentos realizados y son

consistentes con los modelos de activación *in vitro* de linfocitos.

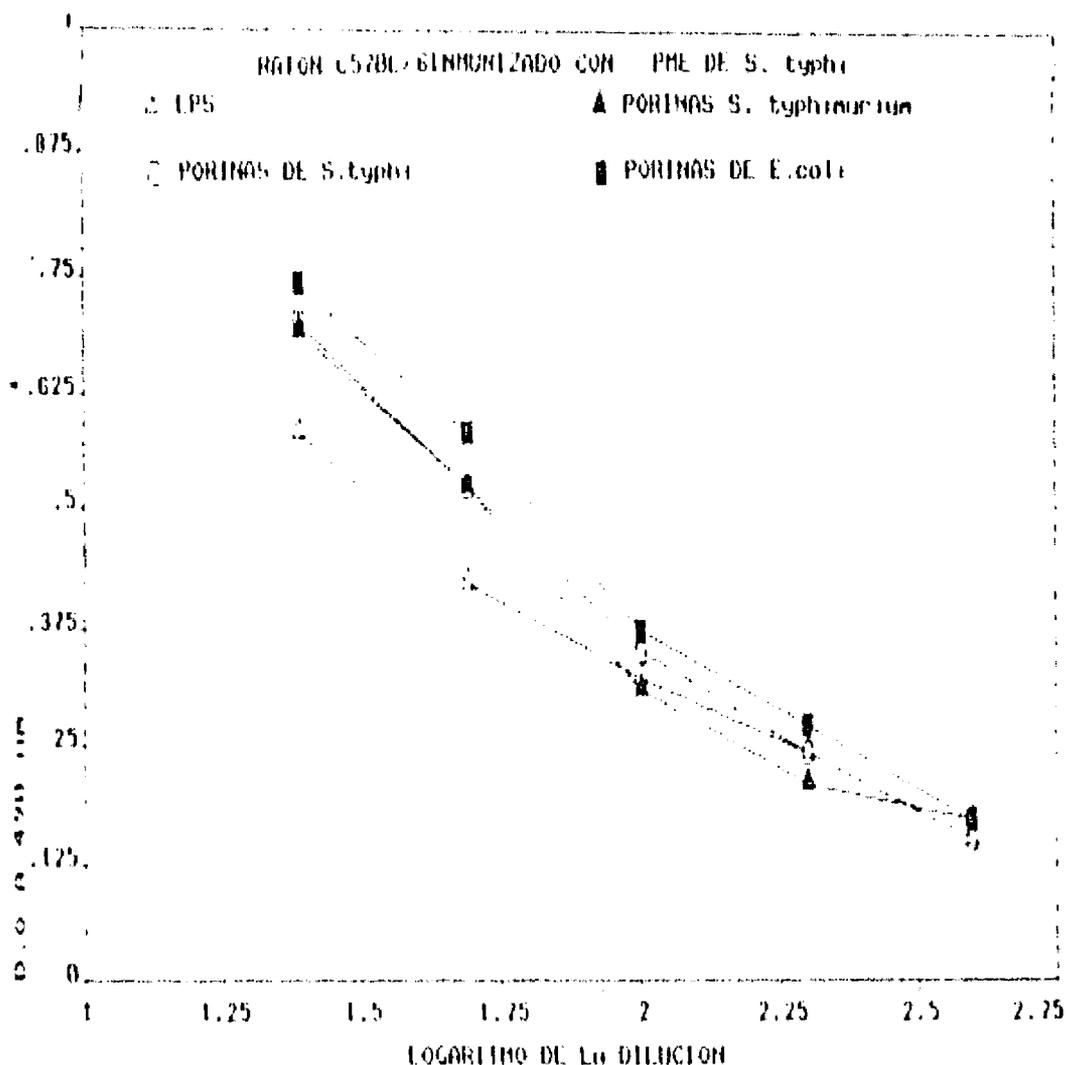
Estos resultados sugieren que existe una relación entre las características genéticas del ratón y la magnitud de respuesta a las porinas, tanto en la rama efectora humoral como la celular, y derivó hacia un estudio mas detallado de este aspecto, motivo de otro trabajo del laboratorio (74).

**TABLA 7. 18**  
**ESTIMULACION DE LIONFOCITOS POR PEPTIDOS DE PORINAS**  
**DE *Salmonella typhi* EN PAPEL DE NITROCELULOSA.**

ESTIMULO	RATON INMUNE			RATON TESTIGO			
	MEDIA	D.E.	I.E.	MEDIA	D.E.	I.E.	C.E.
CELULAS SOLAS	493	84		313	93		
PORINAS SOLUBLES	9253	2140	18.77	867	71	2.77	6.78
PAPEL NITROCELULOSA	770	204	1.56	400	23	1.28	1.22
PEPTIDO 29	7408	1279	15.03	480	59	1.53	9.80
PEPTIDO 19	6797	605	13.79	127	49	0.41	33.98
PEPTIDO 16	15007	2974	30.44	528	19	1.69	18.05
PEPTIDO 9	7778	1002	15.78	937	358	2.99	5.27

