

19
20je



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILAN**

**“EVALUACION DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE
ESPLENCITOS DE RATON A FAGOS DE FUSION QUE
EXPRESAN DETERMINANTES ANTIGENICOS
OmpC DE *Salmonella typhi*”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
CLAUDIA GOMEZ PALOMINO

Asesores: M. V. Z. Benito López Baños
Dr. Armando Isibasi Araujo Q. F. I. Andrea Becerril Osnaya

CUAUTILAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis TITULADA: "Evaluación de la Respuesta Proliferativa de los Linocitos de Ratón a Pulsos de Fusión que Expone a Determinantes Antígenicos OmpC de Salmonella typhi"

que presenta la pasante Clauia Gómez Palomino con número de cuenta: 511301-2 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de Septiembre de 1993

PRESIDENTE Dr. F. I. Andrés Escarcell Osaya
VOCAL M. C. Gerardo Cruz Jiménez
SECRETARIO Dr. Marco A. Vera López
PRIMER SUPLENTE M. C. Susana Díaz Barriga
SEGUNDO SUPLENTE M. C. Rosalva Bolaños Sincas

La parte experimental de este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, y en el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud y el análisis estadístico de los resultados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

A mi Familia...

... a mis Padres porque ademas de darme la vida me han dado libertad para vivirla. Por caminar a mi lado, a mi ritmo, con confianza, siempre respetando mi individualidad aunque mis decisiones no siempre vayan de la mano con sus aspiraciones. Por estar conmigo en la enfermedad y durante los fracasos y los éxitos, por amarme ..." por ser ellos ".

... a mis hermanas Luchin y Lala. por sus cuidados. por su apoyo y también por sus críticas, gracias a las cuales me supero constantemente. Deseando que alcancen sus metas más preciadas.

... A mi abue por sus abrazos. sus caricias y sus atenciones de las que siempre he disfrutado desde niña.

Al Profesor Benito López Baños por su espíritu universitario ya que gracias a el, yo como muchos otros compañeros hemos contado con su asesoría, que ha iniciado con el apoyo estadístico y terminado con la nutrición y fructificación total del trabajo de tesis.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por sus Profesores, quienes siempre me dieron las oportunidades que pedí y en quienes encontré gran compañerismo y amistad cuando más lo necesite; por su personal bibliotecario y de hemeroteca, quienes con su preparación supieron orientarme en la búsqueda y recopilación de información; por su personal de fotocopiado ya que gracias a ellos tuve acceso a la información sin límite; por su personal de servicios escolares, quienes siempre fueron amables y estuvieron atentos a mis peticiones; por su personal de exámenes profesionales por satisfacer y atender a mis necesidades y también al personal de vigilancia e intendencia de quienes obtuve cada día una sonrisa y aliento para seguir adelante.

A todos, porque entre ellos me convertí en una profesionista segura y capaz de desempeñarme con éxito en lo futuro.

Agradezco al Dr. Armando Isibasi Araujo por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio con la misma libertad y confianza que siempre otorga a sus estudiantes.

Al Dr. Guillermo Ramirez y al M. en C. Jorge Paniagua por su asesoria y muy especialmente al Dr. Vianey Ortiz por su preocupaci3n, su tiempo y por haberme enseado que, " La inteligencia debe ser aplicable en todas y cada una de las vivencias del ser humano ".

A la Profesora Andrea Becerril Osnaya porque ademas de ser excelente maestra, siempre ha sabido ser una buena amiga y compañera conmigo y con muchos otros alumnos de la Facultad.

A las Químico Farmacéutico Biólogas Ana Laura Vázquez Martínez y Margarita Araceli Zavala Carbillo por enseñarme las técnicas inmunológicas y brindarme su ayuda y amistad incondicional durante el tiempo de realización de este trabajo y hasta la fecha.

... AUNQUE LA CIENCIA NO ES BUROCRACIA, ES ESENCIAL CONTAR CON UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN CUALQUIER TIPO DE INVESTIGACIÓN EN EL CUAL SE DELIMITARÁ EL CAMPO DE ESTUDIO, LO CUAL CONLLEVARÁ A ALCANZAR LOS OBJETIVOS PLANTEADOS EN TODOS Y CADA UNO DE LOS "PROTOSCOLOS DE INVESTIGACIÓN", ESTABLECIENDO ¿CÓMO, CUÁNDO, DÓNDE Y QUÉ PARÁMETROS SE MEDIRAN?, ASÍ COMO TAMBIÉN LA FORMA EN QUE SE EVALUARÁN LOS RESULTADOS...

B. L. B.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

GLOSARIO

RESUMEN

I.	INTRODUCCION	1
1.1	<u>Salmonella typhi</u> y Fiebre Tifoidea	1
1.2	Antigenos de Salmonella y su Inmunogenicidad ..	4
1.3.	Epitopos	10
1.4.	Fagos de Fusión (fUSES)	11
1.5.	Banco de Epitopos de la Porina OmpC	15
II.	OBJETIVO	21
III.	HIPOTESIS	21
IV.	MATERIAL Y METODOS	22
4.1.	Diagrama de Flujo	22
4.2.	Material	23
4.3.	Métodos	24
4.3.1.	Aislamiento de clones de fUSES rec	24
4.3.2.	Amplificación y Purificación de fUSES rec	24
4.3.3.	Formación y Amplificación de Mezclas	25
4.3.4.	Cuantificación de Proteínas	25
4.3.5.	Porina OmpC rec	26
4.3.6.	Animales de Experimentación	26
4.3.7.	Obtención y Cultivo de Esplenocitos ...	26
4.3.8.	Ensayo de Activación "in vitro" con Concanavalina A	27
4.3.9.	Ensayo de Activación Antígeno-Específico	27
4.4.	Análisis Estadístico de Resultados	29
4.4.1.	Ensayo de activación con concanavalina A	29
4.4.2.	Ensayo de Proliferación Antígeno-Específico	29

V. RESULTADOS	30
VI. DISCUSION	38
6.1 Ensayo de Activacion con Concanavalina A	38
6.2 Ensayo de Proliferación Antígeno-Específico ...	41
VII. CONCLUSIONES	45
VIII. BIBLIOGRAFIA	46

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Envoltura celular de las bacterias Gram negativas	3
2	Modelo estructural de la porina PhoE de <u>Escherichia coli</u>	8
3	Tipos de Epitopos	12
4	Micrografía Electrónica del Fago fd	14
5	(a) Bacteriófagos Filamentosos desplegando epitopos en la superficie (b) Biopanning un método de purificación	16
6	Búsqueda de clonas del fago Sgt11 con sondas de células T	19
7	Estimulación de Esplenocitos con Con A. Efecto del Tiempo de Incubación	32
8	Estimulación de Esplenocitos con Con A. Efecto de la Concentración	33
9	Estimulación de Esplenocitos de BALB/c y C3H/JeB con Mezclas de FUSES rec	36
10	Efecto de la Concentración de las Mezclas de FUSES rec	37

INDICE DE TABLAS

TABLAS	Descripción	Página
1	Estadísticas Descriptivas del Ensayo de Proliferación con Concanavalina A	31
2	Estadísticas Descriptivas del Ensayo de Proliferación Antígeno-Específico con Esplenocitos de Ratón de la cepa BALB/c	34
2	Continuación Estadísticas Descriptivas del Ensayo de Proliferación Antígeno-Específico con Esplenocitos de Ratón de la Cepa C3H/JeB	35

GLOSARIO

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADN ^r	Acido Desoxirribonucleico recombinante (libreria de DNA)
A.E.	Actividad Especifica
ANDEVA	Análisis de varianza
BALB/c	Cepa de Ratón
BrCN	Bromuro de Cianogeno
C.D.E.	Coefficiente de Estimulación
C3H/HeJ	Cepa de Ratón
CON A	Concanavalina A
c.p.m.	Cuentas por minuto
Da	Daltons
DEM	Medio Modificado de Dulbeco
DL ₅₀	Dosis letal 50
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
Fc	Fracción cristalizante de una inmunoglobulina
H-2	Complejo principal de histocompatibilidad del raton
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etano-sulfónico
³ HTDr	Timidina Tritiada
I.E. _C	Indice de estimulación del ratón control
I.E. _I	Indice de estimulación del ratón inmune
Ig	Inmunoglobulina
INH	Instituto Nacional de Higiene
I.P.	Intraperitoneal
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolisacárido
μCi	micro Curies
ML	Medio Luria
Omp	Proteina de membrana externa (según sus siglas en inglés)
pb	Pares de bases

F.B.M.C. Células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés)

P.B.S. Regulador de fosfatos salinos

P.E.G. Polietilenglicol

Pho E Proteína de membrana externa inducible a concentraciones bajas de fosfatos

P.M.E. Proteínas de Membrana Externa

rec Recombinante

S.F.B. Suero Fetal Bovino

Te Tetraciclina

TRIS Hidroximetil-aminometano

V.A. Vía de administración

RESUMEN

Con el objeto de determinar que mezcla o mezclas de clonas de fUSES recombinantes provenientes de un banco de epitopos de la porina OmpC de Salmonella typhi son mejor reconocidas por esplenocitos de ratón, se formaron 17 mezclas al azar de 10 clonas de fUSES rec cada una, con las que se realizaron ensayos de activación de esplenocitos de ratones de las cepas BALB/c y C3H/Jeb sensibilizados 7 días antes con 50 µg de la porina OmpC recombinante, empleándose las mezclas en dos concentraciones 5 y 10 µg/ml y utilizándose Concanavalina A como control positivo de activación. Se encontró que la concentración de Concanavalina A y el tiempo de incubación óptimos son 5 µg/ml durante 6 días. La cepa C3H/JeB no respondió en tanto que la cepa BALB/c sí respondió al estímulo generado por la porina OmpC recombinante y no existió diferencia significativa entre las concentraciones de mezclas de fUSES recombinantes empleadas. Así mismo, se determinó que las mezclas denominadas VIII y XVII son mejor reconocidas por esplenocitos de ratón.

