

29-



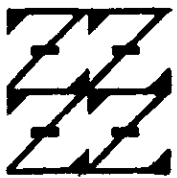
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LIPOPOLISACARIDO Y CONTRA REGIONES EXPUESTAS DE LA PORINA Omp C 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 :
MAR^{IA} DEL CARMEN CAMACHO VENEGAS

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HAZMOS POR
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

UNAM-CAMPUS ZARAGOZA

MEXICO 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1

262019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra lipopolisacarido y contra regiones expuestas de la porina Omp C De Salmonella typhi"

*A mis padres y hermanos
Por su gran cariño y apoyo
Ahora en los momentos más difíciles de mi vida.*

*A mi pequeño Axel,
Por ser el motivo más importante para seguir adelante.*

*Al Dr. Armando Isibasi
Por darme la oportunidad de conocer de manera intensa
el mundo fascinante de la investigación científica, al lado de su equipo:*

Dr. Jorge Paniagua S.

Dr. Vianney Ortiz N.

Dr. Cesar González B.

Dr. Manuel Carrera

Dr. Constantino López M.

Dra. Natalia Martín O.

*Al Dr. Ramírez, Shy, Mario, Rebeca,
Paty, Rosita y Carmen.*

Y a mis grandes amigos Anita, Angélica, y Víctor.

INDICE

I.	RESUMEN	8
II.	INTRODUCCION	10
1.	Proteínas de Membrana Externa.	11
1.1	Las porinas	13
1.2	Estructura y funcionalidad de las porinas.	15
1.3	Propiedades inmunogénicas de las porinas de <i>Salmonella typhi</i>	17
2.	El Lipopolisacárido (LPS)	21
2.1	Propiedades biológicas del LPS	24
3.	Propiedades generales del Sistema Inmune	26
4.	Inmunoglobulinas	27
4.1	Estructura de la Inmunoglobulina.	27
5.	Anticuerpos Monoclonales.	29
5.1	Importancia y aplicación de los Anticuerpos Monoclonales	32
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
IV.	HIPOTESIS	35
V.	OBJETIVOS	36
VI	MATERIALES Y METODOS	37
1.	Esquema de inmunización.	37
2.	Titulación del suero de ratones inmunizados	38
3.	Cultivo de cepas bacterianas	39
4.	Obtención de Anticuerpos Monoclonales	39
4.1	Obtención de Macrófagos	39

4.2	Crecimiento de células de mieloma Ag8.	40
4.2.1	Determinación de la viabilidad celular.	41
4.3	Obtención de células esplénicas .	41
4.4	Fusión celular	42
4.5	Selección de hibridomas	42
4.6	Clonación de hibridomas	43
4.7	Criopreservación	43
4.8	Propagación <i>in vivo</i>	44
4.9	Cultivo de agotamiento	44
5.	Caracterización de Anticuerpos Monoclonales .	45
5.1	Determinación de la cadena pesada de los anticuerpos secretados por los hibridomas. .	45
5.2	Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad (Proteína A)	46
5.3	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). .	47
5.4	Citometría de flujo	48
5.5	Pruebas de aglutinación en placa del anticuerpo anti-LPS.	49
5.5.1	Agglutinación directa.	49
5.5.2	Pruebas de Hemaglutinación	50
VII.	RESULTADOS	51
1.	Titulación de los sueros antipéptido y anti-LPS	51
2.	Reconocimiento de los hibridomas productores de anticuerpos específicos	53
2.1	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). .	53
2.2	Isotipificación de los anticuerpos monoclonales anti-LPS	55
2.3	SDS-PAGE	56
2.4	Análisis por citometría de flujo	58
3.	Pruebas de aglutinación del anticuerpo anti-LPS	61
3.1	Prueba de aglutinación directa	61

3.2	Prueba de hemaglutinación	61
VIII.	ANALISIS DE RESULTADOS	64
IX	CONCLUSIONES	68
X.	REFERENCIAS	70

ABREVIATURAS PRINCIPALES

LPS	Lipopolisacárido.
PME	Proteínas de Membrana Externa.
KDO	Acido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico
OmpC	Porina de bacterias gram negativas.
OmpC _r	porina recombinante.
Ig	Inmunoglobulina
KDa	Kilodaltones.
Fab	Fragmento de las Inmunoglobulinas que se une al antígeno.
HGPRT	Enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil-Transferasa.
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina.
C3H/HeJ	Cepa singénica de ratones.
BALB/c	Cepa singénica de ratones
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida.
PBS	Solución buffer de cloruro de sodio y fosfatos.
RPMI	Medio de cultivo celular.
SFB	suero Fetal de Bovino.
Ag8(X63.653)	Línea celular mielóide de origen murino.
DMSO	Dimetil-sulfóxido.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
FACS	Análisis por Citometría de flujo.
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína.
PCGENE	Paquete Computacional de Programas que analizan Secuencia de Proteínas y Acidos Nucleicos.

I. RESUMEN

En trabajos previos, se eligieron como probables epitopos de la porina OmpC de *Salmonella typhi* las regiones comprendidas entre los reiduos 285-303 (LQSKDISNGYGASYGDQ) y la región 246-254 (GTSNGSNPST); como regiones capaces de inducir una respuesta inmune en el huésped, regiones que fueron elegidas mediante algoritmos de predicción de epitopos por el programa PCGENE, debido a que previamente se demostró a la porina como un antígeno capaz de participar parcialmente en el control de la infección por *Salmonella typhi*

Los péptidos fueron sintetizados e inoculados en ratones de la cepa C3H/HeJ, las células linfoides se extrajeron y se fusionaron con la línea celular mieloide de origen murino Ag8 (X63-Ag8.653), empleando como agente fusionante polietilenglicol.

Paralelamente a este procedimiento, se fusionaron células linfoides de la cepa de ratones Balb/C inoculados previamente con una mezcla de proteína-LPS (Proteínas de Membrana Externa de *S. typhi* con aproximadamente 0.4% de LPS) con la misma línea celular mieloide de origen murino Ag8.

En ambos procedimientos de fusión celular, se seleccionaron los hibridomas mediante el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), y se clonaron por el método de difusión limitante.

En el primer caso se obtuvieron 2 clonas productoras de anticuerpos, las cuales reconocen a la porina en solución, por SDS-PAGE, existe reconocimiento específico de ambas clonas hacia la porina OmpC de *S. typhi*, y por Citometría de flujo, se observa un reconocimiento de la clona L6-A11 hacia la bacteria completa, lo cual demuestra que los determinantes antigénicos elegidos mediante algoritmos de predicción de epitopos, se encuentran expuestos en la superficie de la bacteria y por lo tanto los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden llegar a ser utilizados para la inducción de protección.