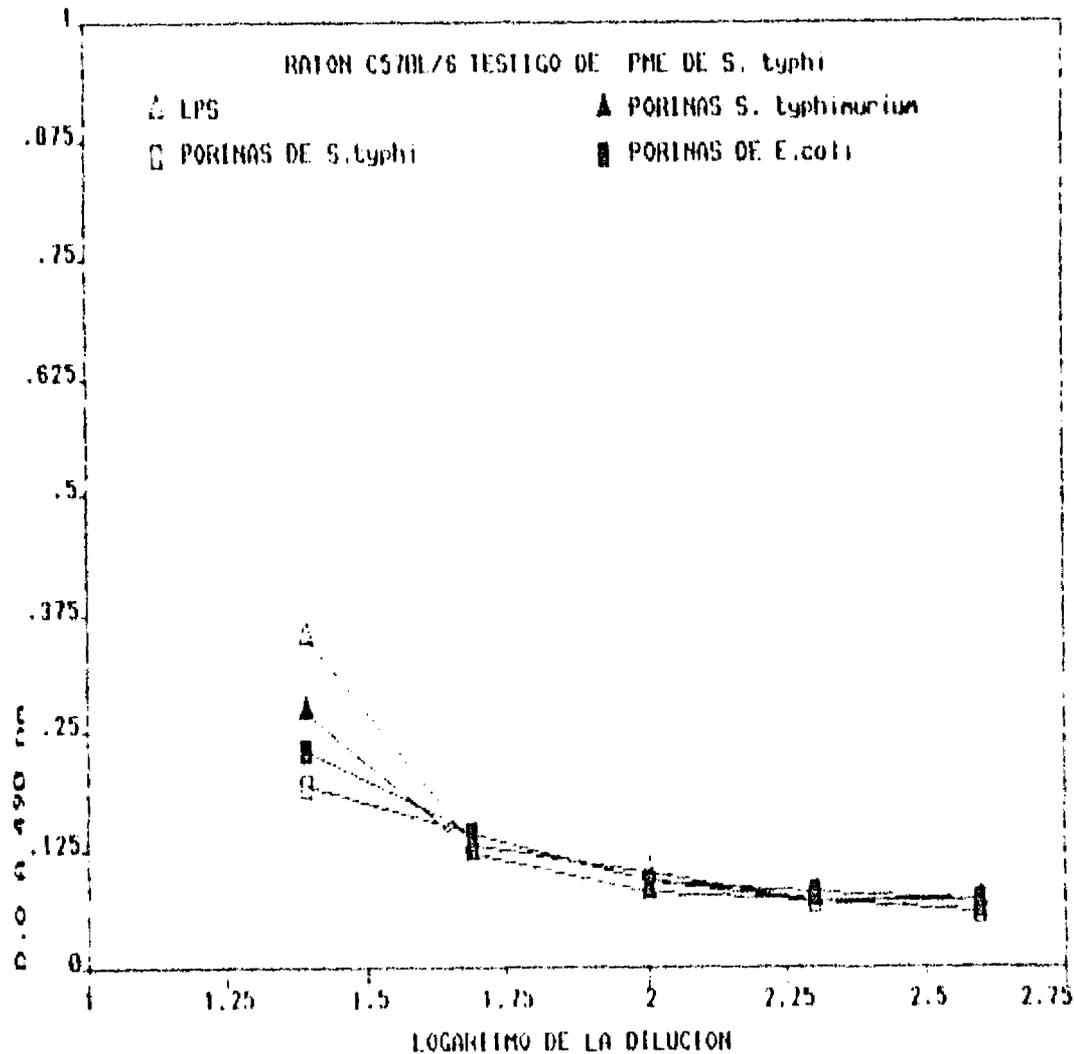
Se obtuvieron esplenocitos de ratones inmunizados con PME de *S. typhi* y se cultivaron en presencia de suspensiones de papel solo, papel de nitrocelulosa con los diferentes péptidos obtenidos de la separación electroforética, con porinas solubles de *S. typhi* y con Con A. El cultivo fue suspendido al quinto día y 18 horas antes, se colocaron 1  $\mu$ Ci/pozo de  $^3\text{H}T\text{Dr}$ , cuya incorporación fue determinada en un contador de centelleo líquido. Los resultados están expresados en cuentas por minuto, dando la media y la desviación estándar de los triplicados.

FIGURA 7. 22. A.  
 DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA PORINAS  
 RATON C57B1/6 INMUHE.



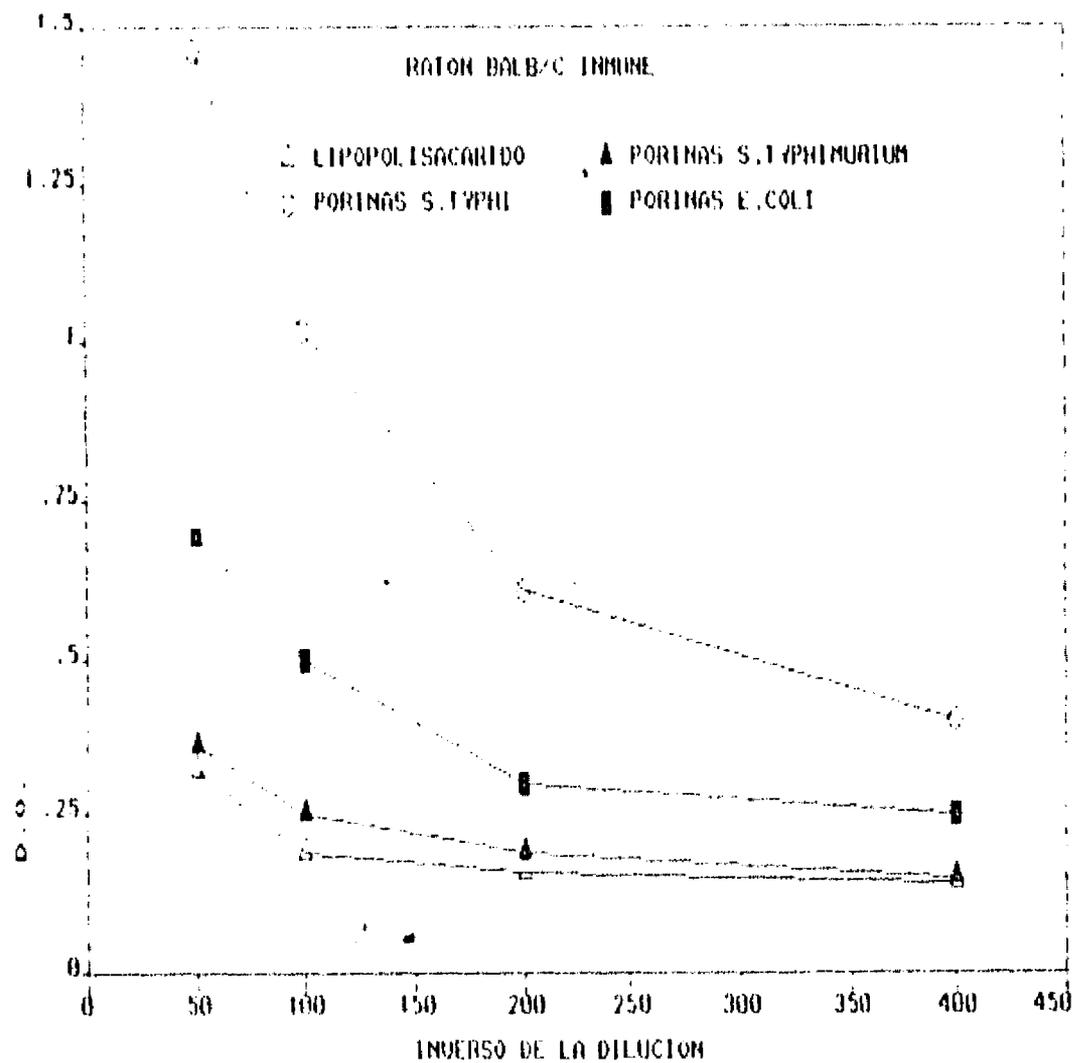
Ratones C57B1/6 de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9,12,d:V1) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Los ratones testigos recibieron SSF. Se extrajo suero el día 25, y se determinaron anticuerpos anti-porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* por ELISA.

FIGURA 7.22.B  
 DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA PORINAS  
 RATON C57B1/6 TESTIGO.