1. INTRODUCCION.

1.1 Salmonella typhi y Fiebre tifoidea.

Salmonella typhi, es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, tribu Salmonellae y especie typhi, Bacilo no esporulado, Gram negativo, móvil, mide de 2 a 3 µm, citofílico, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, y es lactosa y sacarosa negativos. (6,23)

Su estructura antigénica de superficie incluye el antígeno somático "O" que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica y el antígeno "H" o flagelar. En base 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 y 12; sin embargo se diferencia de ellas porque es la única que presenta antígeno "Vi" el cual es de naturaleza sacarídica; sus flagelos contienen el antígeno "d". La fórmula 9,12 Vi:d caracteriza a Salmonella typhi en forma abreviada (12,45). (Figura 1).

Salmonella typhi es el agente causal de la Fiebre Tifoidea, infección que se adquiere por ingestión de alimentos y agua contaminada con la bacteria. Afecta solamente al humano y el eslabón de transmisión es el portador asintomático. Es una enfermedad febril, caracterizada por síntomas sistémicos como fiebre continua, cefalea, dolor abdominal, inflamación del intestino, formación de úlceras

intestinales (principalmente en las Placas de Peyer), hepatomegalia y esplenomegalia (1,45,12).

El período de incubación generalmente es de 10 a 14 días. Se sabe que la patogenicidad de *Salmonella* depende de la capacidad de multiplicación dentro de los macrófagos, los cuales, al morir, liberan la bacteria que entonces es capaz de invadir otras áreas (6,45).

Gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de una endotoxina que entre otros efectos, se ha comprobado que causa fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (26).

Las complicaciones más importantes de la Fiebre Tifoidea incluyen hemorragia intestinal en el 2 al 8% de los casos y la perforación que se presenta en el 3 al 4 % (4).

Los mecanismos de inmunidad celular, fundamentalmente la activación de macrófagos, no constituyen una garantía de protección ante la invasión por *Salmonella*, ya que la bacteria tiene la capacidad de permanecer dentro de éstos protegiéndose así de la respuesta inmune y de los antibióticos (43).

Esta enfermedad constituye un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos industrializados. Se estiman 12 millones de enfermos anuales con una incidencia de 500 por cada 100,000 habitantes en Africa y Asia. En la región de las Américas se presentaron 89,591 casos en 1990, que representan una incidencia de 20.8 por cada 100,000 habitantes. En Mexico se reportaron 11,078 casos en 1990 con una tasa de 13.64 en 100,000 habitantes. El grupo de edad más afectado por la enfermedad es el de 15 a 44 años, donde se

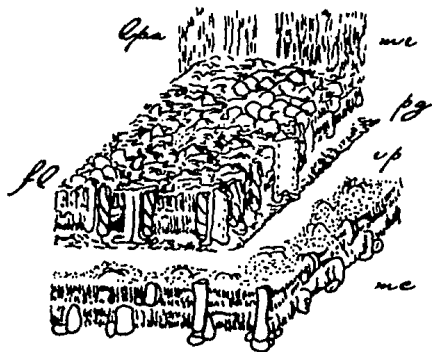


Figura 1. Envoltura celular de las bacterias Gram negativas.

Abreviaturas: FL, fosfolípidos; ME, membrana externa; PG, peptidoglicano; EP, espacio periplásmico; MC, membrana citoplasmática; LPS, lipopolisacárido (13).

presentan 58.62% afectados, lo cual representa más de 500,000 días laborables perdidos (4).

La Fiebre Tifoidea representa un problema de Salud Pública, por lo cual, la investigación en el desarrollo de vacunas constituye un hecho prioritario en México y en otros países (1).

1.2. Antígenos de Salmonella y su Inmunogenicidad

Han sido muchos los intentos por producir una vacuna contra Salmonella typhi. Se han utilizado bacterias completas vivas y muertas, administradas por vía oral, empleándose la cepa dependiente de estreptomycinina y la cepa mutante deficiente de UDP-4-galactosa epimerasa llamada Ty21a, resultando ser, ambas cepas poco inmunogénicas. También, las investigaciones se han encaminado hacia el estudio de la naturaleza de los antígenos de Salmonella typhi relacionados directamente con la protección y la respuesta inmune que generan en el humano. 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", demostrándose, en el caso de los antígenos "O y H" que, aunque inducen la producción de títulos altos de anticuerpos esto no guarda relación alguna con el estado de protección en la evolución de la enfermedad (17,25).

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. El inconveniente de esta vacuna es que por su naturaleza polisacárida, el antígeno protector es T-independiente por lo que no induce memoria. Debido a esto, se ha sugerido conjugarlo químicamente a proteínas para conferirle características de antígenos T-dependiente (1,32).

Recientemente las proteínas de membrana externa (FME) de las bacterias Gram negativas han cobrado gran importancia gracias a la introducción de métodos que permitieron separar la membrana externa de la citoplasmática (44).

Estudiando la estructura y composición de la membrana, se demostró la presencia de cuatro proteínas principales o mayores (porinas) y otro grupo de 10 a 12 proteínas denominadas menores (36).

Posteriormente se reclasificaron a las proteínas mayores en tres grupos, en base a su estructura y función, destacando la lipoproteína de Braun unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana, la proteína modificable por el calor (OmpA) involucrada en los procesos de conjugación y que actúa como receptor para fagos y colicinas y las proteínas matrices o porinas, que intervienen en el transporte pasivo de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular a través de la membrana, tales como: azúcares, iones inorgánicos y aminoácidos (7,10,11,34,53).

Las proteínas menores intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular y están

relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de la membrana externa que tiene actividad de fosfolipasa A (7,10,11,45).

Se han reportado cuatro porinas : OmpF, OmpC, OmpD, y PhoE. Las porinas son trímeros presentes en la membrana. Poseen un peso molecular entre 28 000 y 48 000 daltones. Se encuentran asociadas a la péptidoglicana y al lipopolisacárido de forma no covalente. Se agregan en forma natural formando poros o canales (forma serológicamente activa) (22).

Las porinas son péptidos constituidos de 336 residuos en promedio. En el interior de los poros se encuentran aminoácidos cargados, lo cual, determina la selectividad iónica de los canales (6,22,).

Las porinas permiten la permeabilidad de la membrana, son muy abundantes, forman poros de difusión para solutos pequeños (menores de 400 a 600 Da) y sirven como receptores para fagos y colicinas. OmpC y OmpF son reguladas por la osmolaridad y temperatura del medio de crecimiento. OmpC es expresada preferentemente a alta osmolaridad (100-300 NaCl) mientras que OmpF se expresa a niveles más bajos. PhoE es inducida a bajas concentraciones de fosfatos y presenta selectividad a aniones más que para cationes y se ha propuesto que participa en la captura e introducción de compuestos fosforilados a través de la membrana (Figura 2) (46).

OmpF es catión selectivo y las propiedades de OmpC son similares a las de OmpF con la excepción de que OmpC forma los poros más pequeños de las tres proteínas. Sus respectivos genes han sido aislados y secuenciados (44,51).

El interés en las porinas se debe a su capacidad para estimular tanto la respuesta inmune humoral como la celular provocando un estado de protección contra la infección por Salmonella typhi (29). Existe un interés especial en la porina OmpC, ya que ésta es sintetizada e incorporada en el desarrollo de la bacteria en condiciones de baja y alta osmolaridad (50).

Este resultado sugiere que OmpC puede estar presente en la membrana externa no solo bajo condiciones de vida libre, sino también durante la infección, ya que la osmolaridad del suero humano es equivalente a los estándares altos mantenidos en el laboratorio. Es por esto que la porina OmpC es considerada como un antígeno candidato para el diagnóstico y la vacunación (46).

Debido a la localización de las PME en la superficie de las bacterias Gram negativas, se consideran como antígenos en la inducción de protección.

La inmunización con PME derivadas de bacterias Gram negativas, como Salmonella typhimurium, Haemophilus influenzae, Shigella flexneri y Pseudomona aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae, y Salmonella typhi, confieren protección contra la infección en animales de experimentación (2,8,20,21,29).

Algunos investigadores encontraron que las PME de Neisseria meningitidis grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos (16).

Los anticuerpos anti-PME presentaron actividad bactericida "in vitro" mediada por complemento (16).

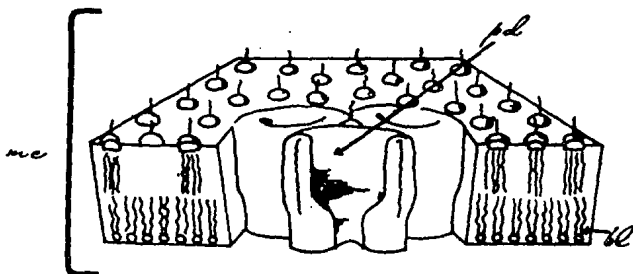


Figura 2. Modelo estructural de la porina PhoE de Escherichia coli.

Abreviaturas: bl, bicapa lipídica; pd, poro de difusión (porina); mc, membrana celular.

Modelo propuesto por Jap en 1959 (31).

También se estudió la capacidad de las PME de Salmonella typhi 9,12 Vi:d, de conferir protección al ratón contra el reto de la bacteria viva. Demostraron que tanto las PME de Salmonella typhi como el suero de conejo anti-PME inducen en el ratón un estado de inmunidad protectora. Además el suero empleado para la protección pasiva, reconoce por inmuno-electrotransferencia a las porinas de las diferentes cepas de Salmonella utilizadas en el estudio (26,27).

La evaluación de la respuesta inmune humoral hacia las PME de Salmonella typhi en pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda y en fase convaleciente mostro que las PME son inmunogénicas en el humano pues se encontraron anticuerpos de clase IgM e IgG, éstos últimos dirigidos contra las porinas (15,47).

