

1
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

Elaboración de un conjugado Polisacárido-
Porinas a partir de Salmonella typhi y
evaluación de su actividad protectora
en un modelo murino.

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a
REBECA ALVAREZ CORDOBA



México, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Higiene, Secretaría de Salud, bajo la tutoría del Dr. Armando Isibasi Araujo.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A MIS PADRES LUIS Y GUILLERMINA

A MIS HERMANOS JUAN, JOSEFINA, MARY, JOSE, ASUNCION, TRINI Y GABRIEL

A LA HNA. MARIA DEL CARMEN

**POR SU APOYO Y COMPRESION OFRECIDOS DURANTE EL DESARROLLO DEL
PRESENTE TRABAJO**

Y

A LA MEMORIA DE MI TIA VICTORIA ALVAREZ MENDOZA

**ESTE TRABAJO TAMBIEN ESTA DEDICADO A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE
CONFIANDO EN MI SABIAN QUE NO QUEDARIAN DEFRAUDADAS Y DE UNA
MANERA ESPECIAL AL DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO POR HABERME
PROPORCIONADO LOS MEDIOS NECESARIOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA
PARTE EXPERIMENTAL**

INDICE

1.-	Introducción	1
1.1	Generalidades de la respuesta inmunológica	1
1.2	Fiebre Tifoidea	3
1.2.1	Historia	3
1.2.2	Generalidades	4
1.2.3	Diagnóstico	5
1.2.4	Respuesta Inmune	6
1.3	Vacunas contra <i>Salmonella typhi</i>	7
1.4	Componentes antigénicos	10
1.4.1	Polisacárido Capsular VI	10
1.4.2	Lipopolisacárido	11
1.4.3	Proteína Flagelar	12
1.4.4	Proteínas de Membrana Externa	13
2.-	Fundamentación de la Elección del Tema	20
3.-	Planteamiento del Problema	21
4.-	Modelo Experimental	22
5.-	Objetivos	23
6.-	Hipótesis	24
7.-	Materiales y Métodos	25
7.1	Cepas bacterianas	25
7.2	Cultivo y cosecha de cepas bacterianas	25
7.3	Obtención y purificación de porinas	26
7.4	Cuantificación de proteínas	26
7.5	Electroforesis de porinas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
7.6	Obtención del lipopolisacárido	27
7.7	Electroforesis del LPS en geles de poliacrilamida	28
7.8	Obtención del polisacárido ácido	29
7.9	Cuantificación de azúcares	31

7.10	Preparación de muestras para cromatografía de gases	31
7.11	Polisacárido capsular Vi	33
7.12	Cuantificación del CPS Vi	33
7.13	Unión directa de Vi con Porinas empleando EDAC (Método directo)	33
7.14	Unión de Vi con Porinas empleando SPDP (Método indirecto)	34
	7.14.1 Tiolación de Vi con cistamina	34
	7.14.2 Derivación de porinas con SPDP	35
	7.14.3 Síntesis del conjugado	35
7.15	Unión del polisacárido con porinas empleando EDAC	37
7.16	Animales de experimentación	38
7.17	Esquemas de Inmunización	38
8.-	Resultados	40
8.1	Caracterización de las porinas, LPS y CPS Vi de <i>Salmonella typhi</i> .	40
8.2	Caracterización del polisacárido de <i>Salmonella typhi</i> 0901.	44
8.3	Caracterización del CVP-MD y CVP-ML	47
8.4	Caracterización del CPP.	56
9.-	Análisis de Resultados	60
10.-	Conclusiones	62
11.-	Propuestas y/o recomendaciones	63
12.-	Bibliografía	64

NK	Natural Killer
CPAs	Células Presentadoras de Antígeno
TI-1	Timo independiente tipo 1
TI-2	Timo independiente tipo 2
CPS	Polisacárido Capsular
LPS	Lípopolisacárido
DL ₅₀	Dosis Letal Media
BHI	Infusión Cerebro Corazón
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
CVP-MD	Conjugado Vi-Porinas Método Directo
CVP-MI	Conjugado Vi-Porinas Método Indirecto
CPP	Conjugado Polisacárido-Porinas.
SDS	Dodecilsulfato de Sodio.
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilamipropil) carbodiimida
SPDP	N-succinimidil-3-(2-pirridilditio) propionato
HEPES	N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-ácido etanolsulfónico.
DTT	Ditiotreitól
ADH	Dihidrazida del Acido Adípico
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliácridamida con SDS

INDICE DE FIGURAS

- Figura No. 1 Estructura antigénica de las bacterias gram-negativas.
- Figura No. 2 Estructura de la unidad de repetición del polisacárido capsular VI de *Salmonella typhi*.
- Figura No. 3 Estructura del lipopolisacárido (endotoxina) de *Salmonella typhi*.
- Figura No. 4 Organización de las proteínas de membrana externa.
- Figura No. 5 Conformación tridimensional de las porinas.
- Figura No. 6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d.
- Figura No. 7 Electroforesis en gel de poliacrilamida del lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 0901.

INDICE DE GRAFICAS

- Gráfica No. 1 Filtración en gel de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d a través de una columna de Sephacryl S-200.
- Gráfica No. 2 Cromatografía de Gases de azúcares estándares
- Gráfica No. 3 Cromatografía de Gases del polisacárido de *Salmonella typhi* 0901.
- Gráfica No. 4 Purificación del CVP-MD por Cromatografía de Exclusión Molecular.
- Gráfica No. 5 Análisis por HPLC del CVP-MD.
- Gráfica No. 6 Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida para la detección de CPS Vi y Porinas en el CVP-MD.
- Gráfica No. 7 Purificación del CVP-MI por Cromatografía de Exclusión Molecular.
- Gráfica No. 8 Análisis por HPLC del CVP-MI.
- Gráfica No. 9 Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida para la detección de CPS Vi y Porinas en el CVP-MI.
- Gráfica No.10 Inducción de anticuerpos anti-Vi y anti-porinas por los conjugados CVP-MD y CVP-MI.
- Gráfica No.11 Purificación del CPP por Cromatografía de Exclusión Molecular.
- Gráfica No.12 Análisis por HPLC del 1er y 2o picos obtenidos, después de la filtración a través de Sephacryl S-1000, del conjugado Polisacárido-Porinas.
- Gráfica No.13 Análisis por HPLC del CPP (sin pasar por la columna de sephacryl S-1000).

RESUMEN

Con el fin de generar una vacuna cuya protección sea duradera y eficaz en niños y adultos y de conferir propiedades T-dependientes a el CPS Vi, un buen inmunógeno protector (62,63), se convino unir covalentemente a Vi con las porinas por dos métodos diferentes y con el mismo fin, uno de los métodos fue también utilizado para conjugar el PS(LPS) con la misma fracción proteica.

Por purificación a través de una columna de exclusión molecular y HPLC se demostró que la conjugación entre Vi y porinas fue factible obteniéndose el CVP-MD y el CVP-MI. El CPP fue también obtenido, pero el análisis por HPLC mostró que la unión era poco estable cuando el conjugado se purificaba por una columna de exclusión molecular.

Por ensayo inmunoenzimático en fase sólida se mostró que los conjugados CVP-MD y CVP-MI tenían propiedades antigénicas y fue así entonces que se decidió evaluar su inmunogenicidad.

Los resultados mostraron que la inducción de anticuerpos por cada conjugado fue dependiente del modo de conjugación pues el CVP-MD indujo una mejor respuesta contra Vi que contra porinas, en cambio, el CVP-MI no indujo respuesta contra Vi y la respuesta contra porinas fue buena pero 2 veces menor que las porinas solas ó que la que induce una mezcla de Vi-Porinas.

1.1 GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA.

Los individuos sanos se protegen asimismo contra microorganismos por: barreras físicas, células fagocíticas en tejidos, células natural killer (NK) y varias moléculas transportadas en la sangre. Algunos de estos mecanismos de defensa están presentes previo a la exposición de microorganismos infecciosos u otras macromoléculas extrañas y no se incrementan ante tales exposiciones además de no discriminar entre. Lo anterior es lo que constituye la inmunidad natural.

Otros mecanismos de defensa son inducidos o estimulados por exposición a sustancias extrañas (inmunización), son altamente específicos para distintas macromoléculas y se incrementan en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a una particular. Estos mecanismos constituyen la inmunidad adquirida o específica.

La fase efectora de la inmunidad específica requiere la participación de varios mecanismos de defensa incluyendo el sistema del complemento, fagocitosis, células inflamatorias y linfocitos que son además funcionales en la inmunidad natural.

En función de los componentes del sistema inmune esta es clasificada en dos ramas: 1) inmunidad humoral e 2) inmunidad celular.

La inmunidad celular es mediada por los linfocitos T y la inmunidad humoral por los linfocitos B. Los linfocitos T reconocen y responden solamente a antígenos proteicos extraños asociados a células presentadoras de antígenos (CPAs) y no responden a proteínas solubles. A diferencia las células B y sus anticuerpos secretados unen

antígenos solubles (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y pequeñas sustancias químicas) en la circulación.

Los antígenos proteicos dependientes de células T (timo-dependientes) son procesados por células B y presentados en asociación con moléculas de clase II del MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) a células T cooperadoras. La interacción entre linfocitos B y T cooperadores produce señales que activan a células B en reposo y además induce la secreción de varias citocinas por células T.

Los antígenos no dependientes de células T (timo-independientes) inducen la respuesta de anticuerpos sin la participación de células T antígeno específicas. Los antígenos timo independientes (TI) han sido subdivididos en dos grupos de acuerdo a su independencia relativa de células T y sus propiedades fisicoquímicas.

Los antígenos TI-1 son completamente independientes de células T y la mayoría son activadores policlonales de células B en altas concentraciones, el mejor ejemplo es el lipopolisacárido. En contraste los antígenos TI-2 requieren pequeño número de células T (los cuales no son antígeno específicos y presumiblemente proporcionan citocinas) para inducir la producción óptima de anticuerpos por células B. La mayoría de los antígenos TI-2 son polisacáridos compuesto de múltiples epítomos antigénicos idénticos (dextranas).

Los antígenos TI producen solamente anticuerpos de clase IgM y no inducen memoria inmunológica en ratones (2-4, 5, 6, 7).

1.2 FIEBRE TIFOIDEA

1.2.1 HISTORIA.

La primera reseña de la fiebre tifoidea se atribuye a Tomas Willis, quien en 1659 describió el cuadro clínico. 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) (8).

Gerhard, en 1837 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 los nódulos linfáticos, eran específicas de la fiebre tifoidea (9).

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 (10).

Eberth, en 1880 logró aislar a el 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 (10) y junto con Kolle demostró que el suero de pacientes convalecientes protegía a los cobayos contra dosis letales del bacilo tifoídico.

Widal, en 1895, describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (9).

1.2.2 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%. (11)

Ya que este microorganismo afecta sólo 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 África y Asia.

En la región de las Américas alrededor de 1990, se presentaron 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 (12).

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 de 500, 000 días laborales perdidos.

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae* y especie *typhi*, gram-negativo, móvil, mide de 2 a 3 μm , es 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 *Salmonella typhi* en forma abreviada (13).

Otro componente, de antigenicidad poco estudiada, forman parte de la membrana externa: la lipoproteína de Braun.

1.2.3 DIAGNOSTICO.

I. AISLAMIENTO DE *Salmonella typhi*.

- Cultivo de sangre.
- Cultivo de otras muestras clínicas como:
 - a) Aspirados de médula ósea.
 - b) Heces fecales.
 - c) Bilis duodenal.

II. DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS DE *Salmonella typhi*.

- Detección de aglutininas H y O. (Prueba de Widal)

- Hemaglutinación pasiva de antígenos H, O y Vi.

- Ensayo inmunoenzimático en fase sólida, empleando LPS o flagelina de *Salmonella typhi*.

- Detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos proteicos de *Salmonella typhi*.

III. DETECCIÓN DE ANTIGENOS DE *Salmonella typhi*.

IV. DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE DNA ESPECÍFICAS DE *Salmonella typhi*. (14)

1.2.4 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 ganglios 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 (8).

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 (10).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas, los cuales no necesariamente 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 (15).

Se ha descrito que los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de *Salmonella 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 (16, 17).

1.3 VACUNAS.

La inmunización experimental con suspensiones de *Salmonella typhi* viva fue realizada con éxito en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y un año después por Bauneer y Peiper en ratones. Después, Klikovich empleó bacilos muertos con el mismo propósito, originando que Wright en Inglaterra y simultáneamente Pfeiffer y Kolle en Alemania utilizaran, por vez primera (1897), vacunas inactivadas para la inmunización en 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 (18). 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 (16, 19).

En 1955, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética. 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 duración. La vacuna inactivada con calor y fenol, designada con la letra **L**, mostró menor eficacia que la **K** y la inactivada con alcohol fue la menos efectiva (20, 21, 22, 23, 24, 25).

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 (26). Lo cual fue confirmado por Hornick y cols. en voluntarios humanos en 1968 (27).

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

En 1970 Wong, logró purificar el antígeno **Vi**, sin desnaturalizarlo y demostró que era inmunogénico y seguro.(18)

En 1975 Germanier y Furer desarrollaron la cepa de *Salmonella typhi* Ty21a (19),

la cual protegió en el 95% en ensayos clínicos. Esta cepa tiene una mutación en el gen *galE* que le causa una deficiencia en la enzima UDP-4-galactosa epimerasa. Sin embargo en estudios posteriores realizados en una población endémica de fiebre tifoidea en Chile, la vacuna mostró una protección apenas de 51 al 67%. Además se demostró por técnicas de mutación puntual que el daño no se encuentra únicamente en el gen *galE*.

Stocker en 1981, desarrolló las cepas de *Salmonella typhi* 541Ty y 543Ty, las cuales contienen mutaciones en *aroA* y *purA*. La mutación en el gen *aroA* genera dependencia por aminoácidos aromáticos, en tanto que al inactivar *purA* se genera un requerimiento por adenina. Sin embargo al evaluar su actividad protectora en ensayos clínicos, despertaron pobre respuesta inmune (28).

En 1984, Robbins y Robbins lograron preparar dos lotes de antígeno Vi. Ambos resultaron ser buenos inmunógenos, sin embargo, uno de ellos generó reacciones adversas, debido a su contenido de lipopolisacárido contaminante (29). Actualmente está en vías de salir al comercio una vacuna hecha de este antígeno por los laboratorios Mérieux, en Francia.

Goebel y Avery (30, 31), mostraron que la inmunogenicidad del polisacárido de *pneumococcus* tipo 3 podía ser incrementada por su unión química a una proteína acarreadora. Este principio fue aplicado a otros polisacáridos capsulares de especies patógenas para incrementar su inmunogenicidad (32-40).

Así entonces Szu y colaboradores conjugaron el polisacárido capsular Vi con toxoide tetánico, toxoide diftérico y con la toxina del cólera para conferirle propiedades

T-dependientes a el polisacárido. La vacuna obtenida produjo títulos más elevados de anticuerpos en suero que el Vi sólo purificado en pruebas realizadas en dos especies de animales (41).

1.4 COMPONENTES ANTIGENICOS

1.4.1 POLISACARIDO CAPSULAR VI.

Este antígeno esta localizado en la capa más externa de *Salmonella typhi*. Es un homopolímero lineal del ácido N-acetilgalactosaminurónico, variablemente O-acetilado en la posición C-3. Está compuesto de al menos dos determinantes antigénicos, uno tiene O-acetilo como grupo inmunodominante y el otro tiene a los grupos N-acetil y carboxilo. Ambos grupos carboxilo y N-acetil son necesarios para la reacción antígeno-anticuerpo (42). El peso molecular de las preparaciones de este antígeno es heterogéneo, variando de 65.5×10^3 kDa. Es un antígeno timo-independiente tipo 2 que estimula sólo células B específicas. No funciona como activador policlonal (43).

A mediados de 1930, Felix y cols. (44-47) descubrieron el antígeno Vi, ellos mostraron que frecuentemente está presente en cepas aisladas de la sangre de pacientes con fiebre tifoidea y además demostraron su virulencia en ratones. Felix demostró que la presencia de Vi protege al antígeno O de *Salmonella typhi* de la aglutinación por anticuerpos O, propuso que los anticuerpos contra Vi juegan un papel importante en la protección contra fiebre tifoidea y sugirió que la vacuna L fuera

reemplazada por la vacuna de células enteras inactivadas con alcohol. Las bases de su propuesta fue de que el Vi se preserva mejor y proporciona títulos elevados de anticuerpos en animales y humanos (48). Alrededor de 1950 en un ensayo de campo patrocinado por la OMS en Yugoslavia se comparó la eficacia de la vacuna L y vacuna inactivada con alcohol. En contraste con la hipótesis de Felix la vacuna L confirió una protección significativamente superior a la de vacuna inactivada con alcohol.

Por otro lado Landy (49) sugirió el uso de la acetona para inactivar a *Salmonella typhi* (usada en la vacuna K) protege mejor a Vi que el calor-tenol en la vacuna L. En ensayos de campo asesorados por la OMS en Guyana y Yugoslavia alrededor de 1960 se realizó una comparación de ambas vacunas demostrándose una mejor eficacia de la vacuna K, con lo que se infiere que la acetona preserva mejor a Vi.

1.4.2 LIPOPOLISACARIDO.

El LPS es el principal constituyente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, que tiene actividad de endotoxina y actúa como antígeno protector. El lipopolisacárido (LPS) es una molécula compleja compuesta de un lípido A, un polisacárido core y un polisacárido variable conocido como antígeno O. El lípido A el cual esta inmerso en la membrana, consiste de dos residuos de glucosamina fosforilados a los cuales están ligados seis cadenas largas de ácidos grasos. La estructura del lípido A es prácticamente la misma en todas las enterobacterias y es la porción principal a la cual se atribuye la actividad endotóxica.

Salmonella tiene un core polisacárido común que contiene los azúcares inusuales KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctónico) y heptosa; otros géneros tienen diferentes cores. Su empleo como vacuna en humanos está prohibido debido a los efectos de endotoxina que le proporciona el lípido A, pero una solución a este problema ha sido el de remover el lípido y trabajar con la porción polisacárida.

Muchos de los efectos causados por el lípido A son indirectos, el LPS induce la secreción de agentes activos por otras células (interleucina 1 y factor de necrosis tumoral). El LPS activa el complemento por la vía alterna. Este es un antígeno timo-independiente tipo 1 que estimula policlionalmente a las células B en altas concentraciones (50).

1.4.3 PROTEINA FLAGELAR.

Esta es conocida como antígeno H. Dentro de una sola especie de *Salmonella*, el antígeno flagelar se presenta en una o ambas formas llamadas **fase 1** y **fase 2**. Los organismos tienden a mutar de una fase a otra. El flagelo es una estructura compleja compuesta de un cuerpo basal, un gancho y un filamento. El filamento consiste de componentes proteicos polimerizados llamados flagelina la cual tiene un peso molecular en el rango de 51-57 kDa (51). La flagelina es la responsable de la actividad antigénica del flagelo (52).

1.4.4 PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Al menos la mitad de la masa de la membrana externa son proteínas. Las proteínas constituyentes de la membrana externa son proteínas porínicas y no porínicas.

Las porinas tienen un peso molecular de 31 a 42 kDa, su composición de aminoácidos proporciona una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45%, tienen un punto isoeléctrico de 4.5-4.6 (53). Reciben el nombre de porinas porque se arreglan en forma de poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa Fig. No.4. Juegan un rol en la patogénesis y son antígenos importantes contra las cuales la respuesta inmune es dirigida. Isibasi y colaboradores demostraron que las porinas son capaces de inducir inmunidad activa en ratones contra el reto de la bacteria viva hasta en 500 DL₅₀ (54) y que el suero hiperinmune de conejo contra proteínas de membrana externa induce protección pasiva y es capaz de reconocer al grupo de las porinas (55). Las proteínas porínicas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* hasta ahora conocidas son: OmpB, C, D y las proteínas F, NmpA, NmpB, NpmC y LamB.

Las proteínas no porínicas comprenden a la proteína OmpA, la proteína a y la lipoproteína. El peso molecular de la OmpA es alrededor de 33 kDa. Algunas evidencias sugieren que actúa como un receptor de bacteriocina y además juega un papel significativo en el mantenimiento de la morfología celular y en la integridad de la membrana externa, posiblemente por sus interacciones con las peptidoglicanas. Es sensible a las proteasas (56). La función de la proteína a constituye un misterio, algunas

evidencias sugieren que es probablemente una proteasa. La lipoproteína es un polipéptido que contribuye a la estabilización de la arquitectura del complejo membrana-peptidoglicana (57).

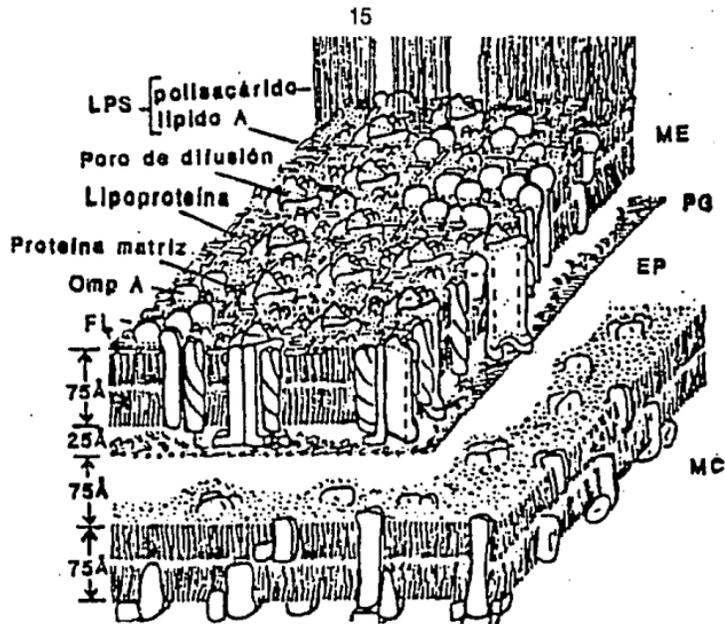


FIGURA No. 1

ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

ABREVIATURAS: FL, fosfolípidos; ME, membrana externa; Pg, peptidoglicana; EP, espacio periplásmico; MC, membrana citoplásmica; LPS, lipopolisacárido (58).