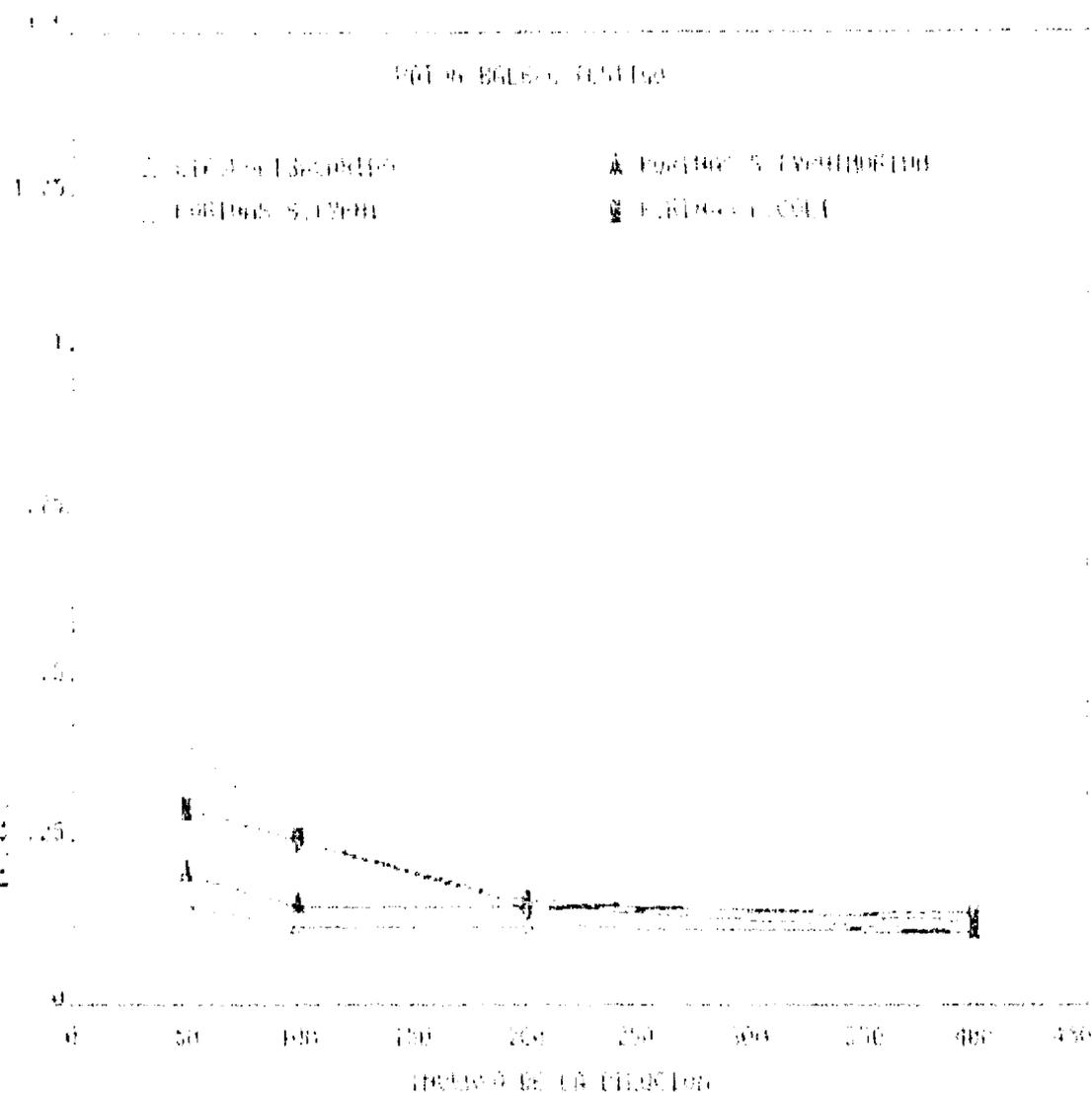
Ratones C57B1/6 de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9,12,d:Vi) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Los ratones testigos recibieron SSF. Se extrajo suero el día 25, y se determinaron anticuerpos anti-porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* por ELISA.

**FIGURA 7.23. A**  
**DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA PORINAS**  
**RATON BALB/c IMMUNE.**



Ratones BALB/c de 15 a 17 gr, hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9,12,d:Vi) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30 µg i.p. en TRIS pH 7.8 0.01 M.; día 15, misma dosis. Los ratones testigos recibieron SSP. Se extrajo suero el día 25, y se determinaron anticuerpos anti-porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* por ELISA.

**FIGURA 7.23.B**  
 DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA PORINAS  
 RATON BALB/c TESTIGO.



Ratones BALB/c de 15 a 17 gr. hembras, fueron inmunizados con PME de *S. typhi* (9,12,d:Vi) de acuerdo al protocolo siguiente: día cero 30  $\mu$ g i.p. en TRIS pH 7.3 0.01 M.; día 15, misma dosis. Los ratones testigos recibieron SF. Se extrajo suero el día 25, y se determinaron anticuerpos por anti-porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* por ELISA.

## 8. DISCUSION.

### 8.1. LOGROS.

#### 8.1.1. Purificación de antígenos.

El patrón electroforético de las PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d aisladas por el método de Schnaitman fue muy similar a lo encontrado por Kamio para *S. typhimurium* (53). Se obtuvieron tanto las proteínas principales como las secundarias o menores, con pesos moleculares que van de 17 a 70 kDa, de las cuales destacan dos proteínas de 36 a 41 kDa, que corresponden a las proteínas formadoras de canales o porinas.

Este método permite la obtención de PME en su estado nativo, debido a que no se emplean procedimientos drásticos en la extracción, aunque tiene como desventaja que el contenido de LPS en las preparaciones es alto. Esto se debe a que algunas PME están unidas de manera no covalente al LPS.

El patrón de elución de las porinas de las tres Enterobacterias utilizadas en este trabajo fue muy semejante. Llama la atención que las porinas levigan muy cercanamente al volumen de exclusión de la columna de Sephacryl S-200 utilizada. Los pesos moleculares obtenidos son de 100 a 150 mil aproximadamente, por lo que se infiere que las porinas se encuentran en forma de trimeros en esas condiciones.

La contaminación por LPS en las PME fue de aproximadamente 4 % y en las porinas de 0.01% pero puede observarse que sobre todo en los experimentos de activación en ratones inmunizados con la bacteria total.

En relación a la obtención de péptidos, es importante considerar que el BrCN es uno de los agentes químicos que escinde las

cadenas polipeptídicas en residuos de aminoácidos bien definidos, el número de fragmentos producidos a partir de una proteína puede predecirse según el número de residuos de metionina que contiene (45).

El mecanismo consiste en el rompimiento del 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. La digestión se lleva a cabo a 25°C durante 20 hrs. Con el fin de solubilizar el BrCN y que pueda reaccionar con las proteínas, la solución de ácido fórmico al 70% es la más adecuada pues concentraciones menores permiten la oxidación del triptofano y las más elevadas resultan en una acción inhibitoria del BrCN.