La inmunización con cantidades tan pequeñas como 5 µg de porinas de Salmonella typhi, purificadas por el método de Nikaido, confirieron protección al 80% de los ratones desafiados con 500 DL₅₀ de la bacteria homóloga, pero no indujo protección al desafío con Salmonella typhimurium en las mismas condiciones (28,47).

Anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas de S. typhi 9,12, Vi:d confirieron una protección del 60% al desafío con 20 DL₅₀ en ratones. Anticuerpos monoclonales antilipo-polisacárido (LPS) no produjeron ningún efecto; esto corrobora que las porinas son inmunógenos protectores en el modelo murino. La vacunación de ratones con 30 µg de PME de S. typhi indujo respuesta proliferativa "in vitro" de linfocitos, en presencia de porinas de Salmonella typhi,

Salmonella typhimurium, y E. coli. La respuesta proliferativa in vitro de linfocitos de ratones INH inmunizados con PME de Salmonella typhi persistió hasta tres meses después de la inmunización y no se debió a la presencia del LPS. Un fragmento de las porinas derivado de la digestión con BrCN y con un peso aproximado de 16Kd indujo una respuesta proliferativa "in vitro" de esplenocitos totales, provenientes de ratones INH inmunizados con PME de S. typhi 9,12 Vid: (19,58,59).

1.3. Epitopos

Los epitopos o determinantes antigénicos de una proteína son regiones de 10 a 20 aminoácidos reconocidas por las fracciones Fab de un anticuerpo también llamadas paratopos (12,35).

Se han clasificado los epitopos en discontinuos o conformacionales constituidos por residuos de aminoácidos distantes pero adyacentes en una superficie, y los continuos o secuenciales compuestos de residuos cercanos entre si (Figura 3) (5).

Una molécula de antígeno contiene algunos epitopos localizados en una superficie accesible al anticuerpo que puede formar un conjunto de estos que interaccionen y sean capaces de unirse con el paratopo correspondiente lo cual depende de factores genéticos (5).

Los linfocitos T CD8⁺ reconocen el antígeno presentado por las moléculas clase I en asociación a la célula presentadora

de antígeno, en cambio los linfocitos cooperadores o CD4, lo reconocen por la presentación de las moléculas clase II. La longitud de los epitopos presentados por las moléculas clase I está restringida a 8 - 11 aminoácidos. En base a la habilidad que presentan los péptidos para provocar una respuesta proliferativa en linfocitos T activados previamente con la proteína nativa se han clasificado como: inmunodominantes, subdominantes y crípticos (41,42,61,66).

Se han encontrado péptidos que imitan epitopos discontinuos y son llamados mimotopos ya que imitan el epitopo original por lo cual pueden ser reconocidos por el anticuerpo específico correspondiente (30).

1.4. Fagos de Fusión (fUSES).

Gracias a la ingeniería genética, los investigadores de enfermedades infecciosas pueden explotar la habilidad de aislar genes construyendo bancos de epitopos que han facilitado el aislamiento y caracterización de fragmentos proteicos. Para la construcción de dichas librerías se han empleado fagos filamentosos como vectores de clonación.

Los fagos filamentosos, también llamados bacteriófagos, son virus que infectan bacterias poseedoras del factor sexual F⁺. Los bacteriófagos más estudiados son: M13, f1 y fd. Estos fagos se caracterizan por ser filamentos flexibles de estructura larga y delgada, con DNA de cadena sencilla y circular de 6400 nucleótidos y conteniendo en la cápside una estructura proteínica tubular constituida por las proteínas

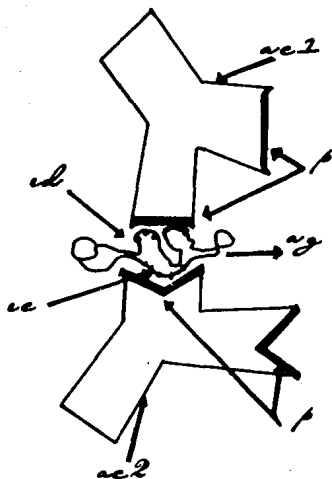


Figura 3. Tipos de epitopos.

La figura muestra en un mismo antígeno a un epitopo continuo y a uno discontinuo, reconocidos por distintos anticuerpos.

Abreviaturas: ac1, anticuerpo uno; ac2, anticuerpo dos; ec, epitopo continuo; ed, epitopo discontinuo; ag, antígeno; p, paratopo (61).

pVII, pIII, pVI, pVIII y pIV. Producen progenie 10 minutos después de la infección bajo condiciones ideales y pueden permanecer como parásitos durante muchas generaciones. Su material genético codifica para 10 genes, 5 de éstos codifican para proteínas estructurales, 3 para proteínas de la síntesis del DNA y 2 para proteínas en el ensamble del virión. Son capaces de reproducirse dentro de la bacteria huésped sin producir lisis o muerte bacteriana (Figura 4) (14,38,51).

En el gene III de fagos filamentosos derivados del fago fd-tet, se creó una deleción con el objeto de introducir un sitio de clonación. Dicho gene codifica una proteína menor de cápside localizada en uno de los extremos del virión, sintetizada con el péptido señal, requerida para la estabilización de la partícula y esencial para el proceso de infección de la bacteria. Contiene dos dominios, el carboxilo-terminal y el amino-terminal con la función de ensamble y proceso de adsorción, respectivamente y que actúan de forma independiente (Figura 5 (a)) (18,10).

Con base a lo anterior, se realizó la inserción de aminoácidos extraños entre los dominios de la secuencia original de la proteína sin abolición de sus funciones. La expresión de la proteína de " fusión " se aprovecho para enriquecer más de mil veces las clonas recombinantes sobre los fagos adquiridos por medio del uso de anticuerpos específicos; esta construcción fue denominada, " fago de fusión " o " fUSES " (57).

La purificación de las clonas recombinantes es realizada por Biopanning, técnica en la cual los anticuerpos específicos



*Bacteriófago
Filamentoso*

Figura 4. Micrografía electronica del fago fd.
Aspecto del Virion (a3).

contra la proteína de fusión, que se expresa en la superficie del fago, son biotinados (mediante una unión biotina-fracción cristalizable Fc), haciéndose reaccionar posteriormente con el antígeno (fUSES recombinantes). Este complejo se hace reaccionar con avidina paneada en caja de petri, que se lava para eluir todos los fagos silvestres (54), obteniéndose así los fagos con inserto que pueden amplificarse y seleccionarse nuevamente obteniéndose un enriquecimiento hasta de 10^6 en el número de partículas con inserto (Figura 5 (b)) (56).

2.5. Banco de epitopos de la porina OmpC.

Se construyó un banco de mimotopos de la miohemeritina empleando el fago de fusión fUSES y utilizando anticuerpos monoclonales específicos para un determinante antigénico definido y se aislaron clones recombinantes mostrando que éstas eran muy semejantes al epitopo natural (56).

El sistema "fago de fusión" ha sido empleado para otras moléculas como la beta endorfina, el virus del sida y Plasmodium falciparum (23).

Debido a que las técnicas de evaluación son más accesibles, la respuesta inmune humoral ha sido más estudiada, aun cuando los linfocitos T juegan un papel importante en la memoria y la regulación inmune y funcionan como células efectoras (39,66).

El desconocimiento de métodos sistemáticos y definitivos para elucidar los componenets protéicos de un agente infeccioso que son reconocidos por células T, limita la

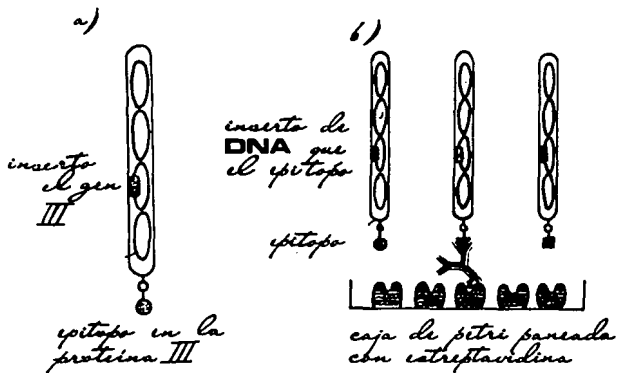


Figura 5. (a) Bacteriofagos Filamentosos desplegando epitopus en la superficie. (b) Biopanning un metodo de purificacion (54).

comprensión de la respuesta inmune a la infección y a la vacunación (60).

Young y cols. descubrieron una técnica que permite la búsqueda de epitopos de células T empleando sondas primarias a partir de una librería genética permitiendo el aislamiento del ADN que codifica el antígeno. Esta técnica fue empleada para buscar epitopos en un banco de Mycobacterium leprae en Sg11 (vector de clonación derivado del fago lamda) con un juego de linfocitos T CD4⁺ de humano aislando un antígeno reconocido por células T pero no por anticuerpos. Emplearon una librería de ADN de M. leprae. Esta construcción se realizó en el fago lamda g11. La librería tenía un título de 2×10^{11} unidades formadoras de placa por mililitro y contenía aproximadamente el 25 % de recombinantes con un promedio en el tamaño del inserto de 2 kb. Muestras de 10^4 células de clones individuales de linfocitos T fueron adicionadas a los pozos de cajas de 96 pozos y estimuladas con concentraciones óptimas de antígeno en presencia de células autólogas adherentes PBMC. Se aislaron fagos recombinantes individualmente para expresarlos en cajas de 96 pozos para combinar antígenos de 12 pozos y formar una mezcla y probar una alícuota de cada mezcla con un grupo de clones diferentes de células T. Esta estrategia está esquematizada en la Figura 6. Placas de fagos recombinantes contenidas en cajas de agar se colocaron individualmente en cajas de 96 pozos (placa 1) para incubarse con buffer y permitir la liberación del fago. Células de E. coli cepa Y1090 se incubaron las alícuotas de los fagos recombinantes en una segunda caja de 96 pozos (placa 2) y las células infectadas se

sembraron en agar blando en cada pozo de una tercera caja (placa 3). Las células infectadas se indujeron a producir antígeno recombinante que al difundir por el medio fue transferido entonces a una cuarta placa (placa 4). Los antígenos de 12 pozos se agruparon en un solo pozo de una quinta placa. Esta placa contenía 96 grupos provenientes de 11 placas y constituyó un total de 1056 antígenos diferentes. Alicuotas de cada uno de los pozos de esta placa se transfirieron a una sexta placa (placa 6) que contenía grupos de 10 clones de linfocitos T, las células presentadoras de antígeno y gentamicina para inhibir el crecimiento bacteriano (60,66).