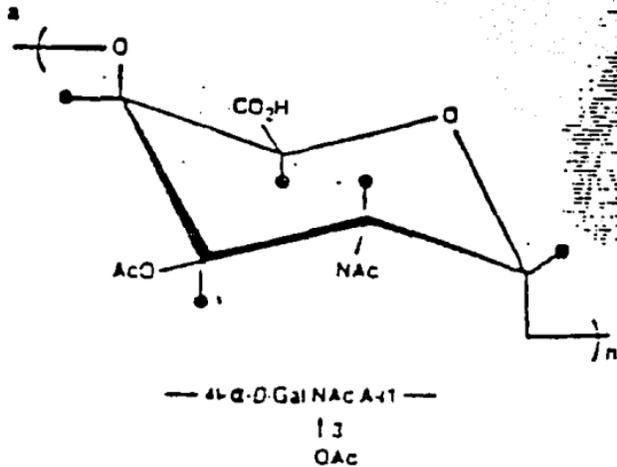


FIGURA No.2

ESTRUCTURA DE LA UNIDAD DE REPETICION DEL POLISACARIDO

CAPSULAR VI DE *Salmonella typhi*; AcO (GRUPO O-ACETILO),

NAc (GRUPO N-ACETILO) (41).

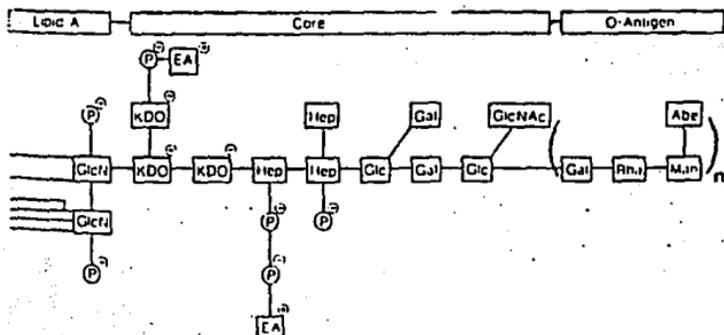


FIGURA No. 3

ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACARIDO DE *Salmonella typhi* (59).

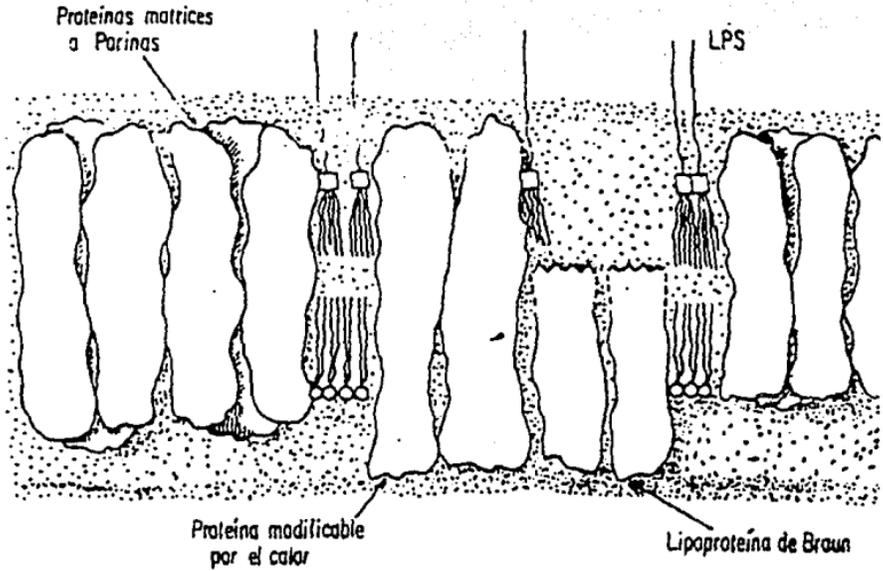


FIGURA No. 4

ORGANIZACION DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (60)

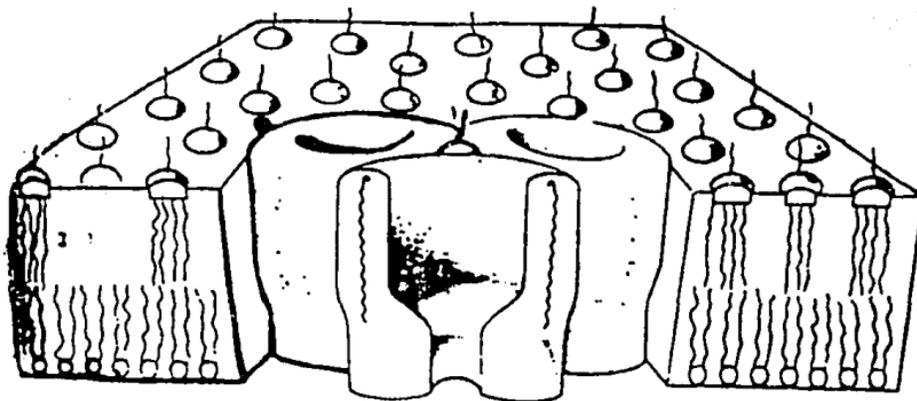


FIGURA No. 5

CONFORMACION TRIDIMENSIONAL DE LAS PORINAS

MODELO PROPUESTO POR JAP PARA LA PORINA pho E (1989). CRISTALOGRAFIA ELECTRONICA CON UNA RESOLUCION DE 18 A (61).

2.0 FUNDAMENTACION DEL TEMA.

En casi todo el mundo, la fiebre tifoidea representa la causa más común y severa del grupo de fiebres entéricas. Esta es una enfermedad infecto-contagiosa que se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con *Salmonella typhi*. La enfermedad continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos países industrializados y dado que *Salmonella typhi* afecta sólo al ser humano y no hay reservorios animales, el elemento más importante en la cadena de transmisión es el portador asintomático.

Se calcula que anualmente se producen 12 millones de casos, con una incidencia de 500 casos/100 000 habitantes en Africa y Asia. En la región de las Américas, alrededor de 1990, se presentaron aproximadamente 89 591 casos, que representan una incidencia de 20.8 casos/100 000 habitantes en Chile. En México se notificaron 11 078 casos en 1987, con una tasa de 13.65 casos/100 000 habitantes. El grupo de edad más afectado por la enfermedad es el de 15 a 44 años, donde se presenta aproximadamente el 58.62 por ciento de los casos, lo cual representa más de 500 000 días laborales perdidos.

La inmunoprofilaxis contra la fiebre tifoidea no ha sido llevada a cabo debido a que las dos vacunas disponibles tienen deficiencias que limitan su uso universal. El primer tipo, compuesta por bacterias completas de *Salmonella typhi* inactivadas con calor-fenol, induce solamente una inmunidad limitada y origina una alta incidencia de reacciones colaterales tanto locales como sistémicas. La segunda vacuna, una cepa oral y atenuada de *Salmonella typhi* denominada Ty-21a, requiere de 3 a 4 dosis para

inducir aproximadamente el 65% de protección, esto resulta caro y además su mecanismo de protección no ha sido identificado (62, 63).

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

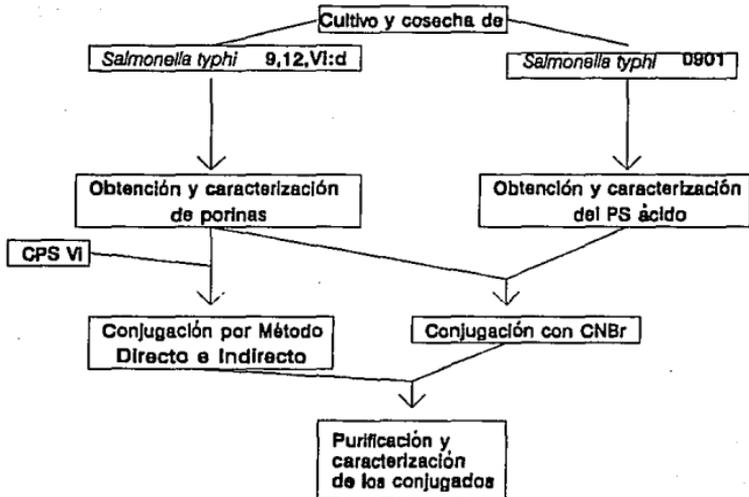
Goebel y Avery demostraron que la inmunogenicidad del polisacárido del *Pneumococcus* tipo 3 podía ser incrementada por su unión a proteínas acarreadoras (30,31). La unión covalente del polisacárido-proteínas genera anticuerpos de clase IgG contra la primera fracción al conferirle propiedades T-dependientes (64).

Con lo anterior y para mejorar la efectividad ya conocida del CPS Vi como antígeno protector se ha decidido conjugarlo con las porinas cuya inmunogenicidad ya ha sido demostrada (63). Con el mismo fin se propone la unión del LPS con la misma porción sólo que la parte lipídica será removida dado su carácter tóxico (65).

Los métodos empleados para la síntesis de conjugados hasta ahora conocidos son dos: (1) unión directa del polisacárido a proteínas y (2) unión del polisacárido a proteínas empleando una sustancia espaciadora (grupos heterobifuncionales). Ambos métodos se utilizarán para unir el CPS VI con las porinas y sólo el segundo método se empleará para conjugar el polisacárido de membrana con la misma fracción proteica.

Por métodos químicos e inmuoquímicos se valorarán los conjugados y se verá el tipo de respuesta que generan al tener dos especies inmunogénicas juntas.

4.0 MODELO EXPERIMENTAL



5.0 OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Elaborar un conjugado Polisacárido-Porinas a partir de *Salmonella typhi* y evaluar su capacidad protectora en un modelo experimental murino contra el reto de la cepa homóloga.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Elaborar un conjugado Polisacárido-Porinas a partir de *Salmonella typhi*.
- Purificar y caracterizar el conjugado Polisacárido-Porinas mediante métodos químicos e inmunoquímicos.
- Evaluar la capacidad para inducir protección del conjugado Polisacárido-Porinas en un modelo experimental murino empleando como cepa de reto a la bacteria homóloga.

6.0 HIPOTESIS.

Los conjugados Polisacárido-Porinas son capaces de inducir un estado de protección mayor, al reto con la cepa homóloga que el que le induce una preparación de porinas sola.

7.0 MATERIALES Y METODOS.

7.1 CEPAS BACTERIANAS.

Se emplearon las siguientes cepas: *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea; *Salmonella typhi* 0901 donada por el Instituto Nacional de Higiene. La caracterización bioquímica de ambas cepas se realizó en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la S.S.A.

7.2 CULTIVO Y COSECHA DE CEPAS BACTERIANAS.

Las bacterias empleadas para la obtención de porinas se cultivaron a 37°C durante 8 hrs (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 (Sorvall, Ins.). La pastilla bacteriana se resuspendió en Tris-HCl 10 mM, pH 7.7 conservándose a -20°C hasta su uso.

Las bacterias empleadas para la obtención de Lipopolisacárido y Polisacárido se cultivaron, en condiciones estacionarias en caldo BHI durante 18 hrs a 37°C, posteriormente se cosecharon por centrifugación, la pastilla obtenida se secó con acetona y se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

7.3 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PORINAS.

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (66). La pastilla que contenía las membranas celulares se solubilizó en Tris-HCl 10 mM, pH 7.7 adicionado con 2% de SDS, se incubó 30 min. a 37°C y se ultracentrifugó a 45000rpm/30 min/4°C.

El sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente y por ultracentrifugación se obtuvo la peptidoglucana, las proteínas unidas a ella se extrajeron incubando 2 hrs a 37°C con Tris 50 mM-HCl, pH 7.7 adicionado con 2% de SDS, EDTA 5mM, NaCl 0.4 M y 0.05% de 2-mercaptoetanol. Después de ultracentrifugaron a 45 000 rpm/45 min/20°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 las fracciones de 4 ml en un colector (LKB Instruments) y las correspondientes porinas se dializaron exhaustivamente contra Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, se les determinó la concentración de proteína y lipopolisacárido y se caracterizaron electroforéticamente. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

7.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de proteínas tanto en las porinas purificadas (Nikaido) como en otras preparaciones que lo requirieron, se realizó mediante el método de Lowry (67) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

7.5 ELECTROFORESIS DE PORINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de las 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 (68). 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 bisacrilamida, 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 bisacrilamida, 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 fue transparente.