Como desconocemos la estructura primaria completa de las porinas de *S. typhi*, y considerando que existe una alta homología entre las porinas de otras Enterobacterias, mediante el uso del programa para computadora PCGENE, se determinaron los péptidos que se formarían al romper las porinas OmpC y OmpF de *E. coli*.

El programa simula una digestión con BrCN, proporcionando las características fisicoquímicas de dichos péptidos, como son el punto isoeléctrico (PI), la cantidad de aminoácidos y el peso molecular de cada uno de ellos (tabla 8.1).

De acuerdo al programa, el BrCN produce el rompimiento de las porinas en tres residuos de metionina, lo cual repercute en la producción de cuatro polipéptidos, que tendrían pesos moleculares estimados de 21, 9, 6 y 4 kDa.

### 8.1.2. Ensayos de activación.

Los ensayos de activación de linfocitos con porinas nos permiten concluir que los ratones NIH son capaces de reconocer a las porinas en el contexto de la bacteria total. Pues los linfocitos de ratones inmunizados con *S. typhimurium* proliferaron en presencia de las proteínas solubles.

Las porinas purificadas no pierden su inmunogenicidad, pues los linfocitos de ratones inmunizados con estas proteínas también se activaron en presencia de las proteínas solubles. En estos experimentos se observa una reactividad cruzada importante con porinas de *S. typhi* y *E. coli*. Estos resultados no son consistentes con los encontrados por Matsui (73), quien reporta que la activación de linfocitos de ratones BALB/c inmunizados *S. typhimurium*, mediada por la producción de IL-2, es siempre mayor cuando se cultivan los esplenocitos con la cepa homóloga de la bacteria. En sus experimentos, sin embargo, no prueba porinas de *S. typhi*.

La reactividad cruzada importante sugiere que existe una alta homología entre las diferentes porinas y que se comparten algunos determinantes antigénicos. Deben tener, sin embargo, algunos determinantes específicos, que seguramente están relacionados con la patogenia del padecimiento.

Los ensayos realizados en presencia de pol B permitieron establecer que en los ensayos de activación a dosis adecuadas de antígeno, la activación de linfocitos no se debe a la actividad del LPS.

La baja respuesta hacia *S. typhimurium* puede explicarse por lo menos de tres maneras. Primero, es posible que la concen-

tración de antígeno en los pozos de este antígeno haya sido menor por fallas en la técnica de cuantificación de proteína. Esta explicación es poco probable porque se utilizaron varios lotes de porinas y los resultados fueron además consistentes con la determinación de anticuerpos.

En segundo lugar Udhayaumar y Muthukkaruppan (141) han descrito que las cepas avirulentas de *S. typhimurium* generan poca respuesta inmunológica en ratones BALB/c. Es posible que la cepa de *S. typhimurium* utilizada en nuestros experimentos haya perdido virulencia. De cualquier modo, esta diferencia debe alertar sobre la posibilidad de que exista una relación entre la capacidad de respuesta inmune celular y protección a la infección por *Salmonella*.

Es también atractivo pensar que el ratón, que es naturalmente susceptible a la infección por *S. typhimurium*, es incapaz de montar respuesta celular hacia las porinas de esta bacteria, en tanto que si responde a las porinas de otras enterobacterias.

Se ha descrito un método para activar linfocitos, empleando antígenos de difícil purificación (1). El método consiste en obtener el antígeno, separarlo por SDS-PAGE, transferir a papel de nitrocelulosa y transformar las bandas proteicas, en suspensiones finas por medio de dimetilsulfoxido. Sin embargo, este método nos permite purificar al antígeno; además, la cantidad de PME necesarias para la separación por SDS-PAGE es mínima y con las suspensiones de papel se logran buenas activaciones celulares. Una modificación hecha al método propuesto por Abou-Zeid, consistió en teñir el papel de nitrocelulosa con rojo de Ponceau, localizando

de esta manera las bandas proteicas.

La técnica descrita permitió obtener porinas separadas de las otras PME y la cantidad de proteínas en las suspensiones de papel de nitrocelulosa fue suficiente para provocar una respuesta proliferativa celular *in vitro* de esplenocitos de ratones previamente inmunizados con PME . La mayor respuesta celular se obtuvo como en la ocasiones anteriores, con las porinas y menor para el resto de las PME.

El objetivo de montar esta técnica era el probar la capacidad de los péptidos de activar linfocitos, para localizar los determinantes antigénicos dominantes en las porinas. De las varias posibilidades de rompimiento de las porinas se eligió el tratamiento con BrCN, por considerarlo el más adecuado.

Se ha descrito la digestión con BrCN de algunas proteínas, entre las cuales se encuentran la lisozima, la termolisina y la proteína IB de *Neisseria gonorrhoeae* y se ha comparado la inmunogenicidad que se obtiene con los peptidos con la proteína completa respectiva (8,132,133). Las proteínas rotas por BrCN pierden algunos determinantes antigénicos y se generan otros no presentes en la proteína nativa, tal es el caso de la lisozima y la proteína IB. Así, se ha establecido que algunos epitopes inmunosilenciosos están encubiertos por la conformación de la proteína. (8,132)

De los tres péptidos probados, el de peso molecular de 10 kDa generó mayor proliferación de linfocitos inmunes, por lo que se supone que en ese péptido se localiza el determinante antigénico inmunodominante.

## 8.2. LIMITACIONES.

Los experimentos de evaluación de la respuesta inmune celular que generan las PME de *Salmonella* que se describen en este trabajo tienen diversos inconvenientes y limitaciones, entre los cuales se identifican los siguientes:

Primero, al trabajar con ratones de cepa abierta los fenómenos inmunológicos pueden estar influenciados por la susceptibilidad individual.

Segundo, el utilizar poblaciones de linfocitos totales de bazo no permite identificar cual población celular es la que se activa al tener contacto con el antígeno soluble. Existen, sin embargo, evidencias indirectas de que las porinas son capaces de activar linfocitos T, porque el tratamiento con pol B no disminuye la magnitud de la respuesta. Pero el LPS presente en las porinas de hecho activó poblaciones de linfocitos B, lo que es más notorio en los primeros experimentos donde se inmunizaron ratones NIH con *Salmonella typhimurium*. Es entonces, importante realizar experimentos donde se determine la producción de interleucinas 2 y 3, lo que se está implementando en nuestro laboratorio.

Otros inconvenientes están relacionados con los antígenos utilizados. Las porinas son en realidad una mezcla de cuando menos tres proteínas, todas con una alta homología entre sí; con características fisicoquímicas, como el peso molecular o el PI muy semejantes, y por lo tanto difíciles de separar. En consecuencia, los experimentos realizados con las PME deben ser considerados como introductorios al estudio de la inmunidad celular en la Salmonellosis pero es necesario un análisis más detallado utilizando

antígenos más purificados.