En el segundo caso, se obtuvieron clonas productoras de anticuerpos anti-LPS del tipo IgM, tanto al líquido de ascitis obtenido, como al sobrenadante de cultivo, se les realizaron pruebas de aglutinación directa y hemaglutinación con cultivos frescos de diferentes especies de *Salmonella*, en todos los casos, los anticuerpos monoclonales aglutinaron a *S. typhi* y no a *E. coli*, sin embargo en la aglutinación directa se observaron reacciones cruzadas con otras especies de salmonella.

Estos resultados iniciales de aglutinación, coloca a los anticuerpos monoclonales, como una opción viable a ser evaluados para su empleo en el diagnóstico inicial y confiable de la fiebre tifoidea.

II. INTRODUCCIÓN

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa provocada por la ingestión e invasión masiva de *Salmonella typhi*, la bacteria penetra en la mucosa intestinal, invade la sangre y provoca síntomas característicos como fiebre, ataque al estado general, dolor abdominal, meteorismo, y diarrea moderada que en los lactantes suele ser profusa y con sangre lo cual puede conducir a la deshidratación; a menudo se observa crecimiento del área hepática y del bazo, así como dolor vesicular; en casos más graves, se afecta el estado de conciencia llegando a provocar meningoencefalitis, las complicaciones más frecuentes son las de tipo intestinal como las perforaciones y las hemorragias⁽¹⁾.

Salmonella typhi se caracteriza por ser un bacilo gramnegativo, aerobio, carece de exotoxinas, móvil, perteneciente a la tribu *Salmonellae* de la familia *Enterobacteriaceae*; pertenece al grupo D en la clasificación de Kauffman-White de las salmonelas; crecen rápidamente en un medio ordinario y son resistentes a la congelación, no fermentan la lactosa y la sacarosa, forman ácido y usualmente gas de glucosa, maltosa, manitol y dextrán, no produce ureasa y produce H₂S^(1, 37).

Su fórmula antigénica es 9,12, Vi:d, nomenclatura que indica la presencia de los antígenos 9,12 los cuales son compartidos con 96 especies de salmonella del mismo grupo, el antígeno "d" presente en el flagelo, y el antígeno "Vi" que es un antígeno capsular de naturaleza polisacárida asociado a la virulencia de la bacteria. Además de éstos,

presenta otros antígenos de gran importancia: el antígeno "H" ó flagelar que contiene al antígeno "d", así como el antígeno somático "O" también llamado endotoxina o lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la bacteria

Con base a sus antígenos "O", "H" y "Vi", el grupo de las Salmonelas fue clasificado de acuerdo al esquema de Kauffman White en nueve serotipos específicos diferentes (A a I)⁽³⁶⁾.

Otro componente de gran importancia son las porinas, proteínas de membrana externa (PME), presentes en la superficie de la bacteria, situación que las coloca como antígenos accesibles a las células del sistema inmune por lo cual son capaces de inducir una respuesta inmune protectora^(11,13,14).

1. Proteínas de membrana externa.

Todas las bacterias gram negativas tales como la *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, están cubiertas por una membrana externa, estructura membranosa adicional presente fuera de la membrana citoplásmica, estudios realizados han permitido comprobar que la membrana externa de diferentes microorganismos está constituida de bicapas de fosfolípidos, las cuales permiten aislar y conferir a las células un compartimento subcelular a través del cual se lleva a cabo el transporte de solutos, la transducción de señales y la conversión de energía a través de esas barreras^(2,3); estructuralmente posee dos componentes de gran importancia:

- 1) El antígeno somático "O" o lipopolisacárido (LPS), es termoestable y aparentemente contribuye a la baja permeabilidad de la membrana externa a solutos lipofílicos ⁽⁴⁾, además presenta propiedades importantes que junto con el antígeno H, son útiles en su identificación serológica a nivel clínico (reacciones febriles).
- 2) Proteínas, las cuales forman canales o poros a través de la membrana, facilitando así la difusión de ciertos compuestos al interior de la bacteria; las proteínas de membrana externa (PME) que más se han estudiado son las de *S. typhimurium* y *E. coli* llegándose a clasificar en dos grupos: proteínas principales y menores^(5,6).

Entre las proteínas menores se incluyen:

- a). Canales específicos, las cuales contienen sitios ligando-específicos dentro del canal facilitando así la difusión de clases específicas de ligandos, y
- b). Receptores de alta afinidad, quienes junto con la proteína TonB realizan la translocación de moléculas grandes de nutrientes que existen en el exterior en bajas concentraciones⁽²⁾.

Con respecto a las proteínas principales se han encontrado las siguientes:

- a). Las porinas, también llamadas proteínas matrices, permiten la difusión no específica y espontánea de pequeños solutos polares al interior de la bacteria^(4,7).
- b). Proteína modificable por el calor (Omp A), actúa en procesos de conjugación y como receptor de fagos y colicinas. y

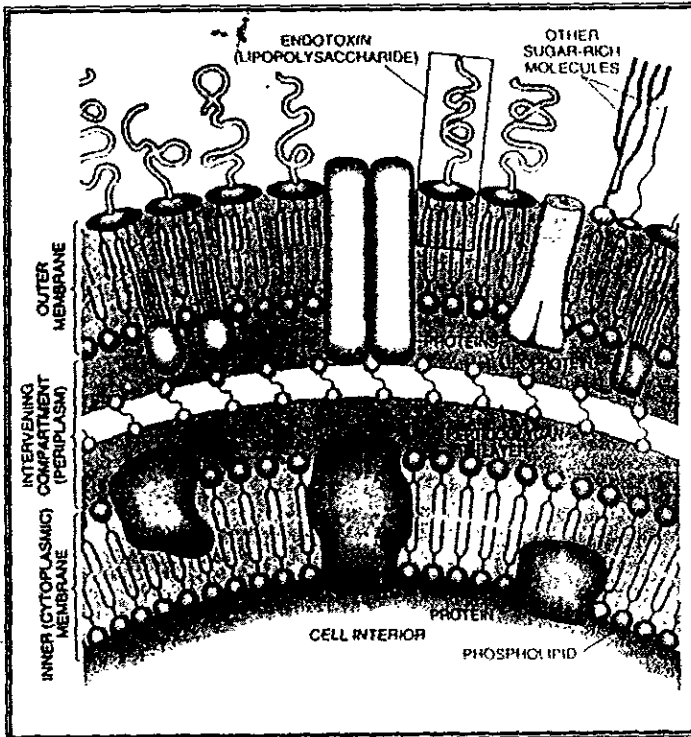
- c). Lipoproteína de Braun, unida covalentemente a la peptidoglicana, actúa manteniendo la integridad estructural y funcional de la membrana.