La presentación de antígeno y el reconocimiento resultaron en la proliferación de linfocitos T que fue detectada visualmente por microscopía y confirmada por la incorporación de timidina tritiada, identificando así las clones de fagos recombinantes reconocidas por células T. (66)

Se realizó la clonación del gen ompC de Salmonella typhi usando métodos de hibridación y mediante el uso de anticuerpos antiporinas, para después caracterizarlo por su secuencia nucleotídica. Se encontró que el gen OmpC de Salmonella typhi está localizado en un fragmento de 3 Kb derivado de la digestión del ADN cromosomal con la enzima de restricción Bgl II; después de los experimentos de clonación y de selección de recombinantes y del análisis electroforético de las PME de Salmonella typhi que se expresaban, se encontró que la proteína OmpC migraba a 38.5 KDal y que se expresaba bajo condiciones de alta y baja osmolaridad (3,48).

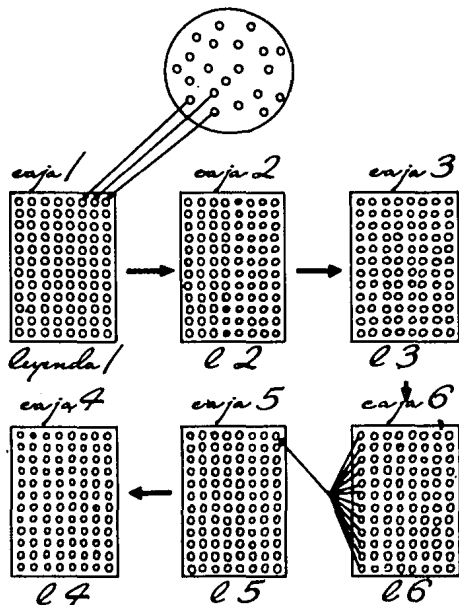


Figura 6. Búsqueda de clonas del fago Sg11 con sondas de células T. (68)

1. Levenda 1. Flacas colocadas en ocosos. Los fagos difunden al buffer.

2. Células de *E. coli* infectadas con los fagos.

3. Células infectadas sembradas en agar blando.

4. Caja maestra que contiene antígenos individuales.

5. Caja maestra que contiene seccias de antígenos.

6. Grupos de 10 clonas de células T.

Carreño, construyó un Banco de Epitopos de la proteína de membrana externa OmpC de Salmonella typhi 9,12 Vi:d, en el fago de fusión "fUSE 2", obteniéndose 1.1×10^5 partículas recombinantes que expresan los determinantes antigénicos de 100 a 170 pb, en la cápside del virión y son reconocidos por anticuerpos policlonales dirigidos específicamente a porinas de Salmonella typhi (9,10,49,51,55).

II. OBJETIVO.

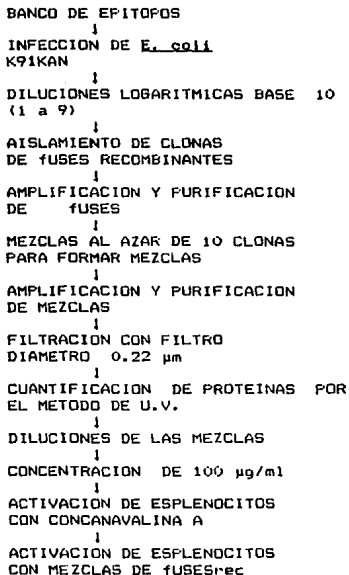
Determinar la mezcla o mezclas de clones de FUSES recombinantes a la porina OmpC de Salmonella typhi que son mejor reconocidas por esplenocitos de ratón inmunizados con OmpC.

III. HIPOTESIS DE TRABAJO.

La inmunogenicidad de mezclas de epitopos de OmpC de Salmonella typhi clonados en FUSE 2 pueden ponerse en evidencia mediante ensayos de proliferación de esplenocitos de ratones inmunes activados con la porina OmpC recombinante.

IV. MATERIAL Y METODOS.

4.1 Diagrama de Flujo.



4.2 Material.

4.2.1. Material Biológico.

INH - Ratones de 2 cepas: BALB/c y C3H/HeJ procedentes del

- Banco de fUSES recombinantes a la porina OmpC de Salmonella. (Propiedad del Centro Médico Nacional Siglo XXI, construido por Carreño, L.A.)

- Porina OmpC recombinante (Propiedad del Centro Médico Nacional, obtenida y purificada a partir de la cepa de E. coli UH 322 por Vázquez, M. A.)

4.2.2. Medio de Cultivo.

- Medio DEM para cultivo de células (Sigma Co.)

4.2.3. Reactivos.

- Concanavalina A (Sigma Co.)

- Timidina tritiada (Amersham International 5 mCi de A.E.)

4.2.4. Equipo.

- Filtros 0.22 μ m (Sartorius)

- Placas de microcultivo de fondo plano (NUNC)

- Cosechador Semiautomático (MiniMashII)

- Contador de Centelleo Líquido (Beckman LS 580)

- Centrifuga (Beckman)

- Espectrofotómetro (Beckman)

- Programa SAS (Cary North Carolina. SAS Institute Inc.)

- Computadora PC (BPM)

4.3. Metodos.

4.3.1. Aislamiento de clones de fUSES recombinantes.

Para el aislamiento de clones de fUSES se colocaron trescientos μ l de Escherichia coli K-91 Kan de una suspensión proveniente de un cultivo de toda la noche (24 hrs, 37°C) en 2 ml de Medio Luria (10g NaCl, 10g Peptona, 5g Levadura para un litro pH 7.2) y posteriormente se adicionaron 5 μ l de fUSES recombinantes (del Banco de epitopos) y se incubó durante 2 hrs, 37°C.

Se realizaron diluciones logarítmicas y se sembró por plateado en Luria Agar (1.3%) incubando 12 hrs. a 37°C.

Cada colonia se transfirió a cajas de Agar Luria suplementado con Kanamicina (Kan) y Tetraciclina (Te), aislandose 170 colonias al azar.

4.3.2. Amplificación y purificación de fUSES recombinantes.

En cajas de 96 pozos de fondo redondo se colcaron 100 μ l de medio Luria (ML) más una clona de Escherichia coli infectada y aislada. Se colocó en un incubador rotatorio (New Brunswick Scientific Co.) agitandose durante 3 hrs a 37°C y 100 rpm. Se adicionaron 100 μ l de ML y 50 μ l de E. coli K-91 Kan de un cultivo de toda la noche y se incubó 12 hrs, 37°C. El contenido de cada uno de los pozos se pasó a tubos ependorff y se les adicionó 1 ml de medio Luria complementado con Kan y Te más 20 μ l de E. coli K-91 Kan sin infectar. Se agitó durante 12 hrs, 37°C a 150 rpm y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm (Sorvall r=10 cm) durante 20 min. Las pastillas obtenidas se mantuvieron a 4°C.

Al sobrenadante se le adicionaron 0.15 partes de Polietilen glicol 6000 (110g PEG, 116.9g NaCl, 500 ml agua) y se homogeneizó por inversión 100 veces. Se congeló durante 4 hrs a -20°C, y después de transcurrido ese tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min 4°C, se eliminó el

sobrenadante y se adiciono 1 ml de Tris - EDTA 1X. Posteriormente se incubo a 70°C durante 30 min, y nuevamente se centrifugo a 8000 rpm durante 6 min. El sobrenadante se recupero en otro tubo al cual se le adicionaron 0.15 partes de PEG/NaCl esteril. Se homogeneizo por inversion 100 veces y se centrifugo a 14 000 rpm durante 30 min a 4°C. Finalmente se resuspendio cada clona de fUSE recombinante en 500 µl de HEPES 10 mM pH 7.8 esteril.

4.3.3. Formación y amplificación de mezclas.

Para la formación de mezclas de fUSES recombinantes de los 500 µl de cada una de las clonas de fUSES se tomaron 100 µl de 10 clonas y se colocaron en un tubo eppendorf, con lo cual se formaron 17 mezclas de 10 clonas cada una, identificándose con números romanos del I al XVII.

La amplificación individual de cada mezcla se realizo colocandose 125 µl de esta en un tubo con 200 µl de un cultivo de toda la noche de E. coli K91 Kan y 20 ml de ML. Se colocaron 2 hrs a 37°C horizontalmente. Posteriormente el contenido de cada tubo se colocó en una botella de cultivo con 400 ml de ML Kan Te, respectivamente agitandose a 37°C durante 48 hrs y 200 rpm. El contenido de cada botella se centrifugo en tubos de polipropileno, siguiéndose el mismo procedimiento que para la amplificación y purificación de clonas de fUSES recombinantes. Las mezclas de fUSES recombinantes asi obtenidos se resuspendieron en 1 ml de HEPES pH 7.4 esteril. Cada una de las mezclas se filtro pasando por filtros Sartorius 0.22 µm.

4.3.4. Cuantificación de proteínas.

Después de la filtracion se cuantificó la cantidad de proteina mediante el metodo de absorción en ultravioleta a 280 y 260 nm y se calculó la concentración de proteina, de acuerdo con el método de Warburg y Christian por medio de la siguiente fórmula:

Concentración de proteína (mg/ml) = $F \times l/d \times D.O.$ (230)
donde d es el ancho de la cubeta en centímetros factor determinado por mezclas de ácidos nucleicos y la proteína enolasa de la levadura en diferentes proporciones. (59).