7.6 OBTENCION DEL LIPOPOLISACARIDO.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Westphal (69). Una vez que se obtuvo la pastilla bacteriana de acuerdo al método descrito, se resuspendió en agua destilada calentada a 90°C y se añadió un volumen igual de fenol al 90%. La mezcla

anterior se calentó durante 10 min a 60°C con agitaciones fuertes y pasado el tiempo se entrió y centrifugó a 5000 rpm/30 min. De las fases formadas, se tomó la acuosa, se centrifugó hasta que quedó completamente limpia y de la pastilla remanente se realizaron dos extracciones más. Se juntaron las fases acuosas y se dializaron exhaustivamente dos días contra agua de la llave y dos días contra agua destilada, después se centrifugó a 5000 rpm/40 min. Se tomó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 40 000 rpm/1 h, la pastilla obtenida se disolvió en el mínimo de agua destilada, se le determinó la concentración de azúcares por el método de la antrona (70) y se liofilizó como último paso manteniéndose a temperatura ambiente hasta su uso.

7.7 ELECTROFORESIS DEL LPS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis de LPS se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments) en condiciones no reductoras, sin SDS y sistema de amortiguadores discontinuos (68, 70).

El gel separador contenía 14% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M, pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El amortiguador de muestra contenía Tris 0.125 M, 2-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

La electroforesis se llevó a cabo empleando 30 mA por placa en amortiguador de Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Al concluir la electroforesis los geles

se fijaron durante 18 hrs en una solución de etanol-ácido acético-agua (40:10:50) y posteriormente se trataron durante 15 min con una solución de ácido peryódico al 0.7% en agua. El gel se lavó 4 veces en intervalos de 15 min con agua desionizada, seguido de un tratamiento por 15 min con la solución de tinción (5 ml de nitrato de plata al 20%, agregados gota a gota a una solución de hidróxido de amonio al 0.69% e hidróxido de sodio 0.1 N al 19.4%). Posteriormente el gel se sometió a 3 lavados de 20 min con agua desionizada; después de lo cual se sumergieron en solución de revelado (25 mg de ácido cítrico y 0.1 ml de formaldehído al 37% en 500 ml) hasta que las bandas fueron visibles y el fondo del gel permaneció transparente.

7.8 OBTENCION DEL POLISACARIDO ACIDO.

Para una primera hidrólisis ácida se suspendieron 60 g de bacteria seca con acetona en 900 ml de agua destilada en un matraz balón. La suspensión fue calentada a 90°C con agitación constante para su homogeneización y enseguida se le añadió ácido acético 1 N hasta obtener una concentración final de 0.1 N. Se calentó a 95°C durante 90 min. agitando constantemente y terminado el tiempo se enfrió llevándola al chorro de agua. A continuación se centrifugó a 5000 rpm/1 h y el sobrenadante obtenido se guardó. Por otro lado la pastilla fue sometida a una segunda hidrólisis ácida suspendiéndose ahora en 720 ml de agua. Se calentó nuevamente a 90 °C para su homogeneización y se siguió el mismo tratamiento que para la primera hidrólisis ácida.

La pastilla así obtenida del segundo tratamiento fue sometida a una tercera

hidrólisis siguiendo ahora el procedimiento empleado para la segunda hidrólisis. Hecho lo anterior, se juntaron los sobrenadantes de todo el proceso y se redujo su volumen por evaporación a 55°C/vacío. Se centrifugó a 5000 rpm/30 min y al sobrenadante se le añadió un volumen igual de alcohol etílico frío (relación 1:1, alcohol:agua) para efectuar una precipitación de contaminantes, dejando toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 5000 rpm/30 min y al sobrenadante obtenido se le agregó una cantidad suficiente de alcohol etílico frío para tener una proporción final de 5:1 (alcohol-agua), la pastilla, por su parte, fue reconstituida con agua destilada y al igual que el sobrenadante se le añadió 5 volúmenes de alcohol etílico frío (relación 5:1, alcohol:agua). Se les añadió acetato de sodio para favorecer la precipitación y se guardaron toda la noche a 4°C.

Ambas mezclas la del sobrenadante y la pastilla se centrifugaron a 5000 rpm/30 min y las pastillas de ambos fueron reconstituidas (por separado) en el mínimo volumen de agua. Posteriormente, se reprecipitaron añadiendo un volumen igual de alcohol y guardado a 4°C toda la noche. Nuevamente se centrifugó a 5000 rpm/30 min y se juntaron los sobrenadantes y los precipitados de ambas mezclas.

Al sobrenadante total y al precipitado total (reconstituido el mínimo volumen de agua), se les añadió suficiente alcohol etílico frío para tener una relación final de 5:1 (alcohol:agua). Se les agregó acetato de sodio para promover la precipitación y se mantuvieron a 4°C toda la noche.

Por último se centrifugó a 5000 rpm/30 min y el precipitado final obtenido, que constituye el polisacárido puro, se resuspendió en el mínimo volumen de agua, se liofilizó y caracterizaron los azúcares que lo constituyen por Cromatografía de Gases (Gas

Chromatographic System, Sigma 115 Perkin Elmer).

7.9 CUANTIFICACION DE AZUCARES.

La cuantificación de azúcares en el lipopolisacárido y/o polisacárido se realizó de acuerdo al método de antrona (71) empleando dextrosa como azúcar de referencia.

7.10 PREPARACION DE MUESTRAS PARA CROMATOGRAFIA DE GASES.

Del polisacárido obtenido se pesaron aproximadamente 2-3 mg y se pusieron a reaccionar con 0.5 ml de H_2SO_4 4N durante 4 horas a $100^\circ C$. Transcurrido el tiempo el producto de la reacción se enfrió y se llevó a un pH comprendido entre 7 y 8 con NaOH 2 N y enseguida se añadió aproximadamente 25 mg de $NaBH_4$ para efectuar una reacción de reducción durante 3 h a temperatura ambiente. Después se agregaron 5 ml de metanol absoluto y se evaporó hasta sequedad en un rotavapor, se añadieron otras dos porciones de 5 ml cada una y se efectuó la operación descrita.

Los azúcares reducidos se hicieron reaccionar con 0.5 ml de una mezcla de anhídrido acético:ácido sulfúrico (15:1), se calentó a $60^\circ C$ por 10 min y el producto de la reacción se vació en 5 ml de agua helada. Con dos porciones de 5 ml de cloroformo cada una, se efectuó la extracción del material orgánico en un embudo de separación, se juntaron los extractos y se secaron con Sulfato de Sodio Anhidro. Por último se llevó a una evaporación total y el producto final obtenido se reconstituyó con 100 μl de

cloroformo. Se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo (Gas Chromatographic System, Sigma 115 Perkin Elmer).

De igual manera se prepararon cantidades de Rhamnosa, Glucosa, Manosa y Galactosa.

Así entonces, para determinar los azúcares constitutivos del polisacárido ácido e inyectar los constituyentes como derivados acetilados, al igual que la mezcla de estándares, el orden de reacción llevado a cabo fue:

a) Hidrólisis:

Polisacárido \rightarrow Monosacáridos

b) Reducción:

Monosacáridos \rightarrow Polialcoholes

c) Acetilación:

Polialcoholes \rightarrow Poliacetatos ó Peracetatos

De acuerdo al orden de reacción presentado, para el caso de la mezcla de azúcares estándares se omitió sólo la reacción de hidrólisis continuándose el tratamiento

7.11 POLISACARIDO CAPSULAR VI (CPS VI).

El CPS VI fue proporcionado por el Dr. John Robbins (Laboratory of Developmental & Molecular Immunity. National Institute of Child Health and Human Development National Institutes of Health Bethesda, MD 2092 USA). Sólo se le determinó su pureza mediante el contenido de grupos O-acetilo.

7.12 CUANTIFICACION DEL CPS VI.

La cuantificación de grupo O-acetilo en Vi se determinó por el método de Hestrin empleando cloruro de acetilcolina como solución de referencia (72).

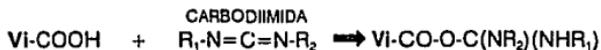
7.13 UNION DIRECTA DE VI CON PORINAS EMPLEANDO EDAC (METODO DIRECTO).

El polisacárido Vi fue unido a las porinas por el método de Beuvery et. al. (64). Volúmenes iguales de Vi y Porinas (10 mg/ml de cada especie) fueron mezclados ajustando el pH a 5.0 con HCl 0.1 N. Seguido a lo anterior se adicionó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) hasta una concentración final de 0.1 M y el pH fue mantenido en 5 por la adición de HCl 0.1 N durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo la mezcla de reacción fue mantenida en agitación por 2 h a 3-8°C y se centrifugó a 10 000 g x 2 h a 3-8°. El sobrenadante se filtró a través de Sephacryl S-1000 con NaCl 0.2 M leyendo y

recuperando las fracciones a 280 nm. El conjugado se analizó por HPLC (5000 Liquid Chromatograph Varian CDS 401) y se caracterizó mediante métodos químicos e inmunoquímicos.

MECANISMO DE REACCION:

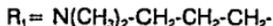
- Acoplamiento de EDAC con Vi:



- Unión con PORINAS



Donde:



7.14 UNION DE VI CON PORINAS EMPLEANDO SPDP (METODO INDIRECTO).

La síntesis para la conjugación del CPS VI con porinas se realizó de acuerdo al método descrito por Szu et al. (41).

7.14.1 TIOLACION DE VI CON CISTAMINA:

Se disolvieron 10 mg/ml de Vi en NaCl a 3-8°C y enseguida se añadió a la

solución, cistamina en relación 2:1 ajustando el pH a 4.9 con HCl 0.1 N y manteniendo la temperatura a 37°C. A continuación se añadió una cantidad igual de EDAC estabilizando el pH a 4.9. Por último se dializó contra agua a una temperatura de 3-8°C y se liofilizó.

7.14.2 DERIVACION DE PORINAS CON SPDP:

A una solución de porinas (10 mg/ml) en amortiguador de HEPES (hepes 0.15 M, EDTA 0.005 M, pH 7.55) se añadió una solución 20 mM de SPDP en etanol, en relación molar de 10 a 1. Se dejó reaccionar 1 h a temperatura ambiente y se dializó contra el amortiguador de HEPES en el cuarto frío toda la noche. Se conservó en refrigeración hasta su uso.

7.14.3 SINTESIS DEL CONJUGADO:

El derivado Vi-Cistamina fue disuelto en amortiguador de HEPES (HE) hasta una concentración final de 10 mg/ml. En seguida se añadió DTT hasta una concentración 100 mM agitándose durante 1 h a temperatura ambiente. El producto obtenido fue dializado contra HE durante 2 hrs y después se le añadió la solución de Porinas-SPDP. Se pasó N₂ a la mezcla anterior y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 hora y después por 24 h en cuarto frío. La mezcla de reacción se concentró y se filtró a través de Sephacryl S-1000 con NaCl 0.2 M a temperatura ambiente. Se juntaron y se

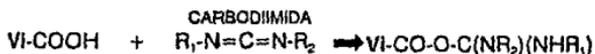
concentraron las fracciones correspondientes al volumen vacío, dializándose posteriormente contra NaCl 0.15 M. Se determinó la concentración de proteínas en el conjugado de acuerdo al método ya descrito y se realizó su análisis por HPLC (5000 Liquid Chromatograph Varian CDS 401).