1.1. Las Porinas.

Son proteínas con peso molecular de 38-42 KDa y constituyen uno de los principales componentes activos de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, se les ha considerado como las proteínas más abundantes en la bacteria en términos de masa, ya que pueden contar hasta con 10^5 copias por célula, llegando a representar un 2% de la proteína total(8). Se encuentran asociados estrechamente a la peptidoglicana y al LPS de forma no covalente (fig. No.1), estructuralmente, son trímeros estables que le confieren alta permeabilidad, al mismo tiempo que forman poros o canales, que permiten el influjo de pequeñas moléculas hidrofílicas (aproximadamente 600Da.) y el eflujo de productos de desecho así como la exclusión de muchos antibióticos e inhibidores como pueden ser las sales biliares⁽²⁾.

Las Proteínas de Membrana Externa (porinas) que hasta hoy se han identificado han sido las de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, e incluyen a OmpF, OmpC y PhoE, mientras que OmpD al parecer es exclusiva de *S. typhimurium*, todas éstas presentan una homología de hasta un 69%, presentando similitudes en peso molecular, punto isoeléctrico y funciones biológicas, lo cual sugiere un origen común, sin embargo difieren solamente en su selectividad y afinidad por grupos iónicos⁽⁷⁾.

Figura No. 1



Estructura de la membrana externa de las bacterias gram-negativa (17)

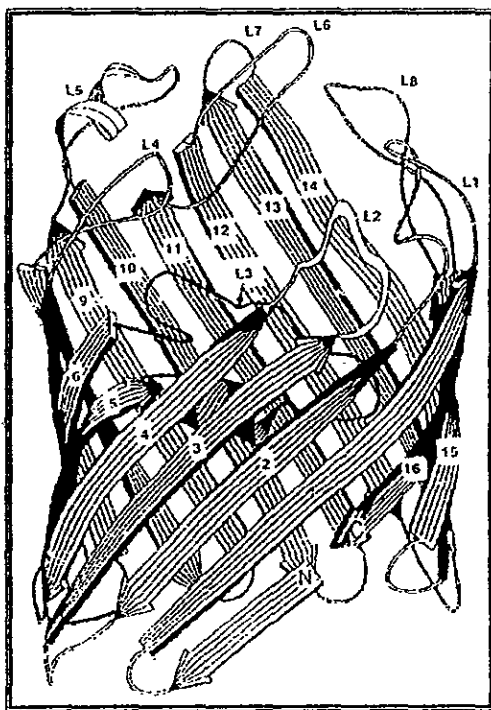
1.2. Estructura y funcionalidad de las porinas.

Dentro de la familia de porinas de *Escherichia coli* y *Salmonella*, las más estudiadas han sido OmpF y PhoE, por lo que se sabe que están formadas por tres monómeros idénticos de forma cilíndrica semejante a un barril, estructura considerada muy similar en las otras porinas debido a la gran homología que existe entre ellas. Cada monómero está formado por un polipéptido de 336 residuos en promedio, su composición de aminoácidos indica una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45%. En 1980, Rosenbusch y Col.⁽⁸⁾ reportaron la estructura cristalográfica de la porina OmpF de *E. coli* (fig. No. 2), el análisis por difracción de rayos X mostraron que la unidad estructural de la porina es un barril β formado por 16 regiones de hojas antiparalelas que atraviesan la membrana, y están enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas, formando una estructura cilíndrica al cerrarse las estructuras β de manera pseudo-cíclica mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1⁽⁸⁾. La estructura cilíndrica está formada por lo tanto por los tres poros o canales que cada subunidad produce y convergen al atravesar la membrana, asociados fuertemente por interacciones proteína-proteína, y en el eje donde convergen los tres canales (centro del cilindro), se encuentra asociado el lipopolisacárido con seis cadenas de ácidos grasos en un espacio de 10Å⁽⁹⁾.

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, una parte del interior de este canal (poro de difusión hidrofílico), se encuentra revestido por aminoácidos cargados, y el número

y posición de estas cargas determina la selectividad iónica de los canales que puede darse para simples cationes o aniones y para moléculas como antibióticos de diferente carga ⁽⁹⁾, así mismo, cada residuo de aminoácido de cara a la bicapa lipídica es hidrofóbico pero existe una fuerte preferencia por aminoácidos aromáticos próximo a la superficie de la bicapa⁽²⁾.

Figura No. 2



Estructura cristalográfica del monómero de la porina Omp F de *Escherichia coli* (8)

La síntesis de porinas está regulada de diferentes maneras, en *E. coli*, por ejemplo, la elevada osmolaridad ocasiona que EnvZ (proteína de membrana citoplásmica), fosforile a una proteína reguladora citosólica denominada OmpR que a su vez reprime la expresión de OmpF, e incrementa la expresión de OmpC.

Se ha demostrado ya que los canales de las porinas están reguladas en respuesta a las condiciones ambientales que en *E. coli* por ejemplo, el tamaño del canal o poro se ve disminuida a pH ácido (pH 5)⁽²⁾, el alta temperatura del tracto intestinal produce un incremento en la expresión de OmpC. y se reprime la expresión de OmpF ⁽⁴⁾, así mismo, la porina PhoE (fosfoporina) de *E. coli*, la cual permite el rápido influjo de fosfatos y compuestos fosforilados, es producido solamente cuando la bacteria está privada de fosfatos⁽²⁾, OmpC es sobre expresada a concentraciones elevadas de sales, y la expresión de OmpF se reprime por la osmolaridad elevada⁽²⁾, de la misma manera, la velocidad de difusión de los solutos a través de las porinas, está determinado principalmente por la carga eléctrica, el tamaño y la hidrofobicidad del soluto.

1.3. Propiedades Inmunogénicas de las porinas de *Salmonella typhi*.

Las porinas, como ya se ha mencionado, son proteínas que estructuralmente se encuentran en la superficie de la bacteria, por lo que están accesibles a los receptores de las células del sistema inmune, y por lo tanto son antígenos capaces de inducir una respuesta inmune. Este papel de las porinas en la inducción de protección contra la fiebre tifoidea

ha sido ampliamente demostrado en estudios realizados en años recientes:

En 1988 Isibasi y col. demostraron en el modelo murino, la importancia de las PME de *Salmonella typhi* en la inducción de protección, al inmunizar ratones NIH con una suspensión de 30ug de PME conteniendo 4.5% de LPS como contaminante, se observó hasta un 100% de protección al reto con la bacteria homóloga, protección que disminuyó a un 30% al reto con *Salmonella typhimurium*, lo cual sugirió que hay determinantes antigénicos que son compartidos en las diferentes bacterias. Al mismo tiempo, probaron en un ensayo de inmunolectrotransferencia un suero de conejo anti-PME, usado para inducir protección pasiva en ratones, y demostraron el reconocimiento de este suero hacia varias bandas que correspondían a las porinas de las diferentes cepas de *Salmonella*; ambos hechos evidenciaron la responsabilidad de las porinas en la inducción de la protección⁽¹¹⁾.