4.3.5. Porina OmpC recombinante.

Fue donada por la Q.F.B. Ana Laura Vazquez Martinez quien la obtuvo a partir de la cepa de *E. coli* UM322, a la cual se le insertó por Ingeniería Genética el gen de OmpC de *Salmonella typhi* (63). Dicha cepa es mutante para sus propias porinas. La porina fue obtenida por el Método de Nikaido y purificada por cromatografía en columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 (45, 3).

4.3.6. Animales de experimentación.

Se emplearon ratones machos de 21 días de nacidos de las cepas singénicas C3H/HeJ y BALB/c, proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene.

4.3.7. Obtención y cultivo de esplenocitos.

Se obtuvieron los bazos de los ratones inmunes y testigos en condiciones de esterilidad, y se depositaron en caja de petri que contenía 9 ml de solución de DEM.

Dentro de una campana de flujo laminar, se disgregaron los tejidos haciéndolos pasar por una malla de tela de Organdi, se lavó tres veces con solución de DEM, centrifugando a 1200 rpm durante 10 min (Sorvall $r=10$ cm), en la segunda lavada se agregaron 2 ml de una solución de cloruro de amonio 0.16 M (90ml) y tris-HCl 0.17M (10ml) pH 7.65 para lisar eritrocitos; finalmente se resuspendió el sedimento celular en medio DEM complementado con Gentamicina 10µg/ml, 2 beta-mercapto-etanol 5×10^{-5} M, L-Glutamina 2mM, Penicilina 200 µ/ml y SFB 10%. Se contó el número de células viables en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripano.

4.3.8. Ensayo de activación "in vitro" con concanavalina A.

Los esplenocitos se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml, se cultivaron 200,000 células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo plano (NUNC) y se agregaron concentraciones crecientes de Concanavalina A: 0, 2.5, 5.0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Co.) en DEM suplementada con 10% de SFB.

Cada ensayo se repitió por triplicado y en cada ensayo el número de repeticiones fué de 10.

4.3.9. Ensayo de activación antígeno-específico.

Se cultivaron 200,000 células por pozo, en placas de microcultivo de 96 pozos (NUNC) de fondo plano, en un volumen de 200 μl de medio DEM suplementado con 10% de SFB a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 durante 4 días y utilizando como antígenos mezclas de FUSES recombinantes.

Cada experimento (5 experimentos) se realizó con 4 lotes de cajas, en donde 2 lotes se destinaron para probar los antígenos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y los otros dos para probar los antígenos en una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. De los dos lotes empleados para cada concentración uno de ellos contenía las células del ratón inmunizado y el otro las células del ratón control. Como testigo de activación se usó Concanavalina A a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ determinada como la óptima en base a resultados obtenidos. En las últimas 18 hrs del cultivo se agregó 1 μCi de timidina tritiada $^3\text{HTDr}$ (Amersham International 5 μCi de actividad específica). Finalmente se utilizó un cosechador semiautomático (MiniMash II) y la incorporación de timidina se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 580). Todas las mezclas se probaron por quintuplicado.

ESQUEMA DE INMUNIZACION

RATONES	ANTIGENO	DIA	DOSIS	V.A.
2 C3H/HeJ	OmpC (HEPES)	0	0.2 ml de una sol. de 0.25µg/µl	I.P.
2 C3H/HeJ	HEPES	0	0.2 ml	I.P.
		7	Obtención del bazo	
2 BALB/c	OmpC (HEPES)	0	0.2 ml de una sol. de 0.25µg/µl	I.P.
2 BALB/c	HEPES	0	0.2 ml	I.P.
		7	Obtención del bazo	

Nota. Por cada experimento.

4.4. Análisis Estadístico de Resultados.

4.4.1. Ensayo de activación con Concanavalina A.

Los resultados de este ensayo expresados en cuentas por minuto (c.p.m.) fueron analizados mediante la Prueba de ANDEVA (Análisis De Varianza) con un modelo de bloques al azar y las diferencias entre medias por tratamiento se analizaron por medio de la Prueba de Tukey (38).

4.4.2. Ensayos de Proliferación Antígeno - Especifico.

Con los resultados obtenidos en c.p.m. de este experimento se procedió a calcular los Coeficientes de Estimulación (C.D.E.) determinados por la división del Índice de Estimulación del ratón Inmune (I.E.₁) entre el Índice de Estimulación del ratón Control (I.E._c) en base a las siguientes fórmulas (27):

$$I.E._1 = \frac{\text{c.p.m. del inmune con antígeno}}{\text{c.p.m. del inmune sin antígeno}}$$

$$I.E._c = \frac{\text{c.p.m. del control con antígeno}}{\text{c.p.m. del control sin antígeno}}$$

con lo cual el Coeficiente de Estimulación resulta ser:

$$C.D.E. = \frac{\text{Índice de Estimulación del Inmune}}{\text{Índice de Estimulación del Control}}$$

Posteriormente, los C.D.E. se analizaron mediante la Prueba de ANDEVA con el modelo factorial 2X2X17 y las diferencias entre medias fueron analizadas mediante la Prueba de Tukey (38).

Para el análisis de ambos ensayos se empleó el Programa SAS (Statistic Analysis System, SAS Institute Cary North Carolina) para computadoras PC.

V. RESULTADOS.

Los resultados del este trabajo se presentan en dos partes. La primera titulada "Ensayo de proliferación con concanavalina A" y corresponde a la Tabla 1 y a las Figuras 7 y 8. En la Tabla 1 se muestran los días de cultivo, la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de Con A, así como la media y su desviación estándar, para cada tratamiento expresada en c.p.m. Las Figuras 7 y 8 muestran el efecto de los días de cultivo y la concentración de concanavalina A, respectivamente ambas expresadas en c.p.m..

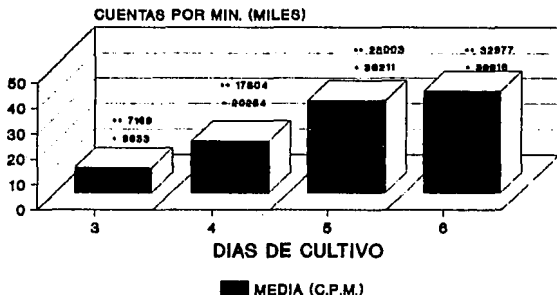
La segunda parte llamada "Ensayo de proliferación con fUSES recombinantes", se muestra en la Tabla 2 y las Figuras 9 y 10. La Tabla 2 contiene las dos cepas de ratones empleados en este experimento, las dos concentraciones de antígeno en $\mu\text{g/ml}$ y las 17 mezclas de fUSES con sus respectivas medias y desviaciones estándar. Las Figuras 9 y 10 muestran los coeficientes de estimulación promedios obtenidos por cepa de ratón, en la primera, y el efecto de la concentración de mezclas de fUSES recombinantes en la segunda.

TABLA 1
ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL
ENSAYO DE PROLIFERACION CON
CONCAVALINA

DIAS DE CULTIVO		CON A (µg/ml)		MEDIA (c.p.m)		D.E.
3.0	c	0.0	d	532.9	d	368.9
3.0	c	2.5	b	10556.1	c	9213.5
3.0	c	5.0	a	25128.4	b	18975.2
3.0	c	10.0	c	15469.8	c	12131.1
3.0	c	20.0	d	5086.2	c	3593.7
3.0	c	30.0	d	1028.3	d	733.1
4.0	b	0.0	d	4274.7	d	11366.8
4.0	b	2.5	b	35590.7	c	29691.6
4.0	b	5.0	a	51582.6	b	40173.5
4.0	b	10.0	c	24752.8	c	21436.7
4.0	b	20.0	d	4724.2	c	3685.5
4.0	b	30.0	d	601.3	d	472.0
5.0	a	0.0	d	1062.1	d	867.4
5.0	a	2.5	b	60518.7	c	50907.3
5.0	a	5.0	a	112021.8	a	80819.7
5.0	a	10.0	c	39049.4	c	31289.9
5.0	a	20.0	d	3991.2	c	3752.4
5.0	a	30.0	d	625.2	d	583.2
6.0	a	0.0	d	1027.8	d	1365.1
6.0	a	2.5	b	61490.4	c	48872.7
6.0	a	5.0	a	122938.0	a	95441.8
6.0	a	10.0	c	50520.5	c	49139.8
6.0	a	20.0	d	2970.7	c	2636.6
6.0	a	30.0	d	518.6	d	411.4

Del bazo de ratones NIH se cultivaron 200 mil células por pozo adicionándose concentraciones de concanavalina A de: 0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, y 30.0 µg/ml. Los cultivos se interrumpieron los días 3, 4, 5 y 6. Se agregó 18 hrs antes 1 µCi de ³H-TdR por pozo. La incorporación de timidina se determinó con un contador de centelleo líquido. El estudio se realizó por triplicado y en cada ensayo se recibieron diez veces cada una de las concentraciones (30 repeticiones por tratamiento). Los resultados expresados en c.p.m. son derivados del análisis estadístico con un modelo de bloques al azar. Las letras minúsculas a la derecha de cada columna indican que existe diferencia significativa entre medias a $p < 0.05$ con la prueba de Tukey.