Para su caracterización por métodos inmunoquímicos se empleó el Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida.

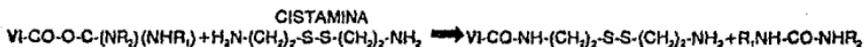
MECANISMO DE REACCION.

- Tiolación de VI.

A) Reacción con EDAC:



B) Reacción con Cistamina:



- Reducción de VI:



-Derivación de porinas con SPDP:

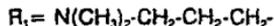
SPDP



-Síntesis del Conjugado:



Donde:



7.15 UNIÓN DEL POLISACÁRIDO ÁCIDO CON PORINAS EMPLEANDO EDAC.

El conjugado Polisacárido-Porinas se sintetizó siguiendo el método empleado por Lagergard T., para unir el polisacárido capsular tipo III de *Streptococcus* del grupo B al toxoide tetánico (73).

Aproximadamente 30 mg de PS ácido fueron disueltos en 3 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 10.5 con NaOH 1 N y enseguida se añadió 0.1 ml de una solución de CNBr (0.2 g/ml CH₃CN) manteniéndose el pH entre 10.5-11.0 durante 10 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 5 ml de una solución 0.5 M (en NaHCO₃) de Dihidrazida del Ácido Adípico, se ajustó el pH y se dejó reaccionar a 4°C toda la noche. El producto obtenido (PS-ADH) fue dializado durante toda la noche

El complejo PS-ADH fue adicionado en relación 1:1 a la solución de porinas. Se enfrió la mezcla y a continuación se ajustó el pH a 5.8 con HCl 0.1 N. Se añadió carbodiimida hasta una concentración 0.1 M, dejándose reaccionar durante 4 h en hielo con agitación. El conjugado obtenido se dializó contra NaCl 0.2 M por dos días, se centrifugó a baja velocidad y se pasó a través de Sephacryl S-1000 con NaCl 0.2 M. Se colectaron las fracciones correspondientes al volumen vacío y se determinó la concentración de proteínas en el conjugado. Por último se caracterizó por HPLC (5000 Liquid Chromatograph Varian CDS 401).

7.16 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se emplearon ratones C₃H/Fej hembras de 10-12 g de peso.

7.17 ESQUEMAS DE INMUNIZACION.

Grupos de 2 ratones de 10-12 g de peso se inmunizaron con los conjugados obtenidos, excepto el polisacárido-porinas. Como grupos control se formaron cuatro grupos más y se inocularon respectivamente con una mezcla de Vi-porinas, CPS Vi y/o porinas solos y NaCl 0.2 M (soporte de cada una de las especies).

Los esquemas que se emplearon fueron los siguientes:

- CONJUGADO VI-PORINAS (METODO DIRECTO)

DIA	VIA	DOSIS
0	i.p	15 μ g/400 μ l
15	i.p	15 μ g/400 μ l
23	i.v	15 μ g/400 μ l

- CONJUGADO VI-PORINAS (METODO INDIRECTO)

DIA	VIA	DOSIS
0	i.p	15 μ g/400 μ l
15	i.p	15 μ g/400 μ l
23	i.p	7.5 μ g/200 μ l

- CPS VI DE *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d

DIA	VIA	DOSIS
0	i.p.	15 μ g/400 μ l
15	i.p.	15 μ g/400 μ l
23	i.v.	15 μ g/400 μ l

- PORINAS *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d

DIA	VIA	DOSIS
0	i.p.	15 μ g/400 μ l
15	i.p.	15 μ g/400 μ l
23	i.v.	15 μ g/400 μ l

- MEZCLA VI-PORINAS

DIA	VIA	DOSIS
0	i.p.	15 μ g/400 μ l*
15	i.p.	15 μ g/400 μ l*
23	i.v.	15 μ g/400 μ l*

- TESTIGO (NaCl 0.2 M)

DIA	VIA	DOSIS
0	i.p.	400 μ l
15	i.p.	400 μ l
23	i.v.	400 μ l

8.0 RESULTADOS.

8.1. CARACTERIZACION DE LAS PORINAS, LPS Y CPS VI DE *Salmonella typhi*

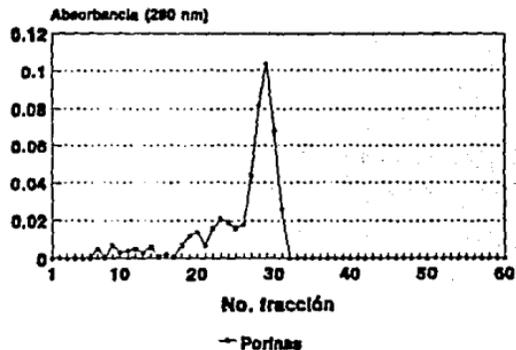
La porinas obtenidas por la técnica de Nikaido fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular filtrando a través de Sephacryl S-200. La columna fue calibrada con azul dextrán previo a la filtración de porinas. La gráfica No. 1 muestra el perfil cromatográfico característico para las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d obteniéndose un pico a los 116 ml.

Las fracciones del pico se juntaron y bajo condiciones reductoras se determinó su peso molecular por SDS-PAGE. La figura No.6 muestra la doble banda propia de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d cuyo peso molecular varía entre 38-42 kDa.

Por otro lado el LPS fue caracterizado por tinción de plata dado el patrón electroforético que presenta. La figura No.7 muestra el bandeo característico de un LPS puro.

La pureza para el CPS Vi, por el contrario, se determinó por el contenido de O-acetilo que presenta. El valor encontrado fue de 2.36 mM/g y de acuerdo a los métodos de validación elaborados (Informal Consultation On Vi Typhoid Vaccines, 9-11 July 1991) el contenido de O-acetilo para un polisacárido Vi puro no debe ser menor de 2.0 mM/g.

Porinas de *Salmonella typhi*



29-82-83
(U-4 ml)

GRAFICA No. 1

FILTRACION EN GEL DE LAS PORINAS DE *Salmonella typhi* A TRAVES DE UNA COLUMNA DE SEPHACRYL S-200.

EL ELUENTE FUE AMORTIGUADOR DE NIKAIIDO Y EL VOLUMEN DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES FUE DE 4 ml. Vo: VOLUMEN VACIO (VOLUMEN DE EXCLUSION).

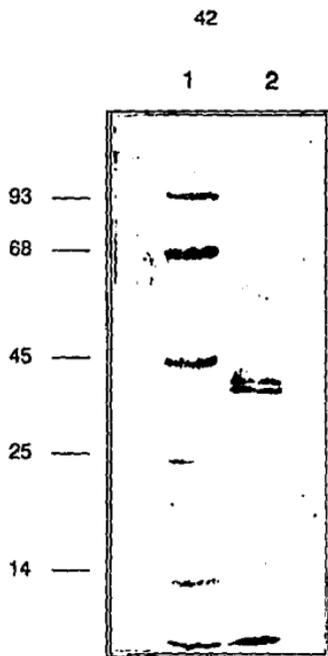


FIGURA No. 6

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LAS PORINAS DE *Salmonella typhi* 9,12, VI:d.

EL CARRIL No. 1 MUESTRA MARCADORES DE PESO MOLECULAR QUE CORRESPONDEN A: FOSFORILASA b (93 Cid), KM BOVINA (68 Cid, CID (45 Cid), ANHIDRASA CARBONICA (25 Cid) Y LISOZIMA (14 Cid). EL CARRIL No.2 MUESTRA LA DOBLE BANDA CORRESPONDIENTE A LAS PORINAS.

LPS



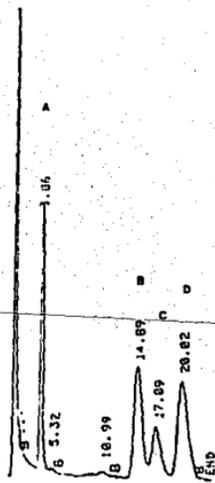
FIGURA No. 7

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DEL LIPOPOLISACARIDO DE *Salmonella typhi* 0901.

8.2 CARACTERIZACION DEL POLISACARIDO DE *Salmonella typhi* 0901

Para determinar la pureza del polisacárido ácido se eluyó por CG una mezcla de azúcares estándares que contenía rhamnosa, manosa, galactosa y glucosa que son los 4 de los azúcares constitutivos del LPS de *Salmonella typhi*. Estos monosacáridos fueron inyectados en el cromatógrafo como derivados acetilados y el tiempo de elución característico para cada monosacárido (Grafica No.2) se utilizó como patrón comparativo para cada uno de los picos obtenidos del polisacárido extraído (Gráfica No.3).

El análisis comparativo, entre los estándares y los monosacáridos del polisacárido extraído, demuestra que este último contiene 4 azúcares propios de la cadena oligosacárida de repetición del lipopolisacárido de *Salmonella typhi*.



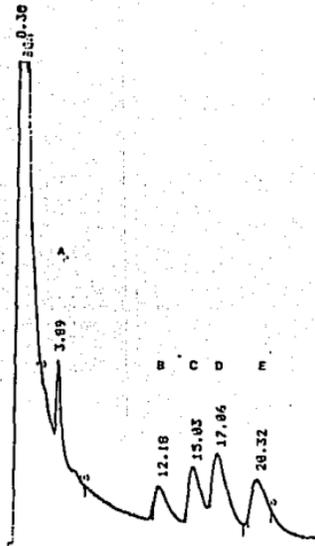
GRAFICA No. 2

CROMATOGRAFIA DE GASES DE AZUCARES ESTANDARES

A:RHAMNOSA; B:MANOSA; C:GALACTOSA; D:GLUCOSA

CONDICIONES: COLUMNA: ECNSS 3% (6 ft X 1/8); GAS ACARREADOR: N₂ (40 ml/min); TEMPERATURA

DEL INYECTOR: 240°C; TEMPERATURA DEL DETECTOR: 260°C.



GRAFICA No. 3

CROMATOGRAFIA DE GASES DEL POLISACARIDO (LPS) DE *Salmonella typhi* 0901.

A: RHAMNOSA; C: MANOSA; D: GALACTOSA; E: GLUCOSA.

EL PICO B CORRESPONDE A UN CONTAMINANTE PROVENIENTE DE LOS DISOLVENTES EMPLEADOS DURANTE LA EXTRACCION. CONDICIONES:

COLUMNA: ECNSS3% (6 ft X 1/8); GAS ACARREADOR: N₂ (40 ml/min.); TEMPERATURA DEL INYECTOR: 240°C; TEMPERATURA DEL DETECTOR: 260°C.

8.3 CARACTERIZACIÓN DEL CONJUGADO VI-PORINAS POR EL METODO DIRECTO Y POR EL METODO INDIRECTO

La conjugación de VI con porinas se realizó por dos métodos diferentes. Para el método directo se escogió la reacción con carbodiimida para acoplar los grupos carboxilo del CPS VI a los grupo amino de las proteínas y en el caso de método indirecto se decidió unir covalentemente derivados tiolados de VI con porinas derivatizadas con SPDP.

Los productos de ambos métodos de conjugación fueron purificados en una columna de exclusión molecular (Sephacryl S-1000) y como se muestra en las gráficas No.4 y No.7 el perfil de elución que presentan ambos productos es parecido. El CVP-MD muestra un pico a los 60 ml y otro a los 102 ml. El CVP-MI por otro lado muestra que sus picos están a los 54 y 112 ml respectivamente.