Al evaluar la participación de las PME de *Salmonella typhi* en la respuesta inmune humoral en humanos, se vio que éstas son inmunogénicas al encontrar en el suero de pacientes con fiebre tifoidea anticuerpos de clase IgM durante la fase aguda de la enfermedad, y anticuerpos de clase IgG durante la fase de convalecencia, los cuales están dirigidos contra las porinas, demostrándose que la respuesta inmune humoral está dirigida contra las porinas y que dicha respuesta tiene un papel fundamental en el control de la infección mediada por complemento⁽¹²⁾.

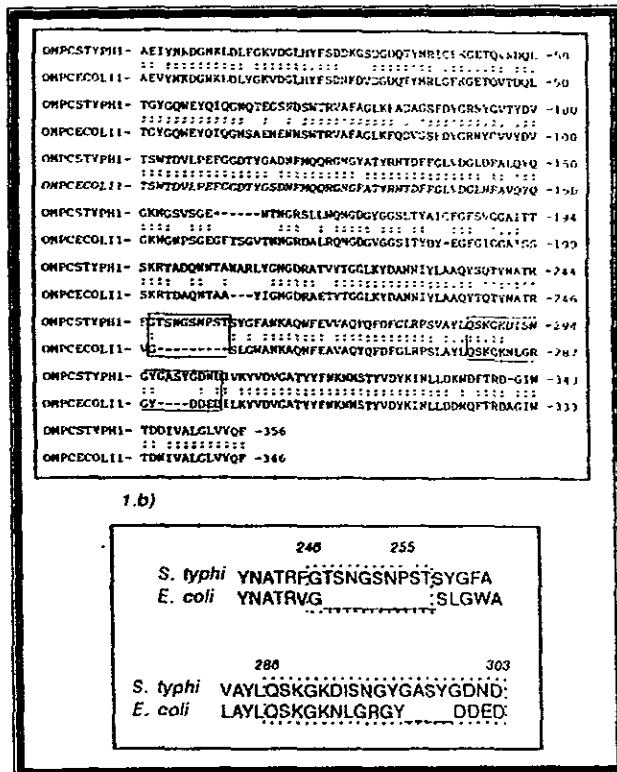
Las investigaciones hasta aquí realizadas colocaban a las PME como inmunogénicas, y colocaban a las porinas como los antígenos directamente responsables de la respuesta protectora, por lo que se aislaron y purificaron porinas de *Salmonella typhi* 9,12.Vi:d por el método de Nikaido⁽⁷⁾, disminuyendo así la contaminación por LPS; se emplearon 10ug. de estas porinas purificadas para inmunizar ratones NIH, y fueron retados con 500DL50 de la bacteria homóloga observándose protección al 90% de los ratones, a diferencia del 30 % de protección al reto con *Salmonella typhimurium* en las mismas condiciones, lo cual sugirió una respuesta especie-específica hacia las porinas⁽¹⁴⁾

Posterior a estos trabajos, se realizó la predicción de las regiones potencialmente antigénicas de la porina OmpC de *S. typhi* 9,12.Vi:d, con la finalidad de identificar los determinantes antigénicos responsables de inducir protección, para lo cual se emplearon métodos computacionales de predicción de epitopos^(32,33); como son los programas Antigen y Flexpro⁽³⁴⁾, el primero asigna un valor de hidrofiliidad a cada aminoácido de la proteína de acuerdo a la escala de Levitt⁽³²⁾, y tomando fragmentos de seis aminoácidos, promedia sus valores. De esta manera analiza regiones superpuestas a lo largo de toda la proteína y selecciona la región más hidrofílica como un probable determinante antigénico. El programa Flexpro por su parte, basa sus predicciones en el modelo de flexibilidad o movilidad de los antígenos estudiados por Karpluz y Shultz con base en estudios de resonancia magnética nuclear y análisis cristalográficos a muy alta resolución, se determinan así, coeficientes de agitación térmica (valores de B o Debye-Waller), que representa el desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio determinado de posiciones, tomando en

cuenta el factor Debye-Wayer para el carbono σ de los aminoácidos. el algoritmo selecciona aquellas regiones a lo largo de la secuencia que muestren los valores de movilidad más altos⁽³⁴⁾. Las regiones potencialmente antigénicas de la porina OmpC de *S. typhi* que de esta manera se seleccionaron, y con las que finalmente se decidió trabajar dada la comparación hecha con la secuencia de la porina OmpC de *E. coli*. (Fig. No. 3) fueron las siguientes:

- Región 285-303 (LQSKGKDISNGYGASYGDQ)
- Región 246-254.(TSNGSNPS).

Figura No. 3



Alineamiento de la secuencia de la porina OmpC de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* (30)

2. El lipopolisacárido (LPS).

El Lipopolisacárido de las bacterias gram-negativas ha obtenido una especial importancia en bacteriología debido a su alta especificidad serológica (antígeno O), y su poderosa actividad endotóxica^(25 35,36).

Este componente, como ya se ha mencionado, es el único lípido presente en la membrana externa de las bacterias gram negativas. Es un componente estructural esencial de la bacteria cuya función al parecer, es la de contribuir a la baja permeabilidad de la membrana externa a solutos lipofílicos(4). Las endotoxinas de todas las bacterias gram negativas estudiadas hasta hoy, presentan un principio estructural común, el cual consiste en un componente heteropolisacárido hidrofílico y una porción lipídica hidrofóbica unida covalentemente llamada lípido A⁽¹⁵⁾, siendo éste el responsable de todos los efectos tóxicos atribuibles al LPS⁽¹⁶⁾.