FIGURA 7
ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS CON CON A
EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION

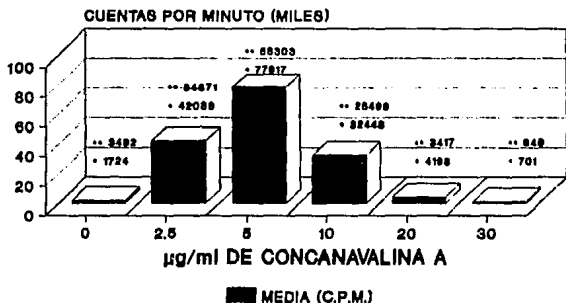


CON A = CONCANAVALLINA A

De ratones INH machos de 21 días se obtuvieron células de bazo y se cultivaron 100 mil células por pozo adicionando concentraciones de concanavalina A de 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 y 30.0 $\mu\text{g/ml}$ con un volumen final de 200 μl de medio DMEM suplementado. Los cultivos se suspendieron el día 3, 4, 5, y el 16 hrs antes se agregó 1 μCi de $^3\text{H}\text{TdR}$ por pozo. La incorporación de material radiactivo se midió en un contador de centelleo líquido. Los valores con los que se construyó esta gráfica son la suma de las medias divididas entre seis (número de concentraciones) para cada día de incubación (Tabla IV). Los valores con un asterisco (*) son las medias aritméticas y los valores con dos (***) son las desviaciones estándar.

FIGURA 8

ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS CON CON A EFECTO DE LA CONCENTRACION



CON A - CONCANAVALINA A

LOS VALORES CON LOS QUE SE CONSTRUJO ESTA FIGURA SE TOMARON DE LA TABLA I Y SON LA SUMA DE LAS MEDIAS DIVIDIDAS ENTRE CUATRO (NUMERO DE DIAS DE INCUBACION) PARA CADA CONCENTRACION DE CONCANAVALINA A. LOS VALORES CON UN ASTERISCO (*) SON LAS MEDIAS ARITMETICAS Y LOS VALORES CON DOS (**), SON LAS DESVIACIONES ESTANDAR.

TABLA 2
ESTADISTICAS DESCRIPTIVAS DEL
ENSAYO DE PROLIFERACION
ANTIGENO-ESPECIFICO
CON ESPLENOCITOS DE RATON DE
LA CEPA BALB/c y C3H/JeB

CEPA	Ag [$\mu\text{g/ml}$]	MEZCLA	MEDIA (C.D.E)	D.E.				
BALBC	a	10.00	a	I	b	0.847	b	0.212
BALBC	a	10.00	a	II	b	1.266	b	0.282
BALBC	a	10.00	a	III	b	0.941	b	0.264
BALBC	a	10.00	a	IV	b	0.964	b	0.147
BALBC	a	10.00	a	V	b	1.442	b	0.248
BALBC	a	10.00	a	VI	b	1.166	b	0.137
BALBC	a	10.00	a	VII	b	1.419	b	0.204
BALBC	a	10.00	a	VIII	b	1.346	b	0.223
BALBC	a	10.00	a	IX	b	1.088	b	0.134
BALBC	a	10.00	a	X	b	1.458	b	0.144
BALBC	a	10.00	a	XI	b	1.270	b	0.242
BALBC	a	10.00	a	XII	b	1.448	b	0.171
BALBC	a	10.00	a	XIII	b	1.270	b	0.110
BALBC	a	10.00	a	XIV	b	1.886	b	0.174
BALBC	a	10.00	a	XV	b	1.240	b	0.176
BALBC	a	10.00	a	XVI	b	1.886	b	0.234
BALBC	a	10.00	a	XVII	a	2.117	a	0.265
BALBC	a	5.00	a	I	b	0.945	b	0.199
BALBC	a	5.00	a	II	b	0.750	b	0.192
BALBC	a	5.00	a	III	b	0.928	b	0.220
BALBC	a	5.00	a	IV	b	0.807	b	0.206
BALBC	a	5.00	a	V	b	1.043	b	0.225
BALBC	a	5.00	a	VI	b	0.705	b	0.166
BALBC	a	5.00	a	VII	b	1.065	b	0.224
BALBC	a	5.00	a	VIII	a	15.014	a	4.270
BALBC	a	5.00	a	IX	b	0.972	b	0.241
BALBC	a	5.00	a	X	b	0.832	b	0.066
BALBC	a	5.00	a	XI	b	1.028	b	0.286
BALBC	a	5.00	a	XII	b	0.832	b	0.149
BALBC	a	5.00	a	XIII	b	0.674	b	0.128
BALBC	a	5.00	a	XIV	b	0.833	b	0.235
BALBC	a	5.00	a	XV	b	0.872	b	0.167
BALBC	a	5.00	a	XVI	b	1.307	b	0.388
BALBC	a	5.00	a	XVII	b	1.857	b	1.039

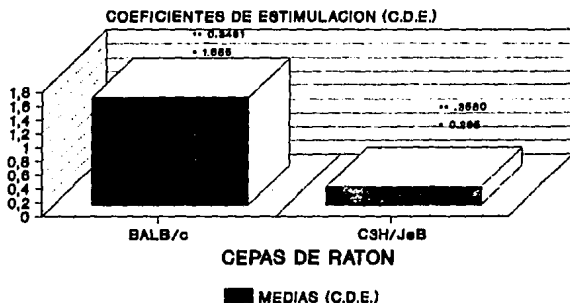
TABLA 2 (Continuacion)

CEPA	Ag [$\mu\text{g/ml}$]		MEZCLA		MEDIA (C.D.E)		D.E.	
C3H	b	10.00	a	I	b	0.032	b	0.010
C3H	b	10.00	a	II	b	0.330	b	0.249
C3H	b	10.00	a	III	b	0.026	b	0.013
C3H	b	10.00	a	IV	b	0.036	b	0.019
C3H	b	10.00	a	V	b	0.031	b	0.006
C3H	b	10.00	a	VI	b	0.024	b	0.005
C3H	b	10.00	a	VII	b	0.028	b	0.012
C3H	b	10.00	a	VIII	b	0.022	b	0.007
C3H	b	10.00	a	IX	b	0.047	b	0.018
C3H	b	10.00	a	X	b	0.025	b	0.010
C3H	b	10.00	a	XI	b	0.027	b	0.008
C3H	b	10.00	a	XII	b	0.025	b	0.009
C3H	b	10.00	a	XIII	b	0.023	b	0.005
C3H	b	10.00	a	XIV	b	0.033	b	0.009
C3H	b	10.00	a	XV	b	0.031	b	0.007
C3H	b	10.00	a	XVI	b	0.042	b	0.051
C3H	b	10.00	a	XVII	b	6.573	b	9.375
C3H	b	5.00	a	I	b	0.163	b	0.058
C3H	b	5.00	a	II	b	0.746	b	0.215
C3H	b	5.00	a	III	b	0.065	b	0.022
C3H	b	5.00	a	IV	b	0.094	b	0.019
C3H	b	5.00	a	V	b	0.044	b	0.014
C3H	b	5.00	a	VI	b	0.056	b	0.006
C3H	b	5.00	a	VII	b	0.046	b	0.009
C3H	b	5.00	a	VIII	b	0.056	b	0.006
C3H	b	5.00	a	IX	b	0.038	b	0.011
C3H	b	5.00	a	X	b	0.048	b	0.018
C3H	b	5.00	a	XI	b	0.037	b	0.007
C3H	b	5.00	a	XII	b	0.069	b	0.032
C3H	b	5.00	a	XIII	b	0.029	b	0.020
C3H	b	5.00	a	XIV	b	0.072	b	0.015
C3H	b	5.00	a	XV	b	0.062	b	0.014
C3H	b	5.00	a	XVI	b	0.017	b	0.004
C3H	b	5.00	a	XVII	b	1.031	b	1.892

Los ratones de la cepa BALB/c y C3H/JeB se inmunizaron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de la porina OoC rec via intraperitoneal. Siete dias despues se obtuvo el bazo y se cultivaron 200 μml células por oco en cajas de 96 pozos fondo plano. Se adicionaron las mezclas de FUSE5 rec en 2 concentraciones 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos se interrumpieron el quinto dia agregandose 1 μCi de $^{3}\text{H-TdR}$ 18 horas antes. La incorporacion de material radiactivo se determino con un contador de centelleo liquido. Los ratones control se inocularon con 50 μl de adyuvante MFES (solvente de porina y de las mezclas de FUSE5 rec). Se calcularon los C.D.E. y se realizo el analisis estadistico mediante la prueba de ANOVA bajo un modelo factorial CA2417 y las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Tuley. Las letras minusculas a la derecha de cada columna indican que existe diferencia significativa a $p < 0.05$.

FIGURA 9

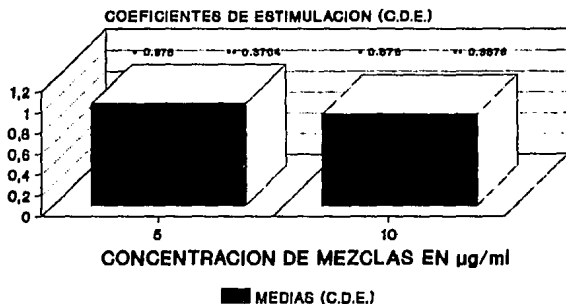
ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS DE BALB/c Y C3H/JeB CON MEZCLAS DE fUSES rec



Inmunización con 50µg/ml de OmpC rec

Los promedios elegidos para la construcción de las barras de BALB/c y C3H/JeB se obtuvieron de la Tabla 2 mediante la suma de las medias de los C.D.E. dividida entre 34 (17 mezclas en dos concentraciones para cada cepa de ratón respectivamente). Las medias aritméticas se indican con un asterisco (*) y las desviaciones estándar con dos (**).

FIGURA 10
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LAS
MEZCLAS DE FUSES rec



Inmunización con 80µg/ml de OmpC rec

Los procedimientos seguidos para la construcción de las barras de 5 µg/ml y 10 µg/ml de esta figura son contenidos de la tabla 2 y son el resultado de la suma de las medias correspondientes a cada concentración de mezclas de fuses en ambas cecas y divididas entre 24 (17 valores de la ceca b/a,b,c y 7 valores de la ceca C/D/Je) respectivamente. Las medias aritméticas se indican mediante un asterisco (*) y las desviaciones estándar con dos (**).