Para detectar cual de los dos picos contenía al conjugado, a cada una de las fracciones se les determinó la presencia de Vi por el método de Hestrin (71) y como se observa en las gráficas No.4 y No.7, las fracciones correspondientes al primer pico son las que contienen al conjugado ya que fueron positivas para la presencia de grupo O-acetilo y de proteínas.

Las fracciones correspondientes al primer pico se juntaron y el concentrado se separó en una columna por HPLC. Las gráficas 5a y 8a indican que el tiempo de elución para las porinas fue de 9.855 min y para el CPS Vi fue de 9.827 min (gráfica 5b y 8b), mientras que para el CVP-MI fue de 5.499min (Gráfica No.8c). El CVP-MD por el contrario mostró dos picos uno a los 5.556 min y el otro a los 6.799 min (Gráfica No. 5c).

El cambio en el tiempo de elución y por tanto en el peso molecular de los conjugados con respecto a las porinas y Vi, confirma la unión covalente entre ambas especies.

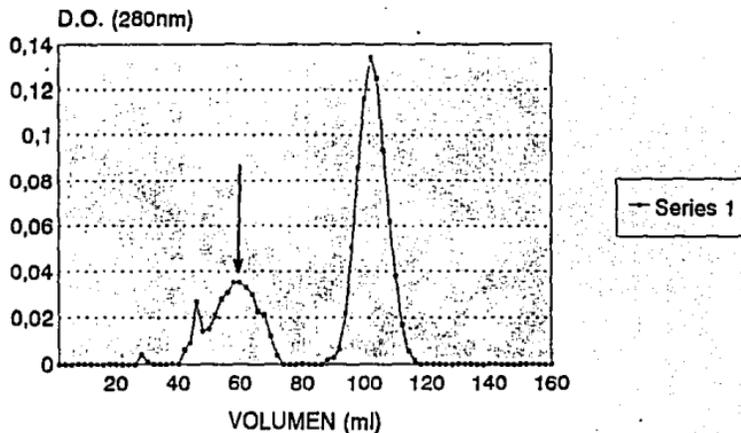
Para probar la antigenicidad de los conjugados, además de seguir corroborando la unión covalente entre Vi y porinas se realizó una ELISA. Para ello se recubrieron placas de poliestireno con cada uno de los conjugados y se evaluaron con dos antisueros de conejo uno anti-porinas y otro anti-Vi. En las gráficas No.6 y No.9 se muestra que los conjugados son reconocidos por sus respectivos antisueros, lo que demuestra que las especies que componen a cada uno de los conjugados están unidos covalentemente de lo contrario la reacción con el antisuero anti-Vi hubiera sido negativa ya que por su naturaleza polisacáridica el Vi se pega poco a la placa y no así las porinas que son especies con carga.

Dado que las cantidades en que se obtuvieron ambos conjugados eran muy pequeñas y no se podían realizar ensayos de protección, se decidió probar su capacidad inmunogénica. Los resultados (Gráfica No. 10) muestran que el CVP-MD induce una buena respuesta de anticuerpos anti-Vi pero una pobre respuesta de antiporinas, mientras que el CVP-MI genera una respuesta elevada de anticuerpos antiporinas pero no de anti-Vi.

Para confirmar si los resultados anteriores se debieron a cambios ocasionados por la conjugación se incluyó un grupo de animales inmunizados con una mezcla de Vi-porinas y como se observa en la gráfica No. 10 ésta fue capaz de inducir respuesta de anticuerpos hacia ambos componentes.

CONJUGADO Vi-PORINAS

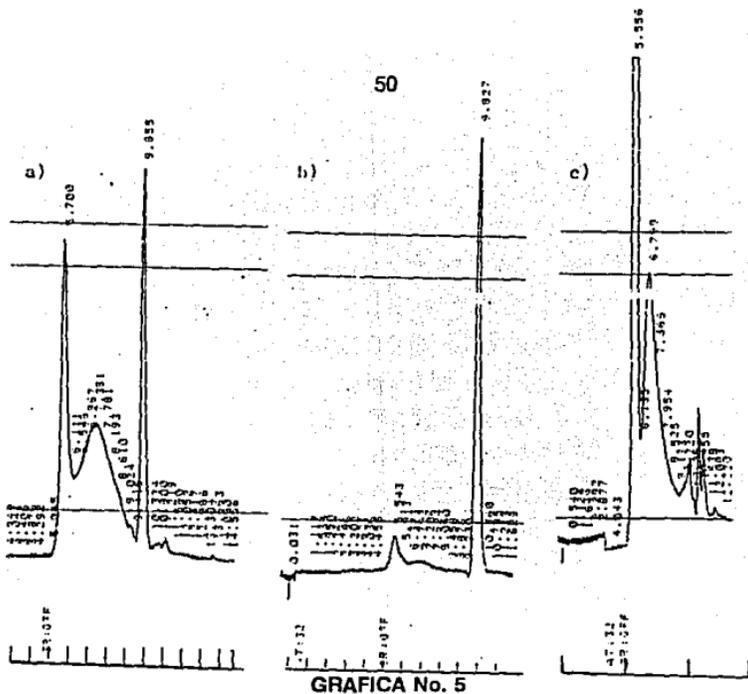
METODO DIRECTO



GRAFICA No. 4

PURIFICACION DEL CVP-MD POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

CONDICIONES: COLUMNA DE SEPHACRYL S-1000; ELUENTE NaCl 0.2 M; VOLUMEN DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES = 2 ml

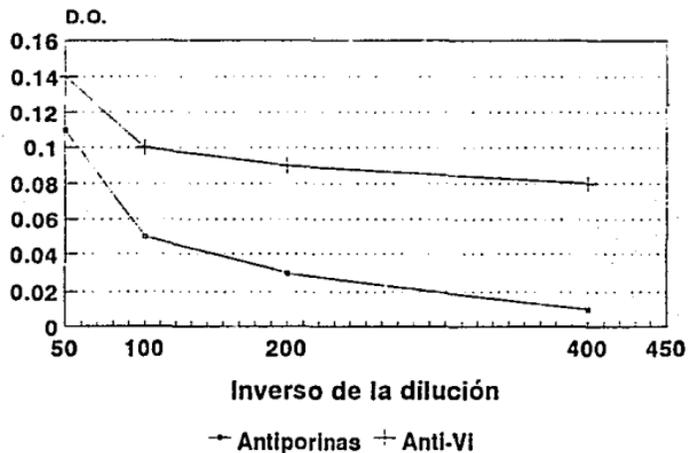


ANALISIS POR HPLC DEL CONJUGADO VI-PORINAS (METODO DIRECTO)

a) AZUL DEXTRAN (5.7 min.) Y PORINAS (9.855 min.); b) POLISACARIDO CAPSULAR Vi (9.827 min.); c) CONJUGADO VI-PORINAS (5.556 min).

CONDICIONES: TIPO DE COLUMNA: POLIHIDROXIMETILMETACRILATO (8mm X 300 mm, OHPak KB 804); ELUENTE: AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.1 M, pH 7.0; FLUJO: 1 ml/min.; λ : 220 nm; VELOCIDAD DEL PAPEL: 0.6 cm/min.

CONJUGADO Vi-PORINAS METODO DIRECTO

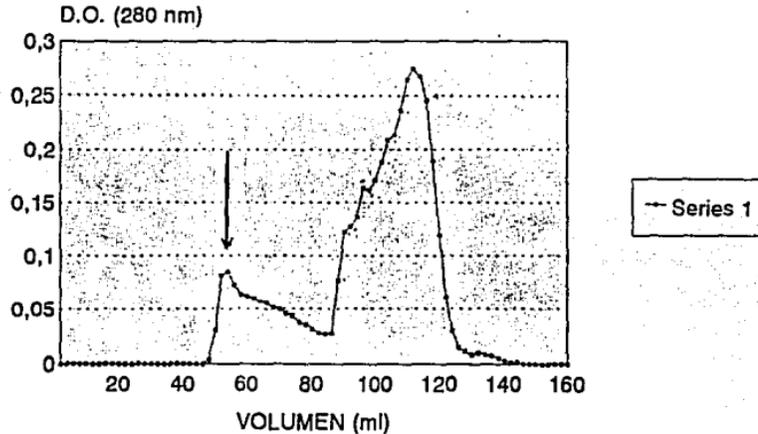


GRAFICA No. 6

ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA PARA LA DETECCION DE VI Y PORINAS EN LA FRACCION CORRESPONDIENTE A EL CVP-MD.

CONJUGADO Vi-PORINAS

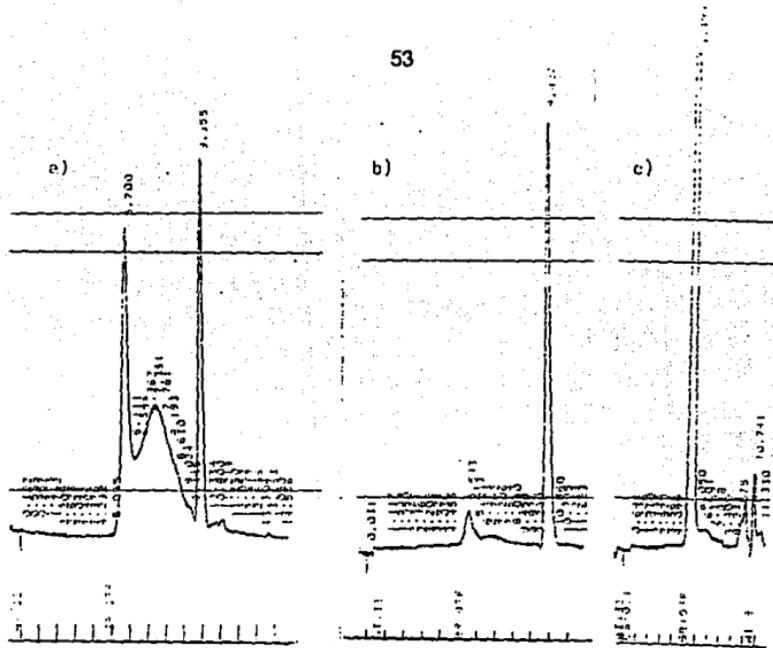
METODO INDIRECTO



GRAFICA No. 7

PURIFICACION DEL CVP-MI POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

CONDICIONES: COLUMNA DE SEPHACRYL S-1000; ELUENTE NaCl 0.2 M; VOLUMEN DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES = 2 ml.



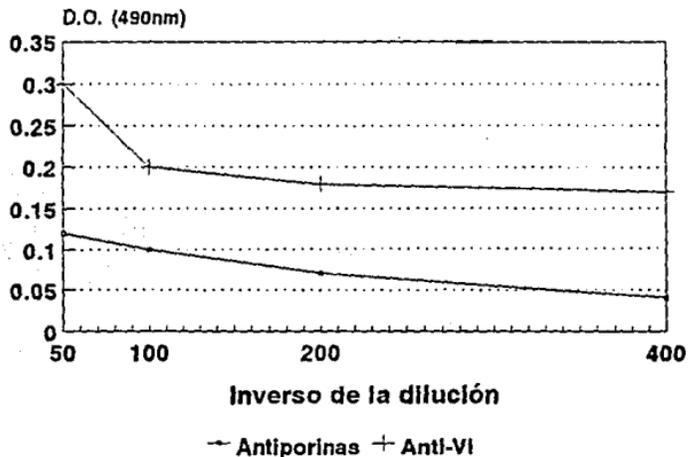
GRAFICA No. 8

ANALISIS POR HPLC DEL CONJUGADO VI-PORINAS (METODO INDIRECTO)

a) AZUL DEXTRAN (5.7 min.) Y PORINAS (9.855 min.); b) POLISACARIDO CAPSULAR Vi (9.827 min.); CONJUGADO Vi-PORINAS (5.499 min.)