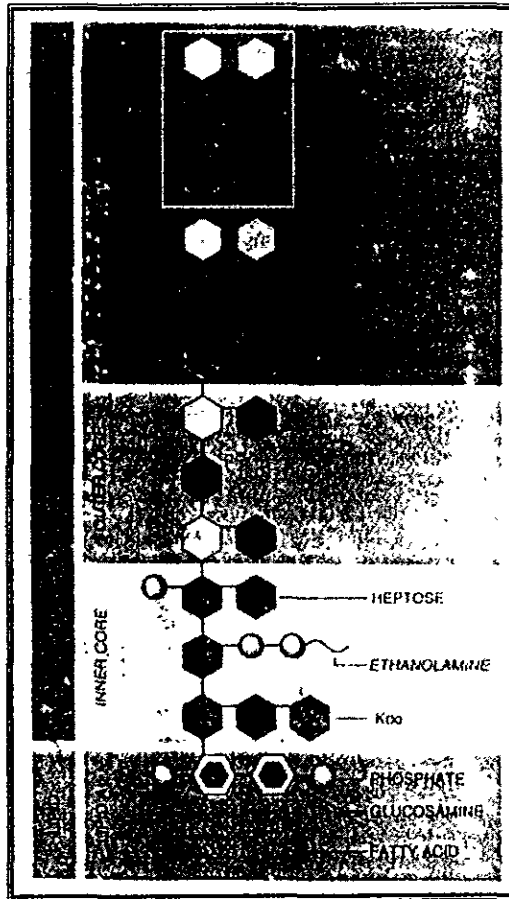
La porción polisacárida, la cual varía de una especie bacteriana a otra está formado de dos subcomponentes: El core y la cadena O-específica. La cadena O-específica representa un polímero formado por unidades repetidas de oligosacáridos (20 a 40) que incluyen hasta 8 azúcares, es la parte más externa del LPS y representa el segmento variable serotipo específico, por lo que debido a esto pueden encontrarse hasta 100 serotipos "O" de E. coli., esta región determina la especificidad

serológica ya mencionada, asimismo se le atribuye la protección de la bacteria contra la fagocitosis⁽²⁵⁾.

El core por su parte, está conectado al lípido A, y se divide en core interno (parte unida al lípido A), y core externo (parte unida a la cadena O-específica). el primero está cargado negativamente debido a la presencia de grupos fosforilados y carboxilos como etanolamina y dos azúcares inusuales, heptosa y ceto-deoxyoctonato ó KDO. El core externo por su parte está formado por azúcares más comunes como D-glucosa, D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina^(17 25). El core oligosacárido no es variable, ya que todas las especies de Salmonella producen un LPS con un core estructuralmente idéntico⁽¹⁷⁾

La parte más interna y conservada de la molécula de Lipopolisacárido es el Lípido A, el cual básicamente consiste en un azúcar además de fosfato y largas cadenas de ácidos grasos, los cuales le confieren propiedades lipofílicas al LPS⁽²⁵⁾. (fig No. 4)

Figura No. 4



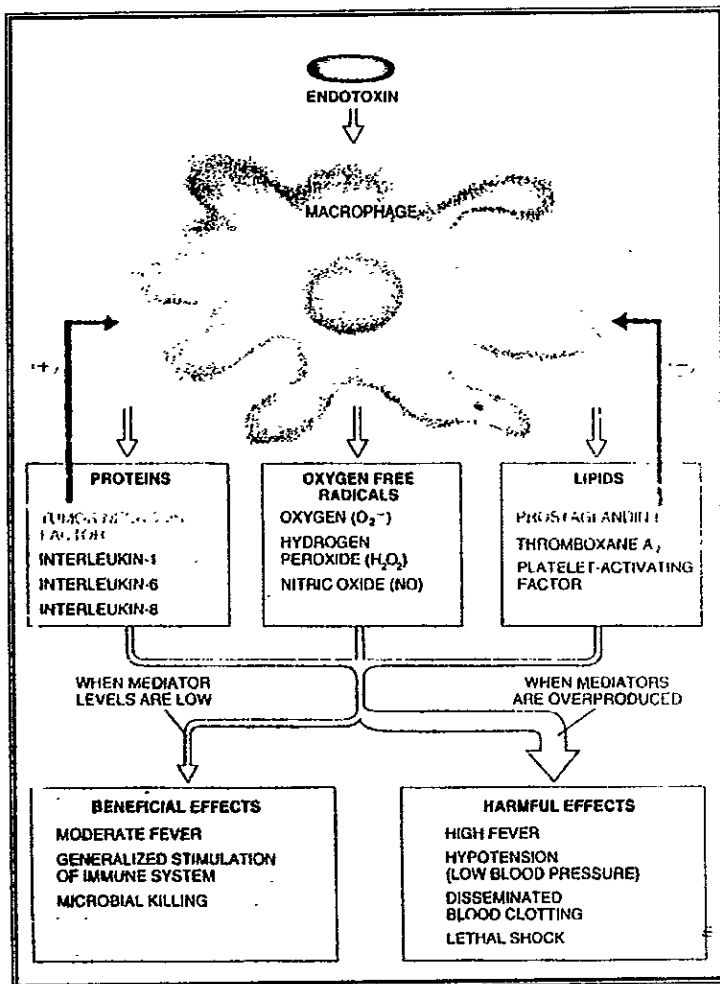
Estructura del lipopolisacárido de las bacterias gram-negativas (17)

2.1. Propiedades biológicas del LPS.

El lipopolisacárido es una potente toxina microbiana, la cual contribuye significativamente a las manifestaciones fisiopatológicas de las infecciones con bacterias gram-negativas, manifestaciones que a concentraciones elevadas de LPS, provocan hipotensión, coagulación intravascular, fiebres elevadas, y en casos más graves, muerte por shock endotóxico^(17,21), efectos originados debido a que, una vez inmerso en el organismo hospedero, el LPS presente en las bacterias se unen al receptor de membrana CD14, glicoproteína expresada fuertemente en monocitos, macrófagos y granulocitos, los cuales son activados liberando de esta manera tres grupos poderosos de mediadores como son: proteínas (interleucinas 1, 6 y 8, y el factor de necrosis tumoral), radicales libres (oxígeno, H₂O₂, óxido nítrico NO) y lípidos (prostaglandina E₂, tromboxano A₂, y factor activador de plaquetas), los cuales pueden actuar separada, conjuntamente o en secuencia, desencadenando de esta manera la cascada de eventos endotóxicos^(17,23,24) (figura No. 5).

Se ha visto también que en adición a los efectos negativos mencionados, cuando existen niveles bajos de mediadores, la molécula de LPS puede también ser un potente estimulador del sistema inmune^(22,17), activa la vía alternativa del complemento en ausencia de anticuerpos, y en muchas especies sirve además, como mitógeno por estimular la proliferación y diferenciación de linfocitos B⁽²¹⁾.