El estudio de la respuesta inmune a los péptidos de porinas tiene precisamente ese inconveniente; fue posible establecer el tamaño del péptido que genera inmunidad celular, pero no podemos identificarlo.

Además, por otro lado, el ensayo de estimulación de esplenocitos con el antígeno en papel de nitrocelulosa tiene el inconveniente, muy importante, de que desconocemos la concentración de antígeno que se adiciona a los cultivos. Mediante marcaje radiactivo, se sabe que las papeles de nitrocelulosa conservan gran proporción de la proteína (134) y que la cantidad de proteína necesaria para activar linfocitos es mucho menor con este sistema, pero considerando que las diferentes PME tienen distinta concentración en la membrana, de principio se adicionan a los linfocitos en condiciones diferentes. Lo mismo puede decirse de los péptidos.

Los intentos realizados en el laboratorio para marcar radiactivamente a las porinas han sido poco alentadores. Por tanto, no fue posible establecer el porcentaje de proteína que queda en el papel de nitrocelulosa después del tratamiento con dimetilsulfóxido. Este ensayo también debe ser considerado como una primera aproximación de utilidad limitada y siempre deben realizarse experimentos con péptidos solubles purificados. Así, con los resultados obtenidos en este trabajo, se han realizado otros experimentos más extensos teniendo en cuenta estas observaciones (104).

### 8. 3. PERSPECTIVAS.

Este trabajo debe considerarse como introductorio hacia el estudio de la inmunidad celular en la Salmonellosis y los experimentos que se realizaron comprenden aspectos muy generales.

Se ha estudiado la asociación entre el sistema H-2 y la capacidad de respuesta hacia las porinas, encontrando que los ratones H2-K responden mejor que los H2-b y que los malos respondedores son los H2-d (74). Estos resultados son consistentes con las observaciones de Udhayaumar y Muthukkaruppan (138) quienes encuentran que las porinas solo son capaces de proteger contra 20 DL50 en ratones BALB contra el reto por *S. typhimurium*; en cambio, en ratones NIH la protección que obtuvieron los experimentos de Isibasi (47) fue de 500 DL50 al reto con *S. typhi*.

Hormaeche y Harrington encontraron además, que la DL50 en ratones congénicos de la línea C57B1 es mayor cuando son H-2K (42).

Se han realizado ensayos de transferencia pasiva de inmunidad mediante linfocitos T de diversas cepas de ratones inmunizados con *S. typhimurium* inactivada con calor, encontrando que los ratones C3HBF_e/J manejan mejor la infección que los C57B1/6 y que los BALB/c. Lo cual correlaciona con las observaciones anteriores (datos no publicados).

Para establecer de una manera más fina cual es el papel de las porinas en la respuesta inmune hacia la *Salmonella* actualmente se están tratando de obtener líneas e hibridomas de células T específicos contra las porinas. Los primeros permitirán realizar estudios de transferencia adoptiva de inmunidad y los segundos, la identificación de epítopos inmunodominantes en las porinas.

**TABLA 8.1.**  
**PRODUCTOS DEL ROMPIMIENTO DE PORINAS DE**  
*Escherichia coli*. POR BrCN

PORINA					
OmpC					
POSICION EN LA SECUENCIA	LONGITUD (aa)	PESO (kDa)	pI	TIEMPO DE RUPTURA	
3) Gln143 a Met342	200	21445	9	10 min	
2) Arg58 a Met 142	85	9484	3.6	2 min	
1) Lis2 Met 57	56	6002	4.5	3 min	
4) Ser343 a Phe377	35	4040	3.6	20 hrs	
OmpF					
3) Leu137 a Met329	193	21017	4.7	3 min	
2) Thr61 a Met136	76	8384	4.1	20 hrs	
1) Lis3 a Met60	58	6070	9.1	3 min	
4) Ser330 a Phe362	33	3610	3.1	20 hrs	

Ordenados de acuerdo a su longitud  
 Inouchy y cols. 1982. Nucleic Acids Res. 10:6957-6968.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Zeid, C.; Filley, E.; Steele, J. and 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 blots into antigen-bearing particles. *J. Immunol. Meth.* 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.; Trollifors, B.; Cramton, T.; Scheerson, R. and Robbins, J.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. Adamus, G.; Mulezka, M.; Witkowska, D. and Romanowska, E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. *Infect. Immun.* 30:321-324.

4. Anderson, E.S. 1968. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. *Symposio Series in Immunobiological Standarization.* 15: 79-86.

5. Anuario estadístico 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S. 1988.

6. Benjamin, W.H.Jr.; Turnbough, C.L.; Posey, B.E. and Briles, D.E. 1966. *Salmonella typhimurium* virulence genes necessary to exploit the *Ity^{S/S}* genotype of the mouse. *Infect. Immun.* 51: 872-878.

7. Blanco, F.; Arreguín, C.; González, C.R.; Paniagua, J.; Pelayo, R.; Muy, M.; Isibasi, A. y Kumate, J. 1989. Respuesta inmune celular a antígenos de *Salmonella typhi* en humanos. VIII Congreso Nacional de Inmunología, SLP, México.

8. Bonavida, B.; Miller, A. and Sercartz, E. 1969. Structural basis for immune recognition of lysozymes. I. Effect of cyanogen bromide on Hen Egg-white lysozyme. *Biochemistry.* 8: 968-979.

9. Bragg, P.D. and Hoy, C. 1972. Organization of protein in the native and reformed outer membrane of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 274: 478-488.

10. Braun, V. 1976. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 415:335-377.

11. Buchanan, T.M. and Arko, R.J. 1977. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs *J. Infect. Dis.* 135:879-887.

12. Buchanan, T.M.; Pearce, A.; Schoolnick, G.K. and Arko, R.J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pilli.

J. Infect. Dis. 136:132-137.

13. Buchmeier, N.A. and Schreiber, R.D. 1985. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Lysteria monocytogenes* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 7404-7408.

14. Cabrera, R.M. Cuantificación del ácido  $\beta$ -hidroximirístico como índice de contaminación en Proteínas de Membrana Externa de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. FES, Cuautitlan, UNAM, México, 1988.

15. Chesnut, R. W.; Colon, S.M. and Gery, H.M. 1982. Requirements for the processing of antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumor and macrophages. J. Immunol. 129: 2382-2388.

16. Colwell, D.E.; Michalek, S.M. and McGhee, J.R. 1986. *Ips* gene regulation of mucosal immunity and susceptibility to *Salmonella* infection in mice. Curr. Topics. Microbiol. Immunol. 124:121-147.

17. Coutinho, A. 1976. Genetic control of B-cell responses. II. Identification of the spleen B-cell defect in C3H/HeJ mice. Scand. J. Immunol. 5:120-140.

18. Coutinho, A.; Gronowicz and B.M. Sultzer. 1975. Genetic control of B-cell responses. I. Selective unresponsiveness to Lipopolysaccharide. Scand. J. Immunol. 4:139-143.