VI. DISCUSION.

6.1. Ensayo de Activación con Concanavalina A.

Cuando un antígeno es introducido a un organismo este produce una respuesta contra dicho antígeno. Esta respuesta implica la activación de linfocitos que reconocen específicamente al antígeno sufriendo una transformación a linfoblastos y una posterior proliferación de los mismos que puede observarse por microscopía o midiendo la incorporación de análogos radiactivos del ácido nucleico, en el nuevo DNA sintetizado (27).

El grado de estimulación de los linfocitos depende del tipo de antígeno por lo que en la realización de un ensayo de proliferación se requiere contar con un control positivo, es decir, una sustancia que induzca la proliferación de los linfocitos, independientemente de la existencia o no de sensibilización previa. Las sustancias que cumplen con dicha condición, son las lectinas denominadas fitomitoógenos. Estas tienen la habilidad de inducir la mitosis de manera similar a un antígeno, uniéndose a un receptor de superficie y transmitiendo una señal que causa que el núcleo sea derreprimido y el linfocito entre en el ciclo celular. Además los mitoógenos, a diferencias de los antígenos estimulan una basta proporción de linfocitos y la estimulación de dichos linfocitos "in vitro" por mitoógenos muestra una correlación aproximada con la producida por antígenos (27).

En cualquier experimento es necesario contar con un

control positivo. Para el ensayo de activación antígeno-específico se empleó concaavalina A, un mitogeno inespecífico, como control positivo de proliferación.

Para determinar el tiempo de incubación y concentración de concaavalina necesarias para inducir la máxima proliferación de esplenocitos se realizo el ensayo de activación bajo las condiciones descritas en la sección de métodos.

Puede observarse en función del análisis estadístico empleado que existió diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey) en los días de cultivo, siendo los días 5 y 6 los mejores con un promedio de 36 211 y 39 916 c.p.m respectivamente y que puede verse en la Figura 7.

Respecto a las concentraciones de concaavalina empleadas los resultados obtenidos de este ensayo sugieren que la de 5 $\mu\text{g/ml}$ resulta ser la mejor obteniéndose un promedio de 77 917, valor medio significativamente superior ($p < 0.05$, Tukey) a los otros valores obtenidos para cada concentración de concaavalina A. Ver Figura 8.

En la tercera columna de la Tabla 1 se muestran los promedios obtenidos en c.p.m. considerando los días de cultivo y la concentración de concaavalina, estos concuerdan con lo ya descrito anteriormente en que el día seis de cultivo y la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ mostraron los valores medios más altos, 122 938 y 112 020 respectivamente, valores que resultan ser significativamente diferentes ($p < 0.05$) respecto a las otras medias obtenidas en este ensayo.

Es importante observar que la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de

concanavalina A inducía la mayor proliferación en cualquiera de los días de cultivo, lo cual constituyó la base para emplear dicha concentración con cuatro días de cultivo debido a que las células activadas con FUSES recombinantes empezaban a morir a partir del cuarto día.

En lo que se refiere a las otras concentraciones de concanavalina A empleada se puede observar en la Figura 8 que a partir de 5 $\mu\text{g/ml}$ conforme aumenta la concentración del mitógeno disminuye la incorporación de timidina tritiada, tal que a 30 $\mu\text{g/ml}$ la incorporación fué mucho menor que a 0 $\mu\text{g/ml}$ lo cual sugiere un efecto citotóxico de la concanavalina, datos que coinciden con lo reportado por Saxena en 1988 (52).

Por otro lado si dividimos las desviaciones estándar entre sus respectivas medias aritméticas, de la Tabla 1, y lo multiplicamos por 100, obtenemos una medida estadística llamada coeficiente de variación, que expresa la variabilidad en porcentaje, de las cuentas por minuto reportadas en dicha Tabla. Así los coeficientes de variación de este ensayo presentaron un rango de 74.4% a 82.6%, valores elevados que sin embargo no distan mucho de los resultados obtenidos por Gonzalez en 1991 en sus ensayos de estimulación de esplenocitos con concanavalina A en los que sus coeficientes de variación van desde 28% hasta 122.7% en algunos de sus resultados (19).

Esta alta variabilidad tal vez pudiera atribuirse, en estos experimentos muy en particular, a la cosecha de las células ya que el cosechador, con dos hileras de doce capilares cada una, siempre presentó obstrucciones en

cualquiera de ellos.

A pesar de todo cuando se calcula el coeficiente de variación para cada uno de los bloques (día de cultivo con sus correspondientes concentraciones) se determina que no hay diferencia significativa entre estos por lo que es posible afirmar en base a estos cálculos, que los resultados aún con su elevada variabilidad son confiables.

6.2. Ensayo de Activación Antígeno-Específico.

Las mezclas de diez clonas de fagos recombinantes provenientes de un banco genómico de la porina OmpC recombinante de Salmonella typhi fueron probados por su capacidad de estimular una respuesta proliferativa de esplenocitos obtenidos de ratones de la cepa BALB/c y la cepa C3H/HeJ sensibilizados siete días antes con la porina OmpC recombinante.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de este ensayo.

La cepa BALB/c presentó una mayor respuesta proliferativa ($p < 0.05$, Tukey) con un promedio de 1.555 de C.D.E. respecto a la cepa C3H/HeJ de tan sólo 0.295. Ver Figura 9.

Este resultado concuerda con los experimentos realizados para el estudio de la porina recombinante donde se había determinado la cepa BALB/c como la mejor respondedora y con los experimentos realizados en 1988, para demostrar la antigenicidad y mapear epítopos de Plasmodium falciparum expresados en fagos filamentosos, donde se demostró que la

inmunogenicidad de los fagos recombinantes esta genéticamente controlada por el sistema H-2 (23,62,63).

Estos resultados no se contraponen con los obtenidos por Mejía en 1990, quien determinó que la cepa singénica mejor respondedora a porinas de Salmonella typhi es C3H, ya que en ese estudio se trabajó con una mezcla de porinas de la cual OmpC formaba parte, por lo que el efecto de ésta pudo estar enmascarado.

Las concentraciones de mezclas de fUSES en $\mu\text{g/ml}$ no presentarán diferencias significativas (Ver Figura 10), y aunque en la determinación de la concentración de las mezclas de fUSES recombinantes se cometió un error sistemático, ya que se utilizaron coeficientes de extinción de una proteína de levadura, que obviamente dista mucho en secuencia de un fago filamentoso. Sin embargo, como error sistemático, no afecta los resultados aunque las concentraciones que se emplearon como 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ no son las reales.

Vale la pena comentar que en un inicio se utilizaron concentraciones de 100 ng/ml de mezclas de fUSES recombinantes (datos no reportados) y que esta concentración también indujo respuestas proliferativas significativas, sin embargo en el intento de probar si concentraciones mayores producían efectos contrarios o mayores se aumentó la concentración probándose 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/ml}$ aunque 2.5 sólo para la cepa C3H y 20 sólo para la cepa BALB/c por lo que estos resultados no pudieron ser comparados estadísticamente.

De las 17 mezclas probadas, las denominadas VIII y XVII indujeron una mayor respuesta proliferativa con valores

promedios de los C.D.E. de 15.014 +/- 4.27 para la mezcla VIII y concentración 5 ug/ml en la cepa BALB/c y de 2.117 +/- 0.265 para la mezcla XVII con 10 ug/ml en la misma cepa.

Cabe mencionar que la respuesta proliferativa de las mezclas VIII y XVII, por el tipo de componentes, podrían denotar un efecto de interacción respecto a las concentraciones de fUSES empleadas. Ver Tabla 2

Por otro lado, en lo que se refiere al cultivo de esplenocitos aunque estos cultivos contienen células B y células T sensibilizadas, la proliferación de las células B es dependiente de las células T sensibilizadas lo cual no constituye una desventaja (39).

El número de ratones empleados en el experimento tampoco constituye una desventaja, si consideramos que al obtener el bazo y triturarlo las células salen de su entorno original con el cual mantenían una comunicación íntima que se tiene que reestablecer cuando son colocadas en cada uno de los pozos además de adaptarse al restringido espacio y al contacto con otras células con las que no lo estaban, a las condiciones del cultivo, específicamente a los nutrientes, temperatura y humedad por lo que cada uno de los pozos con sus 200 000 células constituye una alternativa diferente a las otras que responderá al estímulo en forma diferente, pero que presentarán una menor variabilidad, lo que se observa en los coeficientes de variación estando en un rango aceptable para las dos mezclas siendo 28.44% para la mezcla VIII y de 12.5% para la mezcla XVII con lo que se confirma que los resultados obtenidos de este ensayo son confiables.

Por otra parte la desviación estandar para la cepa de raton C3H (ver Figura 9) es muy alta debido a un dato de los 34 promedios obtenidos (ver Tabla 2) que fue resultado probablemente de colocación equivocada de uno de los circulos de papel filtro de concanavalina A para su posterior conteo en liquido de centelleo, siendo casuístico en que coincida con una de las mezclas que presentaron mayor reconocimiento (mezcla XVII) para la cepa BALB/c.

VII. CONCLUSIONES.

- Se determinó que la concentración de concanavalina A que induce una mayor proliferación de esplenocitos de ratón es de 5 µg/ml en el sexto día de cultivo.

- Se determinó que las mezclas de FUSES recombinantes a la porina OmpC de Salmonella typhi mejor reconocidas por esplenocitos de ratón inmunizados con la porina OmpC recombinante son las denominadas VIII y XVII.