Figura No. 5



Estimulación de los macrófagos por la endotoxina para producir 3 grupos poderosos de mediadores (17)

3. Propiedades generales del sistema inmune.

Una función básica del sistema inmune es el reconocimiento de lo propio y de lo extraño, lo cual implica un amplio rango de mecanismos inmunológicos, mecanismos que incluyen desde la defensa propia del organismo mediante la inmunidad natural (barreras físicas, fagocitosis, eosinófilos de sangre y tejidos etc.), hasta los mecanismos que son inducidos o estimulados por la exposición a sustancias extrañas, cuya capacidad defensiva a diferencia de la inmunidad natural, aumenta con cada exposición sucesiva a una macromolécula en particular. Estos mecanismos constituyen la inmunidad adquirida o específica, la cual a su vez es de dos tipos, en función del sistema inmunitario que median las respuestas; *la inmunidad humoral*, está mediada por anticuerpos responsables del reconocimiento específico y de la eliminación de antígenos, este tipo de inmunidad es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares, en el cual los linfocitos B secretan anticuerpos que los eliminan, *la inmunidad celular*, mediada por linfocitos T, actúa básicamente contra microorganismos intracelulares obligados, como los virus y algunas bacterias, los cuales proliferan en el interior de las células del huésped, donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes. La defensa contra tales infecciones se debe a la activación de los macrófagos por los linfocitos T para la destrucción intracelular de los microorganismos o de la lisis de las células infectadas⁽²⁶⁾

4. Inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas son una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que conforman el producto de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B tras su estimulación antigénica en los tejidos linfoides periféricos, las cuales expresan Ig de membrana y secretan anticuerpos. Son moléculas extremadamente heterogéneas, dada su enorme diversidad con relación al enlace con el antígeno y sus diferentes actividades biológicas⁽²⁰⁾.

Cada linfocito B presenta en su membrana receptores de antígeno (IgM e IgD), el antígeno se une a la célula con su anticuerpo, lo activa y causa la proliferación clonal y la maduración a linfocitos formadores de anticuerpos de diferentes isotipos de cadena pesada, así como linfocitos de memoria^(19,20,26).

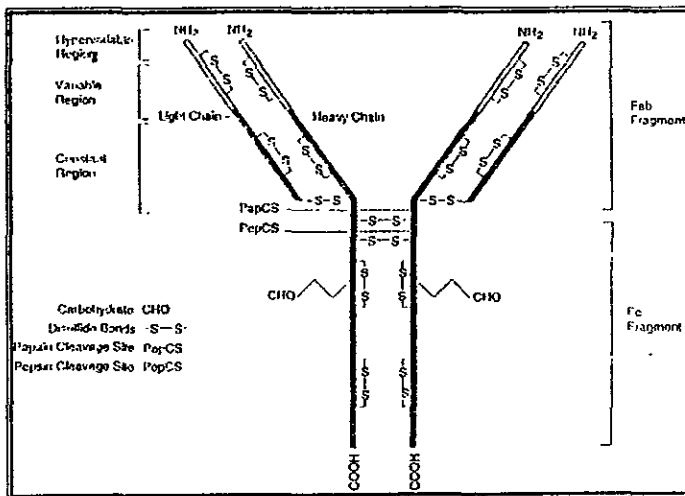
El incremento de linfocitos de memoria luego de sucesivas exposiciones implica una respuesta secundaria, la cual será mayor y más rápida, siendo esto el principio de la vacunación⁽²⁰⁾.

4.1. Estructura de la inmunoglobulina.

Las Inmunoglobulinas son glicoproteínas compuestas de 82-96% de polipéptidos y de 4-18% de Carbohidratos; cada molécula de anticuerpo está compuesta por dos clases de cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) idénticas, glicosiladas y con peso molecular entre 50 a 70 KD, y dos cadenas ligeras (L) idénticas, no glicosiladas de peso molecular de 25 KD; cada cadena está plegada por enlaces disulfuro en regiones

globulares llamadas dominios. A su vez, las cadenas H entre sí, y éstas con las cadenas L está unidas por puentes disulfuro intercatenarios (figura No. 6), las cuales pueden ser separadas por acidificación y por reducción de los enlaces disulfuro. En el tipo de anticuerpo más abundante, la inmunoglobulina G, la región bisagra expuesta extiende su estructura debido al elevado contenido de prolina, y por lo tanto es vulnerable al ataque proteolítico; la molécula es escindida por acción de la papaína para formar dos fragmentos idénticos, cada uno con único sitio de combinación para el antígeno Fab (fragmento de unión al antígeno), y un tercer fragmento que carece de la capacidad de ligar el antígeno, denominado Fc (fragmento cristalizante). La pepsina actúa en un punto diferente y escinde el Fc del remanente de la molécula, por lo que queda un fragmento 5S grande denominado F(ab')₂ por ser divalente con respecto a la unión con el antígeno al igual que el anticuerpo original^(18,19).

Figura No. 6



Estructura de una molécula de inmunoglobulina (28)

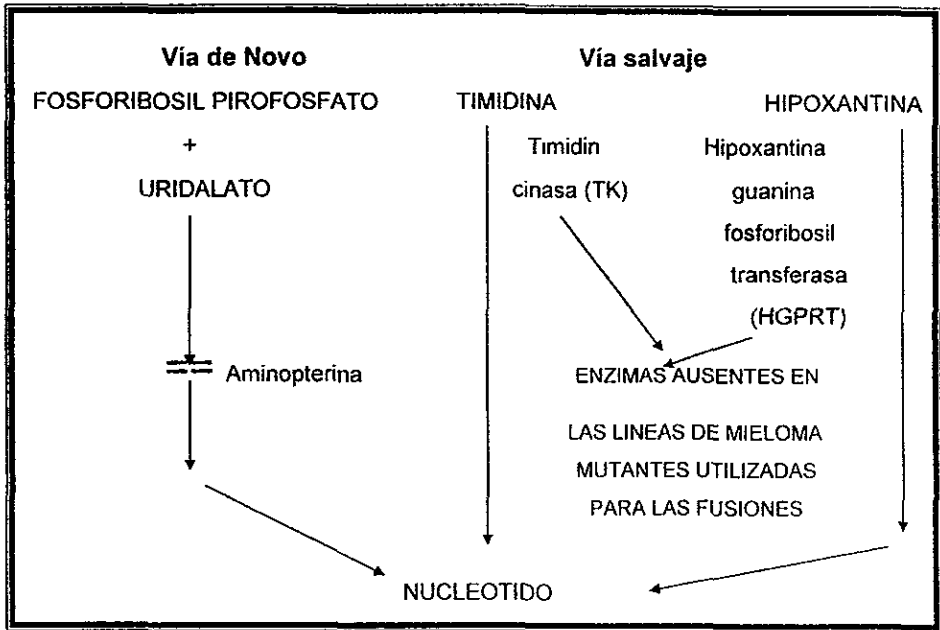
5. Anticuerpos Monoclonales.