19. Cryz, J.R.; Furer, E.; Baron, L.S.; Noon, K.F.; Rubin, F.A. and Kopencok, D.J. 1989. Construction and Characterization of a Vi-Positive Variant of the *Salmonella typhi* Live Oral Vaccine Strain Ty21a. Infect. Immun. 57: 3863-3868.

20. Cvjetanovic, B. and Vemun, K. 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull. WHO. 32:29-36.

21. Davies, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Gingberg, H.S. and Wood, W.B. 1983. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. Barcelona, España.

22. Dham, S.K. and Thompson, R.A. 1982. Humoral and cell-mediated immune responses in chronic typhoid carriers. Clin. Exp. Immunol. 50: 30-40.

23. Dham, S.K. and Thompson, R.A. 1982. Studies of cellular and humoral immunity in typhoid fever and TAB vaccinated subjects. Clin. Exp. Immunol. 48: 389-395.

24. Di Rienzo, J.; Nakamura, K. and Inouye, Y. 1978. The outer membrane protein of Gram-negative bacteria: Biosynthesis assembly and functions. Annu. Rev. Biochem. 47: 481-532.

25. Eisen, H.H. and Siskind, G.W. 1969. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3: 996-1008.

26. Eisenstein, T.K. 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in "ribosomal vaccines" prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 12: 364-367.

27. Eisenstein, T.K.; Killar, L.M. and Sultzer B.H. 1984. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: Mouse-Strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J. Infect. Dis.* 150: 425-435.

28. Eisenstein, T.K.; Deakins, L.W.; Killar, L.; Saluk, P. H, and Sultzer, B. M. 1982. Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3H/BJ mice and other strains in the C3H lineage. *Infect. Immun.* 36: 695-703.

29. Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 8:874-879.

30. Felix, A.; Erikorian, K.S. and Keitler, R. 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. *J. Hyg.* 35: 421-427.

31. Frasch, C.E. and Robbins, J.D. 1975. 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.

32. Fukazahua, Y.; Kagaya, K. and Ishibashi, Y. 1983. Effect of delayed-type hypersensitivity reaction and transferred lymphokine on resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 39: 986-989.

33. Germanier, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. *Bol. Of. San. Panam.* 82:300-311.

34. Germanier, R. 1984. Typhoid fever. In *Bacterial vaccines*. Ed. Germanier, R. Academic Press. pp.137-165.

35. Germanier, R. and Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E mutant Ty21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 131:553-558.

36. Germanier, R. 1986. The live oral typhoid vaccine Ty21a: Recent field trial results. *Slavo International Conference on Bacterial vaccines and local immunity*. Siena, Italy. pp.10-12.

37. Gilleland, H.E.; Parker, M.G.; Matthews, J.W. and Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* 44:49-54.

38. Glode, M.L.; Scher, I.; Osborne, B. and Rosenstreich, D.L.

1976. Cellular mechanism of toxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* 116: 454-461.

39. Guling, P.A.; McCracken, G.H.; Frich, C.F.; Johnston, K.H. and Hansen, E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect. Immun.* 37:82-88.

40. Hejfec, L.B.; Salmin, L.V.; Lejtman, M.Z.; Kuz'minova, M.L.; Vasil'eva A.V.; Levina, L.A.; Bencianova, T.G.; Pavlova, L.A. and Antanova, A.A. 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull WHO.* 30:321-339.

41. Hoham, A. W. 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infect. Immunol.* 22: 763-770.

42. Hormaeche, C.E. and Harrington, K.A. 1985. Natural resistance to *Salmonellae* in mice : Control by genes within the major histocompatibility complex. *J. Infect. Dis.* 152:1050-1056.

43. Hornick, R. B.; Greisman, S. E.; Woodward, T.E.; Dupont, H. L.; Drawings, A. T. and Snyder, W. J. 1970. Typhoid fever pathogenesis and immunological control. *N. Engl. J. Med.* 283: 686-691.

44. Hornick, R.B.; DuPont, H.L.; Dawkins, A.T.; Snyder, M.J. and Woodard, T.E. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. *Symposia Series in Immunobiological Standardization.* 15:143-150.

45. Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed .E. y S. Livinstong, L.T.D., London. pp.4-9.

46. Hynes, R. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554.

47. Isibasi, A.; Ortiz, V.; Vargas, M.; Paniagua, J.; González, C.; Moreno, J. and Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.

48. Isibasi, A.; Calva, E.; Ortiz, V.; Fernández, M.; Hernández, A. y Kumate, J. 1985. Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa. Simposio avances en el uso de vacunas. 1885-1985. p.109-115, Mexico, D.F.

49. Isibasi, A.; Pelayo, R.; Paniagua, J.; Ortiz, V.; García-Ortigoza, E. and Kumate, J. 1989. Porins from *Salmonella typhi* induce a protective status against a challenge with the bacteria in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA.

50. Isibasi, A.; Ortiz, V.; Moreno, J.; Paniagua, J.; Vargas, M.; González, C; and Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from Gram negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *S. typhi*

porins. In: Cell function and disease, Canedo, Todd and Jaz Eds. Plenum Press, New York.

51. Johnson, W. 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fraction isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 5: 947-952.

52. Joo, I. 1982. Present status and perspectives of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b diseases mediated by monoclonal antibody directed against a *Haemophilus* outer membrane protein. *Lancet* 329: 366-368.

53. Kamio, Y. and Nakaido, H. 1977. Outer membrane of *Salmonella typhimurium* identification of proteins exposed on cell surface. *Biochem. Biophys. Acta.* 464: 589-601.

54. Karkhanis, Y.D.; Zelther, J.Y.; Jackson, J.J. and Carlo, D.J. 1978. A new and improved microassay to determine 2-Keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85:595-601.

55. Killar, L.M. and Eisenstein, T.K. 1986. Delayed-type hypersensitivity and Immunity to *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*:52,504-508.

56. Klugman, K.P.; Koornhof, H.J.; Gilberston, I.T.; Robbins, J.B.; Schneerson, R.; Schultz, D.; Cadez, M.; Armand, J. and The Vaccination Advisory Committee. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet.* 330: 1165-1169.

57. Collins, T.; Korman, A.J.; Wake, C.T.; Boss, J.M.; Kappes, D.J.; Piers, W.; Auall, K.A.; Gimbrone Jr., M.A.; Strominger, J.L. and Pober, J.S. 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4917-4921.

58. Kumar, R.; Malaviya, A. N.; Murthy, R.G.S.; Venkataraman, M. and Mohapatra, L.N. 1974 Immunological study on typhoid fever: Immunoglobulins, C3, Antibodies and Leukocyte Migration Inhibition in Patients with Typhoid Fever and TAB-Vaccinated Individuals. *Infect. Immun.* 10: 1219-1225.