- La cepa que reconoce mejor epitopos de la porina OmpC recombinante de Salmonella typhi es la cepa BALB/c.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Acharya, I.L.; Lowe, C.L.; Thapa, R.; Gurubacharya, V.L. (1987). Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of Salmonella typhi. A preliminar report. N. Engl.J.Med. 317:1101-1104.
2. Adamus, G.; Mulcazka, M.; Withkowska, D. & Romanowska, E. (1980). Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of Shigella sp. Infect. Immun. 30:321-324.
3. Cabello, F.; Fernández, M.; Aron, L.; Mora, G. (1987). "Cloning, expression and characterization of 36 KDal Salmonella typhi porin gene in Escherichia coli". Microbial Pathogenesis". 3:399-407.
4. Anuario Estadístico (1987). Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S.
5. Benjamin, D.; Berzofsky C.; East, J.; Gordon, F. (1984). The antigenic structure of proteins Annu. Rev. Immunol. 2:67-101.
6. Brass, M.J. (1986). The cell envelope of Gram-negative bacteria:new aspects of its functions in transport and chemotaxis. Curr.Top. Microbiol. Immunol. 129:1-16.
7. Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from outer membrane of E. coli. Biochem. Biophys. Acta. 415:335-337.
8. Buchanan, T. M. & 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.

9. Carreño, L. A. (1992). " Obtención de un Banco de Epitopos de la Proteína de Membrana Externa OmpC de Salmonella typhi 9,12 Vi: d en el Fago de Fusión fUSE 2 por Medio de Técnicas de DNA Recombinante". Tesis de Licenciatura. Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. Cuautitlan Izcalli, Edo. de México. pp. 15-45, 108.
10. Crissman, J.; Smith, G. (1984). "Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis". *Virology*. 132:445-455.
11. Datta, D.; Arden, B. & Henning, U. (1977). Major protein of the E. coli outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J. Bacteriol.* 128:821-829.
12. Davies, B.D.; Dulbeco, R.; Eisen, H.M. (1983). Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. 2a. Edición. Barcelona, España. pp. 797-801
13. Di Rienzo, J.; Nakamura, K. (1987). The outer membrane proteins of gram negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 47:481-532.
14. Dwnhart, D. (1975). "The single stranded DNA phages". *Crit. Rev. Microbiol.* 4:161-223.
15. Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 8:874-879
16. Frasch, C.E., & Robbins, J.D. (1978). Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. *J. Exp. Med.* 147: 629-644

17. Germanier, R. 1986. The live oral typhoid vaccine Ty21a: Recent field trial results. Sclavo International Conference on Bacterial vaccines and local Immunity. Siena, Italy. pp. 10-12.
18. Goldsmith, M.; Konigsberg, W. (1977). "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus". *Biochemistry*. 16:2686-2694.
19. González, C.; Isibasi, A.; Ortiz, V.; Blanco, F.; Moreno, J. & Kumate, J. (1989). Cell mediated immune response to porins from Salmonella typhi in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA. p. 664.
20. Guilleland, H.E.; Parker, M.G.; Matthew, J.W. & Berg, R.D. (1984). Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of Pseudomonas aeruginosa as a protective vaccinee in mice. *Infect. Immun.* 44:49-54
21. Guling, P. A.; McCracken, G. H.; Frich, C. F.; Johnston, K.H. & Hansen, E.J. (1982). Antibody response on infants to cell surface exposed outer membrane proteins of Haemophilus influenzae type b after systemic haemophilus disease. *Infect. Immun.* 37:82-88
22. Hancock, R. (1987). Role of porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* 169:929-933.
23. Hoffman, S.; Wistar, R.; Ballow, W.; Hollingdale, M.; Wirtz, R.; Schneider, I.; Marwoto, H; Hockmeyer, W. (1986). "Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum". *New Engl. J. Med.* 315:601-606.

24. Hormaeche, C.E. and Harington, K.A. (1985). Natural resistance to Salmonellae in mice: Control by genes within the mayor histocompatibility complex. J. Infect Dis. 152:1050-1056.
25. Hornick, R.B.; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; Dupont, H.L.; Drawings, A. T. and Sayder, W. (1970). "Typhoid fever: pathogenesis and immunological control". N. Engl. J. Med. 283:686-691.
26. Huckstep, R. L. (1983). Typhoid fever and other Salmonella infections. Ed. Livingston, Ltd., London. pp. 4-9.
27. Hudson, L. (1989). Practical Immunology. Ed. Blackwell Scientific Publications. 3a. Edición Great Britain, pp. 255.
28. Isibasi, A.; Calva, E.; Ortiz, V; Fernández, M.; Hernández, A.; Kumate, J. (1985). "Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa". Simposio Avances en el uso de vacunas 1885-1985. pp. 109-115.
29. Isibasi, A.; Ortiz, V. M.; Paniagua, J.; González, C.; Moreno, J. and Kumate, J. (1988). Protección against Salmonella typhi infection in mice after immunization with outer membrane proteins from Salmonella typhi 9, 12, d, Vi. Infect. Immun. 56:2953-2959.
30. Jahning, F. (1990). Structure predictions of membrane proteins are not that bad. TIBS 15:93-95
31. Jap, B.K. (1989). Molecular design of PhoE porin and its funtional consequences. J. Mol. Biol. 205:407-419.

32. Klugman, K. P.; Koornhof, H. J.; Gilbertson, I. T. (1987). Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 11:1165-1169.
33. Koneman, E.; S. Allen, V. Dowell, H. Sommers. (1985). *Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.*
34. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
35. Laver, G.W.; Air, G.M.; Webster, R.G. & Smith-Gill, S.J. (1990). Epiotopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* 61:553-556.
36. Lee, D. C.; Schanaitman, A. (1979). "Chemical heterogeneity of mayor outer membrane pore proteins of Escherichia coli". *J. Bacteriol.* 138:861-870.
37. Little, M. T. (1983). *Métodos Estadísticos para la Investigación en Agricultura. Ed. Trillas, México. pp. 49-50.*
38. Marvin, D.; B. Hohn. (1969). "Filamentous bacterial viruses". *Bacteriol Rev.* 33:172-209.
39. Male, D.; Champion, B.; Cooke, A. (1991). *Advanced Immunology. Ed. Gower Medical Publishing. 2a. Edición. London New York, pp. 9.2, 9.11, 9.12, 9.15.*
40. Mejia, M.V. (1990). Susceptibilidad de cepas singénicas murinas a porinas de Salmonella typhi 9,12, Vi:d. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. México

41. Milich, D. R. (1989). Synthetic T and B cell recognition sites: Implications for vaccine development. *Adv. Immunol.* 45:195-282.
42. Misfeldt, M., Johnson, W. (1978). "Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from Salmonella typhimurium". *Infect. Immun.* 24: 808-816.
43. Miura, T. and Mizushimas, S. (1968). Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of Escherichia coli K12. *Biochem. Biophys. Acta.* 150:159-161
44. Mizuno, T.; Chou, M. Y. and Inouye, M. (1983). A comparative study on the genes for three porins of the Escherichia coli outer membrane. *J. Biol. Chem.* 258: 6982-6940.
45. Nikaido, H. and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrana permeability. *Microbial. Rev.* 48:1-32.
46. Ortiz, V.; Isibasi, A.; Garcia, E. and Kumate, J. (1989). Immunoblot detection of class-specific humoral immunresponse to outer membrane proteins isolated from Salmonella typhi in humans with typhoid fever. *J.Clin. Microbiol.* 27:1640-1645.
47. Ortiz, V.; Isibasi, A.; Garcia, E.; Kumate, J. (1985). "Estudio de la Inmunogenicidad de PME de Salmonella typhi empleando el método de inmunoelectrotransferencia". *Archivos de Investigación Médica.* 16:(supl. 1):6.
48. Perez, A.; Cabrera, R. (1974). "Medidas preventivas empleadas en la infección tifóidica". *Rev. Inv> Salud Pública XV-2:185-194*

49. Puente, J.; Flores, V.; Hernandez, M.; Fuchs, Y. and Calva, E. (1987). "Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from Salmonella typhi". *Gene*. 61:75-83
50. Ray, D. (1977). "Replication of filamentous bacteriophages". *Comprehensive virology*. Vol. 7. Plenum Publishing Corp. New York.
51. Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U. S. A.
52. Saxena, R.K.; Saxena, G.B. & Adler, W.H. (1988). Lectin - induced cytotoxic activity in spleen cells from young and old mice. *Immunology* 64:457-461
53. 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.
54. Scott, J.K. (1992). Discovering peptide ligands using epitope libraries. *TIBS* 17:241-245.
55. Scott, J.; Smith, G. (1991). "Searching for peptide ligands with an epitope library". *Science*. 249:386-390
56. Smith, G.P. (1985). "Filamentous fusion phage: a novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". *Science* 228: 1315-1317.
57. Szu, S.C.; Li, X.; Schneerson, R.; Vickers, J.H. and Robins, J.B. (1989). Comparative immunogenicities of Vi polysaccharide-protein conjugates composed of cholera toxin of its B subunit as a carrier bound to high-or lower-molecular-weight Vi. *Infect. Immun.* 57:3823-3827.

58. 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.
59. Udhayakumar, V. and Muthukkaruppu, V.R. (1989). Protective immunity induced by porin against Salmonella infection in mice. Indian J. Med. Res. 89:121-127
60. Unanue, E.R. (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. Ann. Rev. Immunol. 2:395-428.
61. Van, R. (1986). Which structural features determine protein antigenicity? TIBS 11:36-39
62. Vázquez, M.A.L. (1993). Tesis: Maestría en Ciencias Biológicas: IPN. Inmunología. (No publicado).
63. Vidal de la Cruz. (1988). Immunogenicity and Epitope Mappings of Foreign Sequences via Genetically Engineered Filamentous Phage. J. Biolchem 9:4318-4322.
64. Warburg, O. and Christian, W. (1941). Ultraviolet Method For Measuring Proteins. Biochem. 310,384.
65. Warrink, R.L. (1990). Method for identifying microbial antigens that stimulate specific lymphocyte responses: Application to Salmonella. Proc. Natl. Acad. Soc. 87:9823- 9827.
66. Young, R.A. (1988). Isolation of Gene that Expresses an Epitope Recognized by T Cells Specific for Mycobacterium bovis BCG and Pathogenic Mycobacteria. Asc of Immunol. 8:2729-2733.