El avance en el estudio de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos, se vio ampliamente beneficiado con el desarrollo y producción de mielomas híbridos, logrando con esto la obtención de un producto homogéneo de una clona aislada. En la enfermedad humana conocida como mieloma múltiple, una célula productora de una inmunoglobulina individual particular, se divide una y otra vez de la misma forma incontrolada que una célula cancerosa, obteniéndose grandes cantidades de células idénticas derivadas de la célula original, cada una de las cuales sintetizan la misma inmunoglobulina⁽¹⁹⁾. Dada esta importante característica, se han estudiado y generado hasta hoy gran número de mielomas principalmente de origen murino, sin embargo, dado que no es posible predecir la especificidad de estos mielomas o plasmocitomas, fue necesario crear una técnica para la obtención de células de especificidad predeterminada con la característica de inmortalidad de las células de mieloma.

En 1975 Köhler y Milstein desarrollaron los anticuerpos monoclonales usando la técnica de hibridoma, este método utiliza el bazo de ratones previamente inmunizados, los linfocitos B productores de anticuerpos son removidos del bazo y son fusionados con una línea celular de mieloma enzimodeficiente, usando como agente fusionante agentes químicos como el polietilenglicol (PEG), la sobrevivencia posterior de las células depende de la capacidad de esta para sobrevivir en el medio, debido a que la selección de hibridomas se lleva a cabo en un medio conteniendo aminopterina-hipoxantina-timidina (HAT), el motivo principal para usar este medio es el siguiente: Durante la fusión existen dos vías

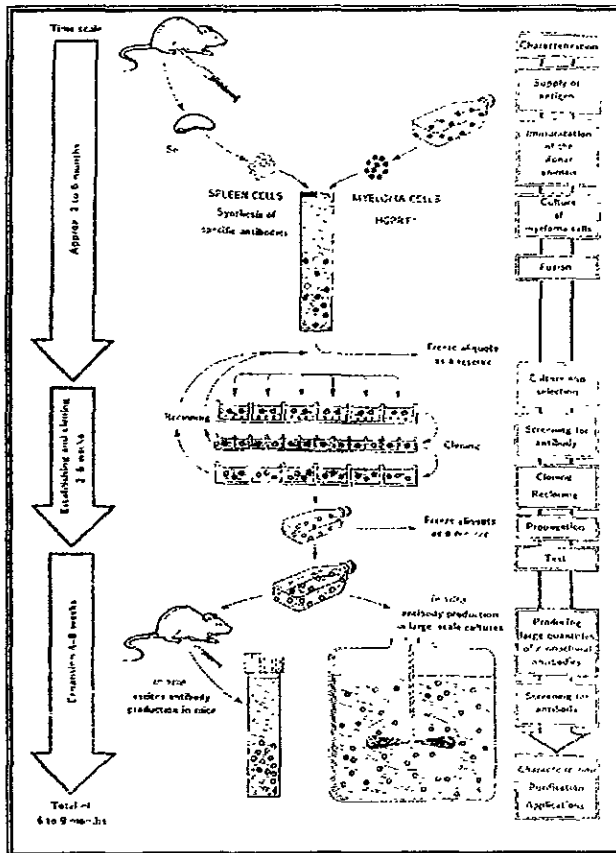
necesarias para la formación de los precursores de DNA, la vía biosintética principal es bloqueada con aminopterina, reactivo en el cual las células de mieloma no pueden sobrevivir, por lo que los híbridos siguen la vía alterna o de salvamento, vía donde las células utilizan la hipoxantina y la guanina existentes en el medio para convertirlos en guanosina monofosfato por acción de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT) presente en los híbridos y en los linfocitos B no fusionados, los cuales debido a su corta vida en cultivo mueren (6 a 7 días), el mismo fin tienen las células de mieloma no fusionadas, ya que carecen de las enzimas HGPRT y no pueden usar la vía alterna para la síntesis de nucleótidos, de esta manera sólo las células híbridas continúan duplicándose^(19,27,28,29,35). (fig. No. 7).

Figura No. 7



Los hibridomas así obtenidos, son cultivados y por diluciones sucesivas, puede establecerse el desarrollo de clonas aisladas. Estas clonas pueden propagarse en cultivos especiales (*in vitro*) o crecer en liquido ascítico en ratones (*in vivo*), donde pueden obtenerse mayores titulos de anticuerpo monoclonal (fig. No.8).

Figura No. 8



Producción de anticuerpos monoclonales (27)

5.1. Importancia y aplicación de los anticuerpos monoclonales.

La importancia más relevante de los anticuerpos monoclonales se ve en su aplicación a nivel diagnóstico. En un anticuerpo policlonal, más del 90% de las moléculas de Ig presentan poca o ninguna afinidad por el antígeno, y los anticuerpos específicos en sí representan un amplio espectro de moléculas con distintas avidedades dirigidas contra diferentes determinantes sobre el antígeno. En contraste, en el anticuerpo monoclonal todas las moléculas producidas por un hibridoma son idénticas ya que presentan la misma clase y alotipo de IgG, y la misma región variable, estructura, idiotipo afinidad y especificidad para un epitopo determinado, lo cual en un estudio inmunológico se traduce en una gran especificidad en lo que se refiere a la reactividad cruzada con otros antígenos. Una importante ventaja del anticuerpo monoclonal como reactivo, es que provee de material patrón exclusivo para ser utilizado por todos los laboratorios interesados como suministro infinito, si se mantiene la inmortalidad y la pureza de la línea celular.

El enfoque monoclonal es importante en el diseño de estrategias convencionales para la producción de anticuerpos específicos contra componentes individuales en una mezcla de antígenos, en la cual, por ejemplo se desea identificar cual de una serie de antígenos de un parásito dado puede generar anticuerpos protectores para el huésped. Esto, como puede notarse, coloca a la técnica de los hibridomas como una técnica poderosa de incalculables aplicaciones^(19,27,28).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trabajo de investigación que se ha venido realizando en el Laboratorio de Inmunoquímica del C.M.N. siglo XXI, está enfocado al estudio integral del agente causal de la fiebre tifoidea, *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d, y uno de los principales proyectos de investigación es la de obtención de anticuerpos monoclonales.

En estudios previos, se demostró que las proteínas de membrana externa de esta bacteria, específicamente las porinas, constituyen un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune protectora, se encontró que los probables epitopos capaces de inducir esta respuesta comprenden la región 285-303 y la región 246-254, analizados previamente mediante algoritmos de predicción de epitopos, sin embargo, al realizar el mapeo de estas regiones usando anticuerpos policlonales, se observó reconocimiento hacia otras bacterias gram negativas, debido a la policlonalidad, lo cual hizo necesaria la obtención de anticuerpos monoclonales contra estas regiones, los cuales pueden ser de gran utilidad en la inducción de protección así como en el control de la infección por *S. typhi*.