CONDICIONES: TIPO DE COLUMNA: POLIHIDROXIMETILMETACRILATO (8 mm X 300 mm, OHPak KB 804); ELUENTE: AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.1 M, pH 7.0; FLUJO: 1 ml/min.; λ : 220 nm; VELOCIDAD DEL PAPEL: 0.6 cm/min.

CONJUGADO Vi-PORINAS METODO INDIRECTO

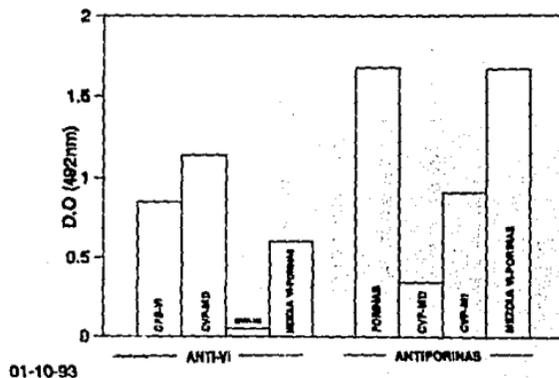


GRAFICA No. 9

ENSAYO INMUNENZIMATICO EN FASE SOLIDA PARA LA DETECCION DE VI Y PORINAS EN LA FRACCION CORRESPONDIENTE A EL CVP-MI.

ENSAYOS DE INMUNOGENICIDAD

INDUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-VI Y ANTI-PORINAS



GRAFICA No. 10

INDUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-VI Y ANTI-PORINAS POR LOS CONJUGADOS CVP-MD Y CVP-MI.

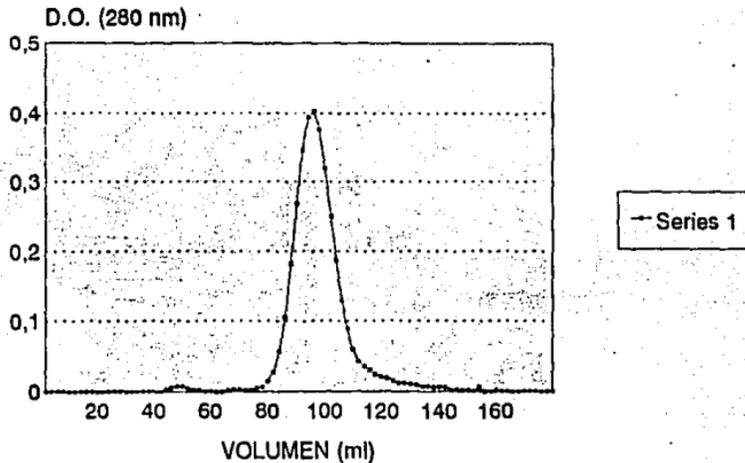
8.4 CARACTERIZACION DEL CONJUGADO POLISACARIDO-PORINAS

En lo que respecta al conjugado Polisacárido-Porinas después de purificar por la columna de exclusión se obtuvieron dos picos y como lo muestra la gráfica No.11 el primero de ellos es apenas visible. En este caso las fracciones correspondientes a cada pico se juntaron y el volumen total obtenido se concentró. En seguida cada pico fue analizado por HPLC y el resultado mostró que ningún pico contenía una especie de alto peso molecular como lo tendría el conjugado. El análisis muestra que se tienen especies de un peso molecular inferior al de las porinas o polisacárido solos (Gráfica No.12).

Dado lo anterior el producto final de la reacción, sin ser filtrada por la columna de exclusión molecular, fue también analizada por HPLC. El patrón de elución muestra que hay una especie de alto peso molecular superior al de las porinas o polisacárido solos que corresponden al conjugado polisacárido-porinas (Gráfica No.13). Este comportamiento indica que la unión es muy inestable que le permite ser degradada con facilidad.

En este caso se omitió tanto el ensayo de antigenicidad como el de inmunogenicidad porque el rendimiento de la reacción fue muy bajo además de que en un principio se tenía la idea de que no se había efectuado la conjugación del polisacárido con porinas.

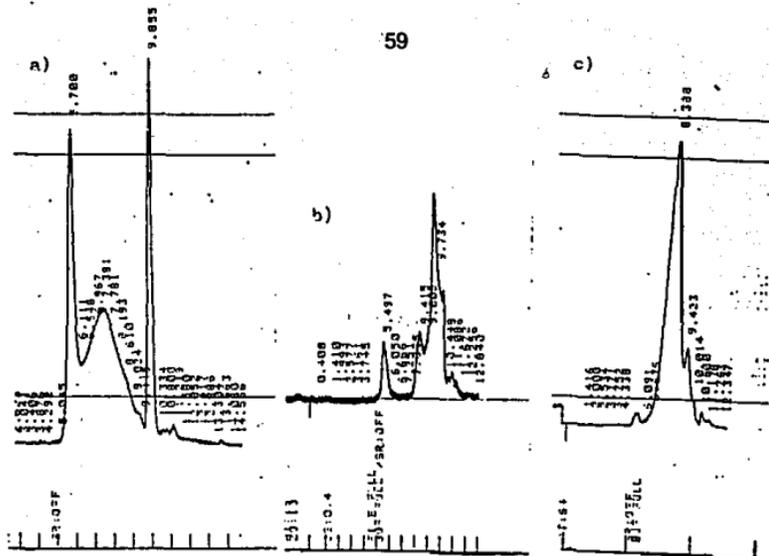
CONJUGADO POLISACARIDO-PORINAS (2L) SEPHACRYL S-1000



GRAFICA No. 11

FILTRACION EN GEL CONJUGADO POLISACARIDO-PORINAS A TRAVES DE UNA COLUMNA DE SEPHACRYL S-1000.

EL ELUENTE FUE NaCl 0.2 M Y EL VOLUMEN DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES FUE DE 2 ml.



9.0 DISCUSION DE RESULTADOS

Los polisacáridos capsulares (CPS) han sido estudiados ampliamente para emplearse como vacunas contra enfermedades infecciosas. Sin embargo por sus características timo-independientes son capaces de generar sólo inmunidad de corta duración y no son eficaces en niños menores de 18 meses, por lo que no se podrían aplicar masivamente para prevenir enfermedades infecciosas en zonas con alta incidencia. Originalmente Goebel y Avery (30, 31) mostraron que la inmunogenicidad del polisacárido de *Pneumococcus* tipo 3 podía ser incrementada por su unión a una proteína acarreadora, por tanto una alternativa para enfrentar este problema ha sido el desarrollo de conjugados polisacárido-proteínas con la finalidad de conferirles propiedades timo-dependientes y así aumentar sus características inmunogénicas y su capacidad de inducir inmunidad de larga duración al generar células B de memoria. Para la inducción de células B de memoria y de células plasmáticas productoras de IgG se requiere la participación de células T cooperadoras (74, 75, 76).

Así entonces dado lo anterior se propuso la síntesis de tres conjugados obteniéndose el CVP-MD, el CVP-MI y el CPP. De estos sólo los dos primeros fueron empleados para realizar ensayos de antigenicidad e inmunogenicidad, pues el CPP mostró tener poca estabilidad.

Ambos conjugados con Vi resultaron ser antigénicos pero su inmunogenicidad varió siendo dependiente del modo de conjugación. Los resultados muestran que las especies que componen a los conjugados (Porinas y CPS Vi) por sí solos son buenos inmunógenos pero la conjugación afecta esta propiedad, pues una mezcla Vi-Porinas fue

capaz de tener el mismo comportamiento que poseen estas especies. .

La respuesta contra porinas disminuye en ambos conjugados siendo mucho menor en el CVP-MD. La razón para este comportamiento es que en la conjugación el Vi bloquea los principales sitios inmunogénicos de las porinas estando más cubiertas en el CVP-MD dado el enlace amídico que une tan estrechamente a las porinas y al Vi en cambio en el CVP-MI un puente disulfuro separa las especies permitiendo que haya más sitios expuestos de las porinas.

La respuesta contra Vi, por otro lado se ve favorecida en el CVP-MD pero es nula en el CVP-MI en este caso un cambio conformacional al haber o no espaciador altera este comportamiento.

Otra probable respuesta a la variación en la inmunogenicidad, generada por los conjugados, parece tener justificación en un impedimento estérico que altera de alguna manera la conformación de cada una de las especies, induciendo la producción de anticuerpos dirigidos contra sitios diferentes a los de las formas nativas, pues para evaluar la respuesta, las placas de ELISA fueron cubiertas con las formas nativas de las especies componentes de los conjugados.

Se puede pensar en otras especulaciones que justifiquen este comportamiento pero se creó que las que aquí se dan son las de mayor importancia. Dubray demostró que la inmunogenicidad de una vacuna conjugada es dependiente de la dosis inmunizante, el modo de inmunización y el modo de conjugación (65).

10.0 CONCLUSIONES

- Las porinas y el polisacárido se obtuvieron con un buen grado de pureza la SDS-PAGE y la CG respectivamente lo demuestra.

- La unión covalente entre el CPS Vi y las porinas, así como entre el PS y la última fracción, fue posible obteniéndose tres conjugados CVP-MD, CVP-MI y CPP, de los cuales sólo el último presentó poca estabilidad.

- Ambos conjugados con Vi resultaron ser antigénicos, pero de inmunogenicidad variable.

- La conjugación influye en la capacidad inmunogénica de lo conjugados, pues una mezcla Vi-porinas fue capaz de inducir una respuesta similar a la que tuvieron las porinas y/o el CPS Vi solos, en cambio en los conjugados la respuesta contra porinas bajo y la respuesta contra Vi solo se vio favorecida en el CVP-MD.

- Aunque el ensayo de protección no fue posible dado el bajo rendimiento de cada una de las reacciones, se puede especular que la conjugación no es necesaria para conferir un mayor estado de protección contra la infección por *Salmonella typhi* pues una mezcla de Vi-porinas *per se* puede proporcionarlo.

11.0 PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES:

Dado que los resultados obtenidos muestran que la conjugación de Vi y porinas no es necesaria para mejorar la respuesta contra Vi y generar así un buen estado de protección, se propone inocular una serie de ratones con una mezcla Vi-porinas y retar con dosis arriba de la DL_{50} para descartar que el efecto protector se debe a las porinas (en $500 DL_{50}$) y que la protección aumenta al inducir una respuesta de tipo IgG contra Vi.

Por otro lado se hace incapié en analizar el modo de conjugación del CPP y evaluar su capacidad antigénica antes de ser filtrado en la columna de Sephacryl S-1000 así como evaluar su capacidad protectora.