59. Kumate, J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: Kumate, J. y Gutiérrez G. Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.

60. Kumate, J. 1979. Inmunidad, Inmunización y Vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp.227-247.

61. Kussi, R.; Nurminen, M.; Saxén, H.; Valtonen, M. and Makela, P.H. 1979. Immunization with outer major membrane proteins in

experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25: 857-862.

62. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H. and Maquela, P.H. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.

63. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

64. Lanzavecchia, A.; Roosnek, E.; Gregory, T.; Berman, P. and Abrignani, S. 1988. T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature.* 334:530-532.

65. Lanzavecchia, A. 1985. Antigen-specific interaction between B and T cells. *Nature.* 314: 537-539.

66. Levine, M.M.; Ferreccio, C.; Black, R.E.; Tacket, C.O.; Germanier, R. and the Chilean Typhoid Comité, 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 11: 8562-8567.

67. 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.

68. 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.

69. Margalit, H.; Spouge, J.; Cornette, J.L.; Cease, K.B.; Delsi, C. and Berzofsky, J.A. 1987. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* 138: 2213-2229.

70. Marrack, P.; Enders, R.; Schimonkevitz, R.; Klotnik, A.; Dialynas, D.; Fitch, F. and Kappler, J. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cell. II Role of the L3T4 product. *J. Exp. Med.* 158: 1077-1091.

71. Marshak-Rothstein, A.; Fink, P.; Gridley, T.; Raulet, D.H.; Bevan, M.J. and Geffer, M.L. 1979. Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of Thy-1 locus. *J. Immunol.* 122:2491-2497.

72. Mates, A. and Yosipovici, H. 1976. Localization of the protective antigens in *Salmonella typhimurium*. *Microbiol.* 16: 81-90.

73. Matsui, K. and Arai, T. Specificity of *Salmonella* Porin as an Eliciting Antigen for Cell-Mediated Immunity (CMI) Reaction in Murine Salmonellosis. 1989. *Microbiol. Immunol.* 33: 1063-1067.

74. Mejia, M.V. 1990. Susceptibilidad de cepas singénicas murinas a porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vid. Tesis de

Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. México.

75. Misfeldt, M.L. and Johnson, W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 24: 808-816.

76. Misfeldt, M.L. and Johnson, W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 17: 98-104.

77. Misfeldt, M.L. and Johnson, W. 1976. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 14: 652-659.

78. Miura, T. and Mizushima, S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of *Escherichia coli* K-12. Biochem. Biophys. Acta. 150: 159-161.

79. Miyajima, A.; Scholchoiro, M.; Scheurs, J.; De Vries, J.; Arai, N.; Yokota, T. and Arai K. 1988. Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell-derived lymphokines. FASEB J. 2: 2462-2473.

80. Molinari, J. 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.

81. Molinari, J. and Cabrera, K. 1974. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 199-204.

82. Moller, G. 1980. Do suppressor T cells exist? Scand. J. Immunol. 27: 247-248.

83. Mosmann, T.R. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65: 53-63.

84. Mosmann, T.R. and Coffman, R. L. 1984. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 7: 145-173.

85. Murphy, J.R.; Wasserman, S.S.; Baqar, S.; Schlesinger, L.; Ferreccio, C.; Lindberg, A.A. and Levine, M.M. 1989. Immunity to *Salmonella typhi*: considerations relevant to measurement of cellular immunity in typhoid-endemic regions. Clin. Exp. Immunol. 75: 228-233.

86. Makela, P.H.; Saxén, H.; Valtonen M. and Valtonen V. 1988. *Salmonella*, Complement and mouse macrophages. Immunol. Lett. 19: 217-222.

87. Nabholz, H. and MacDonald, H.R. 1983. Cytolytic T Lympho-

cytes. Annu. Rev. Immunol. 1: 273-306.

88. Nath, T.R.; Malaviya, A.N.; Kumar, R.; Balakrishnan, K.; and Singh, B.P. 1977. A study of the efficacy of typhoid vaccine in inducing humoral and cell-mediated immune responses in human volunteers. Clin. Exp. Immunol. 30: 38-43.

89. Nauciel, C.; Ronco, E.; Guenet, J.L. and Pla, M. 1988. Role of H-2 and non-H-2 genes in control of bacterial clearance from the spleen in *Salmonella typhimurium*-infected mice. Infect. Immun. 56: 2407-2411.

90. NIKaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. Meth. Enzymol. 97:85-100.

91. NIKaido, H. and Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49:1-32.

92. O'Brien, A.D.; Rosenstreich, D.L.; Scher, I.; Campbell, G.H.; MacDermott, R.P. and Formal, S.B. 1980. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: Role of the LPS gene. J. Immunol. 124: 20-24.

93. O'Brien, A.D. 1986. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. Curr. Top. in Microbiol. and Immunol. 124: 37-48.

94. O'Brien, A.D. and Metcalf, E.F. 1982. Control of early *Salmonella typhimurium* growth in innately *Salmonella*-resistant mice does not require functional T lymphocytes. J. Immunol. 129: 1349-1351.

95. O'Brien, A.D.; Taylor, B.A. and Rosenstreich, D.L. 1984. Genetic control of natural resistance to *Salmonella typhimurium* in mice during the late phase of infection. J. Immunol. 133: 3313-3318.

96. O'Brien, A.D.; Scher, I. and Metcalf, E.S. 1981. Genetically conferred defect in anti-*Salmonella* antibody formation renders CBA/N mice innately susceptible to *Salmonella typhimurium* infection. J. Immunol. 126:1368-1372.

97. O'Brien, A.D. and Rosenstreich, D.L. 1983. Genetic control of the susceptibility of C3HeB/FeJ mice to *Salmonella typhimurium* is regulated by a locus distinct from known *Salmonella* response genes. J. Immunol. 131. 2613-2615.

98. O'Garra, A. 1989. Peptide regulatory factors. Interleukins and the immune system 2. Lancet 333:1003-1005.

99. Ortiz, V.; Isibasi, A.; Garcia-Ortigoza, E. and Kumate, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27: 1640-1645.