12.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abbas, K. A., Lichtman, A. H. and Pober J. S. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company. United States of America.
- 2.- Baker. P. J., and Stashak, P.W. 1969. Quantitative and qualitative studies on the primary antibody response to pneumococcal polysaccharides at the cellular level. *J. Immunol.* 103:1342-1348.
- 3.- Baker. P.J., Stashak, P.W., Amsbaugh, D.F. and Prescott, B. 1971. Characterization of the antibody response type III pneumococcal polysaccharide at the cellular level. I. Dose-response studies and the effect of prior immunization on the magnitude of the antibody response. *Immunology* 20:469-480.
- 4.- Basten, A., and Howard, J.G. 1973. Thymus independence. *Contemp. Top. Immunobiol.* 2:265-291.
- 5.- Braley-Mullen, H. 1974. Regulatory role of T-cells in IgG antibody formation and immune memory to type III pneumococcal polysaccharide. *J. Immunol.* 113:1909-1920.
- 6.- Klaus, G. G. B. and Humphrey, J.H. 1974. The immunological properties of haptens coupled to thymus-independent carrier molecules. I. The characteristics of the immune response to dinitrophenyl-lysine-substituted pneumococcal polysaccharide (S III) and levan. *Eur. J. Immunol.* 9:370-377.
- 7.- Lerman, S. P., Romano, T.J., Mond, J.J., Heidelberg, M. and Thorbecke G.J. 1975. Induction of a primary and inhibition of secondary antibody response to hapten by hapten conjugates of type III pneumococcal polysaccharide. *Cell. Immunol.* 15:321-335.

- 8.- Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T.E., Dupont, H. L., Drawings, A.T. and Sayder, W. J. 1970. Typhoid fever pathogenesis and immunological control. *N. Engl. J. Med* 283: 686-691.
- 9.- Sandford, G.R. 1979. Infectious diseases. Ed. Burgess Pub. Co. USA. pp. 55-130.
- 10.- Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed. E.S. y S. Livinstong, L.T.D., London. pp. 4-9
- 11.- Kumate, J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: Kumate, J. y Gutiérrez G. Manual de infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
- 12.- Anuario estadístico 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S. 1988.
- 13.- Davies, B.D., Dulbeco, R., Eisen, H.N., Gingberg, H.S. and Wood, W.B. 1983. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. Barcelona, España.
- 14.- Typhoid Fever. Strategies for the 90's. Selected papers from the First Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever. Pang, T., Koh, C. L. and Puthuchearry S. D., Editors. Word Scientific. Kuala Lumpur, Malaysia. October 1-3, 1991.
- 15.- 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.
- 16.- Kumate, J. 1979. Inmunidad, Inmunización y Vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp: 227-247.
- 17.- Makela, P.H. 1979. Immunization with outer major membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25: 857-862.

- 18.- Perez, M.A. y Cabrera, R. 1974. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Rev. Sal. Pub. de Méx. 15: 185-194.
- 19.- Germanier, R. 1984. Typhoid fever. In Bacterial vaccines. Ed. Germanier, R. Academic Press, pp. 137-165.
- 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.- 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 URS. Bull WHO. 30: 321-339.
- 22.- Levine, M.N. , Ferrecio, C., Black, R.E., Tacket, C.O., Germanier, R. and the Chilean Typhoid Committee, 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 11: 8552-8567.
- 23.- 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.
- 24.- Polish Typhoid Committee 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull WHO. 32: 15-27.
- 25.- Typhoid Panel, U.K. Department of Technical Cooperation. 1964. A controlled field trial of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Gulana. Bull WHO 30: 631-634.
- 26.- 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.

- 27.- 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: 1143-150.
- 28.- Cole, S.T., Sonnta, I. and Henning, U. Cloning and repression en *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 1982. 149:145-150.
- 29.- 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.
- 30.- Avery, O. T. y W. F. Goebel. 1929. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. II. Immunological specificity of synthetic sugar-proteins. J. Exp. Med. 50-521.
- 31.- Goebel, W. F. 1929. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. XII. The immunological properties of an artificial antigen containing cellobiuronic acid. J. Exp. Med. 50: 469.
- 32.- Anderson, P. W., Pichichero, M. E., Insel, R. A., Betts., R. Eby, R. and Smith, D. G. 1986. Vaccines consisting of periodate-cleaved oligosaccharides from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b coupled to a protein carrier: structural and temporal requirements for priming in the human infant. J. Immunol. 137:1181.
- 33.- Beuvery, E. C., Rossum, F. V. and Nagel J. 1982. Comparison of the and G antibodies in mice with purified pneumococcal type 3 and meningococcal group C

polysaccharides and their protein conjugates. *Infect. Immun.* 40:245.

34.- Chu, C. Y., Schneerson, R., Robbins, J. B. and Rastogi, S. C. 1983. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 40:245.

35.- Jorbeck, H. J. A., Svenson, S. B. and Lindberg, A. A. 1981, Artificial *Salmonella typhimurium* O-antigen-specific oligosaccharide-protein conjugates elicit opsonizing antibodies that enhance phagocytosis. *Infect. Immun.* 32:497.

36.- Schneerson, R., Barrera, O., Sutton, A. and Robbins, J. B. 1980. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J. Exp. Med.* 152:361.

37.- Schneerson, R., Robbins, J. B., Chu, C. Y., Sutton, A., Vann, W., Vickers, J. C., London, W. T., Curfman, B., Hardegree, M. C., Shiloach, J. and Rastogi, S. C. 1984. Serum antibody responses of juvenile and infant Rhesus monkeys injected with *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcus type 6A polysaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 45:582.

38.- Schneerson, R., Robbins, J. B., Szu, S. C. and Yang, Y. 1987. Vaccines composed of polysaccharide-protein conjugates: current status, unanswered questions, and prospects for the future. In *Towards Better Carbohydrate Vaccines*. R. Bell and G. Rorigiani, editors. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, United Kingdom. In press.

39.- Schneerson, R., Robbins, J. B., Parker, J. C., Sutton, A., Wang, Z., Schlesselman, J., Schiffman, G., Bell, C., Karpas, A. and Hardegree, M. C. 1986. Quantitative and qualitative analyses of serum *Haemophilus influenzae* type b, pneumococcus type 6A and

tetanus toxin antibodies elicited by polysaccharide-protein conjugates in adult volunteers. *Infect. Immun.* 52:501.

40.- Szu, S. C., Schneerson, R. and Robbins, J. B. 1986. Rabbit antibodies to the cell wall polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* fail to protect mice from lethal infection with encapsulated pneumococci. *Infect. Immun.* 54:448.

41.- Szu, S. C., Stone, A. L., Robbins, J. D., Schneerson, R. and Robbins, J. B. 1987. Preparation and characterization of conjugates of the VI capsular polysaccharide and carrier proteins. *J. Exp. Med.* 166: 1510-1524.

42.- Szewezky, B. and Taylor, A. 1980. *Infect. Immun.* 29:539.

43.- Mosier, D. E., Zidivar, N. M., Goldings, E., Mond, J., Scer, I. and Paul, W. E. 1977. *J. Infect. Dis.* 136: S14.

44.- Felix, A. and Pitt, R.M. A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet* 1934; 2:186.

45.- Felix, A. and Pitt, R. M. Virulence of *B. typhosus* and resistance to O antibody 1934. *J. Pathol. Bacteriol.* 38:409.

46.- Felix, A. and Pitt, R. M. 1951. The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. *J. Hyg (Camb).* 49:92.

47.- Felix, A., Krikorian, A.S. and Reitler, R. 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing VI antigen in case of typhoid fever and of VI-antibody in their sera. *J. Hyg (Camb)* 35: 421.

48.- Felix A. New type of typhoid and paratyphoid vaccines. *Brit. Med. J.* 1941; 1:391

49.- Landy, M., Gaines, S. and Seal, J.P. Whiteside J.E. Antibody responses of man to three types of antityphoid immunizing agents. *Am. J. Publ. Health* 1954; 44: 1572.

ESTA TESIS DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 50.- Rosen, F. D., Steiner, A. L. and Unanue, R. E. 1989. Macmillan Dictionary of Immunology. Macmillan reference books. Great Britain.
- 51.- McDonaugh, M. W. 1965. J. Mol. Biol. 12:342.
- 52.- Silverman, M. and Simon, M. 1977. Ann. Rev. Microbiol. 31:397.
- 53.- Nikaido, J. 1983. Proteins forming large channels form bacterial and mitochondrial outer membranes; porins and phago λ receptor protein. *Methodos in Enzymology*. 97:85-100.
- 54.- Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C.R., García J. A. and Kumate, J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* 10:811-813.
- 55.- Isibasi, A., Ortiz, N. 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, Vi:d. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- 56.- Osborn, M.J. and Wu., H. C. P. 1980. Ann. Rev. Microbiol. 34:369.
- 57.- Ichichara, S. Hussain, M. and Mizushima. 1966. J. Biol. Chem. 256:3125.
- 58.- Di Rienzo, J. M., Nakamura, L., Inouye J. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis assembly an functions . *Ann. Rev. Biochem.* 47: 481-523.
- 59.- Lugtenberg, B. and Van Alphen, L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. Elsevier Biomedical Press. *Biochimica et Biophysica Acta* 737 (1983) 51-115..

- 60.- Kussi, N., Nurminen, M. and Saxen H. 1979. Immunization with outer membrane protein in experimental Salmonellosis in mice. *Immunol.* 25: 863.
- 61.- Jap, B.K. 1989. Molecular design of Pho E porin and its functional consequence. *J. Mol. Biol.* 205: 407-419.
- 62.- Paniagua, J., García, J. A., López, C. R., González, C. R., Isibasi, A. and Kumate, J. 1992. Conjugate vaccines against infectious diseases: typhoid fever. *Sal. Pub. Mex.* 34:268-273.
- 63.- García, J. A., Paniagua, J., Pelayo, R., Isibasi, A. and Kumate, J. 1992. Virulence factors from *Salmonella typhi* related to the development of new vaccines. *Sal.Pub. Mex.*
- 64.- Beuvery, C. E., Rossum, van R. and Nagel J. 1982. Comparison of the Induction of Immunoglobulin M and G Antibodies in Mice with Purified Pneumococcal Type 3 and Meningococcal Group C Polysaccharides and Their Protein Conjugates. *Infect. Immun.* 37:15-22.
- 65.- Jacques and Dubray, G. 1991. *Escherichia hermannii* (ATCC 33651) polysaccharide-protein conjugates: comparison of two conjugation methods for the induction of humoral responses in mice. *Vac.* 9:559-563.
- 66.- Nikaido, H. and Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial. Rev.* 49:1-32.
- 67.- Lowry, D.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.
- 68.- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

- 69.- Westphal, O. and Jann, A. K. 1965. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 5:83-91.
- 70.- Tsai, C.M. and Frasch, C.E. 1982. A sensitive silver stain detecting lipopolysaccharide in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 119:115-119.
- 71.- Trevelyan, W.E. and J.S. Harrison. 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* 50:298-303.
- 72.- Hestrin, S. 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytic applications. *J. Biol. Chem.*, 180:249-261.
- 73.- Lagergard, T., Shiloach, J., Robbins, B. J. and Schneerson, R. 1990 . Synthesis and Immunological Properties of Conjugates Composed of Group B Streptococcus Type III Capsular Polysaccharide Covalently Bound to Tetanus Toxoid. *Infect. Immun.* 58:687-694.
- 74.- Braley-Mullen, H. 1977. Secondary IgG response to type III pneumococcal polysaccharide, III. T-cell requirement for development of B memory cells. *Eur. J. Immunol.* 7: 775-781.
- 75.- Davie, J. M. and Paul, W. E. 1974. Role of T-lymphocytes in the humoral immune response. O. Proliferation of B lymphocytes in thymus-deprived mice. *J. Immunol.* 113:1438-1445
- 76.- Dresser, D. W. and Popham, A. M. 1979. The influence of T-cells on the initiation and expression of immunological memory. *Immunology.* 38:265-274.