- 100.Ortlado, J.R. and Hebermen, R.B. 1984. Heterogeneity of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 359-394.
- 101.Osborn, M.J., and Wu,H.C.1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:369-422.
- 102.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: 3962-3927.
- 103.Paniagua, J.; Isibasi, A.; Pelayo, R.; Ortiz, V.; Muy, M.; González, C.; García, J.A.; Islas, S. y Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vid. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20: (en prensa).
- 104.Patlan, O.,A. 1990. Obtencion, separación, purificación y determinación de la capacidad inmunogénica de los péptidos de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vid, obtenidos por digestión con bromuro de cianógeno. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM. México.
- 105.Paul, C.; Shalada, K.; Warren, R. and Smith, R.1985. Adoptive transfer of murine host protection to salmonellosis with T-cell growth factor-dependent, *Salmonella*-specific T-cell lines. *Infect. Immun.* 48: 40-43.
- 106.Pelayo, R.; Isibasi, A.; Paniagua, J.; Ortiz, V.; Muy, M.; González, C.; Islas, S. y Kumate, J. 1989. Elaboración de un inmoadsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vid. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20: (en prensa).
- 107.Perez, M. A. y Cabrera, R. 1974. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoidea. *Rev. Sal.Púb. de Méx.* 15: 185-194.
- 108.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.
- 109.Plant,J. and Glynn,A.A.1974. Natural resistance to *Salmonella* infection, delayed hypersensitivity and *Irgenes* in different strain of mice. *Nature* 248: 345-347.
- 110.Polish Typhoid Committee 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. *Bull WHO.* 32: 15-27.
- 111.Rajagopalan, P.; Kumar, K.and Malaviya, A.N. 1982. A study of humoral and cell-mediated immune response following typhoid vaccination in human volunteers. *Clin. Exp. Immunol.* 47: 275-282.
- 112.Rajagopalan, P.; Kumar, K.and Malaviya, A.N. 1982. Immunological studies in typhoid fever. II. Cell-mediated immune

responses and lymphocyte subpopulations in patients with typhoid fever. Clin. Exp. Immunol. 47: 269-274.

113. Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J. Infect. Dis 117: 101-107.

114. Revel, M. and Chebath, J. 1986. Interferon-activated genes. TIBS 11:166-170.

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

116. Rosenstreich, D.L. and Glode, M. 1975. Difference in B cell mitogen responsiveness between closely related strains of mice. J. Immunol. 115: 777-780.

117. Sandford, G.R. 1979. Infectious diseases. Ed. Burgess Pub. Co. U.S.A. pp. 55-130.

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

119. 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.

120. Schnaitman, C.A. 1974. Outer membrane proteins of *E. coli* O 111 outer membrane consist of four distinct poly peptide species. J. Bacteriol. 118: 442-453.

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

122. Schnaitman, C.A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. J. Bacteriol. 106: 545-552.

123. Schultz, R.M., and Kleinsmith, W.J. 1983. Functional identity between murine recombinant gamma interferon and macrophage activating factor. Nature 305 : 239-240.

124. Smith, C.A. and Rennik, D.M. 1986. Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 possessing a T cell growth factor activity and mast cell growth factor activity that synergizes with IL-3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1857-1861.

125. Smith, K. A. 1984. Interleukin 2. Annu. Rev. Immunol. 2: 283-318.

126. Smith, K. A. 1988. Interleukin-2: Inception, impact, and

implications. *Science* 240:1169-1176.

127. Smith, R. A. and Biegly, M. J. 1972. Ribonucleic acid protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogen. *Infect. Immun.* 6: 373-383.

128. Svenson, S. B.; Hurminen, M. and Linberg, C. A. 1981. Artificial *Salmonella* vaccines: O-Antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 34: 328-332.

129. Swanson, R. N. and O'Brien. 1983. Genetic control of te innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: Ity gene expressed *in vivo* by 24 hours after infection. *J. Immunol.* 131: 3014-3020.

130. Szu, S. C.; Stone, A. L.; Robbins, J. D.; Schneerson, R. and Robbins, J. B. 1987. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. *J. Exp. Med.* 166: 1510-1521.

131. Tagliabue, A.; Nencioni, L.; Villa, L. and Boraschi, D. 1984. Genetic control of *in vivo* natural cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by intestinal and splenic lymphoid cell in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 56: 531-536.

132. Teerlink, T.; Versantvoort, H. and Beuvery, E. C. 1987. Antigenic and immunogenic properties of cyanogen bromide peptides from gonococcal outer membrane protein IB. *J. Exp. Med.* 166: 63-76.

133. Titani, K.; Hermodson, M. A.; Ericson, L. H.; Walsh, K. A. and Neurath, H. 1972. Amino acid sequence of thermolysin. Isolation and characterization of the fragments obtained by cleavage with Cyanogen Bromide. *Biochemistry.* 11: 2427-2435.

134. Towbin, H. T.; Staehlin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.

135. Trizio, D. and Cudkowicz, G. 1974 Separation of T and B lymphocytes by nylon wool columns; evaluation of efficacy by functional assays *in vivo*. *J. Immunol.* 114:1093-1097.

136. 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.

137. Typhoid Panel, U.K. Departement of Technical Cooperation. 1964. A controlled field trail of acetone-dried and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Guiana. *Bull. WHO* 30:631-634.

138. Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. R. 1989. Protective immunity induced by porin against *Salmonella* infection in mice. *Indian. J. Med. Res.* 89:121-127.

139.Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. 1987. An Outer Membrane Protein (Porin) as an Eliciting Antigen for Delayed-Type Hypersensitivity in murine Salmonellosis. *Infect. Immun.* 55: 822-824.

140.Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. 1987. Protective Immunity Induced by Outer Membrane Proteins of *Salmonella typhimurium* in Mice. *Infect. Immun.* 55: 816-821.

141.Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R. 1983. Characteristics of live vaccines in relation to delayed-type hypersensitivity and protective immunity in murine experimental Salmonellosis. *Immunol. Letters* 6: 299-302.

142.Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2:395-428.

143.Unanue, E.R. and Cerottini, J. C. 1989. Antigen presentation. *FASEB* 3: 2496-2502.

144.Venneman, M.R.; Brigley, M.J. and Berry, L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1: 574-582.

145.Verghese, M.; Prince, M. and Snyderman, R. 1980. Genetic control of peripheral leukocyte response to endotoxin in mice. *J. Immunol.* 124:2468-2484.

146.Wahdan, L.I.; Serie, C.; Cerisier, Y.; Sallam, S. and Germanier, R. 1982. Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: Three years results. *J. Infect. Dis.* 145:292-293.

147.Wang, L.I. and Frash, C.E. 1984. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 46:408-414.

148.Warren, J.W. and Hornik, R. B., 1979. Immunization against typhoid fever. *Annu. Rev. Med.* 30:457-472.

149.Watson, J.; Kelly K.; Largen M., and Taylor B. A. 1978. The genetic mapping of a defective LPS response genetic in C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* 120:422-424.

150.Westphal, O. and Jann, A.K. 1965. Bacterial lipopolysaccharide. Extractions with phenol-water and further of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 5:83-91.

151.Youmans, A.S. and Youmans, G.P. 1965. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 99:42-50.

152.Yugoslav Typhoid Commission, 1964. A controlled field trial of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. *Bull. WHO* 30:623-630.

153. Zabriskie, J.B. and Gibofsky, A. 1986. Genetic control of the susceptibility to infection with pathogenic bacteria. *Curr. Top. in Microbiol. Immunol.* 124: 1-20.

154. Ziegler, H. and Unanue, E.R. 1982. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by amonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 175-178.