Por otra parte, es importante el desarrollo de métodos de Dx capaces de disminuir el tiempo de espera, desde el inicio de la enfermedad hasta el establecimiento de la terapéutica adecuada; en el caso de la fiebre tifoidea, el Dx. se retrasa debido a que en estadios tempranos de la enfermedad no hay anticuerpos en sangre, por lo que las

reacciones febriles son negativas, por otro lado, al realizar coprocultivo, actualmente se usa suero polivalente anti-O de Salmonella, lo cual puede originar falsos positivos debido a las reacciones cruzadas que se generan con otras especies de Enterobacterias, y falsos negativos debido a que el antígeno Vi capsular a menudo interfiere con la aglutinación de cepas aisladas recientemente con los antisueros que contienen primordialmente aglutininas anti-O. En ambos casos se hace necesario la ampliación de la prueba tanto en tiempo como en reactivos a utilizar. La obtención de anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacarido, pretende disminuir ambas situaciones, logrando que a partir de los primeros días de la enfermedad, pueda ser diagnosticada con un alto grado de confiabilidad, y sea posible su tratamiento temprano disminuyendo así las complicaciones inherentes a esta.

IV. HIPOTESIS

1. Las regiones expuestas 246-254 y 285-303 de la porina OmpC de *Salmonella typhi* son epitopos de superficie de esta bacteria, que van a ser reconocidos por los anticuerpos monoclonales generados, al mismo tiempo que reconocerán a la bacteria completa.
2. El antígeno somático de *Salmonella typhi*, lipopolisacárido o endotoxina, será reconocido por los anticuerpos monoclonales generados, al mismo tiempo que aglutinará a la bacteria completa.

V. OBJETIVOS

Objetivos generales.

1. Obtener anticuerpos monoclonales de regiones expuestas de la porina OmpC de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d.
2. Obtener anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d.

Objetivos particulares.

- 1.1.- Caracterizar proteínas de membrana externa (PME) de diferentes especies de *Salmonella*, mediante métodos bioquímicos.
- 1.2.- Obtener clonas productoras de anticuerpos, mediante la fusión de células de mieloma (Ag8) con células de bazo (linfocitos B), usando polietilenglicol como agente fusionante y la técnica de ELISA como medida de producción de anticuerpos.
- 1.3.- Generar grandes cantidades de anticuerpo mediante la obtención de líquido de ascitis.
- 1.4.- Purificar estos anticuerpos mediante el uso de una columna de proteína A.
- 1.5.- Isotipificar mediante la técnica de ELISA los anticuerpos anti-lipopolisacárido obtenidos y determinar su capacidad de aglutinar a la bacteria completa, así como su reconocimiento diferencial con otras especies de *Salmonella*.
- 1.6.- Determinar mediante el método de citometría de flujo si el anticuerpo monoclonal anti-porina reconoce la bacteria completa.

VI. MATERIALES Y METODOS

1. Esquema de inmunización.

Para la obtención de los dos tipos de anticuerpos monoclonales, se realizaron los siguientes esquemas de inmunización:

1.- Se inmunizaron ratones hembras de la cepa C3H/HeJ de 16 a 18 g.de peso, con una emulsión formada por los péptidos sintéticos de la porina OmpC previamente sonicados (sonipret 150), mas adyuvante completo de Freud para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-porinas, mediante el siguiente esquema:

DIA	VIA	DOSIS (resina-péptido)
0	Intraperitoneal	0.5mg*
15	Intraperitoneal	0.5mg*
22	Retroorbital	SANGRIA

* Equivalente a 10µg de péptido

2.- Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 16-18g, con una preparación protéica-LPS más adyuvante incompleto de Freud en la dosis inicial, y con PBS en las dosis posteriores, se siguió el siguiente esquema:

DIA	VIA	DOSIS (µg/ratón)
0	Intraperitoneal	50
23	Intraperitoneal	30
31	Intraperitoneal	30
35	Retroorbital	SANGRIA

2. Titulación del suero de los ratones inmunizados.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-péptido y anti-LPS en cada grupo de ratones inmunizados, se obtuvo una muestra de sangre de los mismos, obtenida vía retroorbital, la cual se centrifugó a 1200rpm por 5min, la valoración de la presencia de ambos anticuerpos se realizó mediante la técnica de ELISA de la manera siguiente:

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos(NUNC) con el antígeno, (para determinar antiporinas, se agregó 1µg por pozo de porinas de *S. Typhi*, y para determinar anti-LPS, se agregó 100µl/pozo de una solución de 20µg/ml. de LPS de *S. minnesota*), en un amortiguador de carbonatos (0.1M pH9.5), se incubó 1 hr. a 37°C y durante toda la noche a 4°C, posteriormente, las placas fueron lavadas 4 veces con PBS-tween 0.1% (tween 20 SIGMA) e incubadas luego con solución de bloqueo durante 3 horas a 37°C (para antiporinas se usó PBS-leche 5%, y para anti-LPS se usó PBS-gelatina 2%), se lavaron nuevamente 4 veces con PBS-tween, y se agregó el primer anticuerpo, es decir 100µl de diferentes diluciones del suero de los ratones inmunizados, se incubaron por 2 hr. a 37°C, las placas se lavaron nuevamente y se añadieron 100µl de una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-igG de ratón conjugado a peroxidasa (GIBCO BRL), se incubaron las placas durante 1 hora 30min. a 37°C posterior a lo cual se lavaron 8 veces con PBS-tween, y se les agregó 100µl del sustrato (6mg de O-fenilendiamina y 10µl de H₂O₂ al 30% en 12 ml. de solución amortiguadora de citratos 0.1M, pH 5.6) a los 10min. la

reacción se defuvo agregando 50µl de H₂SO₄ 2.5N. y se efectuaron las lecturas de absorbancia a 490nm. en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan Multisoft).

3. Cultivo de cepas bacterianas.

Se tomó una asada de las siguientes cepas bacterianas:

E. coli DH α - pJS 752-3 (productora de CTB), *E. coli* DH 5 α - pJAK (productora de la proteína hibrida L6-CTB), *E. coli* UH302- pST13 (productora de Omp Cr), *E. coli* pJP L7 (productora de la proteína hibrida L7-CTB), *S. typhi* 9,12,Vi:d, *S. minnesota* Re 595, *E. coli* DH 5 α y *E. coli* K12. Todas ellas fueron sembradas por aislamiento en agar luria y se incubaron 24hr a 37°C, se tomó una colonia de cada cultivo y se sembraron individualmente en caldo luria mediante agitación durante 8hrs. (crecimiento en fase logarítmica) a 37°C, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7000 rpm y los sobrenadantes se congelaron a -20°C para su uso posterior.

4. Obtención de anticuerpos monoclonales.

4.1. Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal para su uso como células alimentadoras.

Se sacrificaron ratones de la cepa C3H/HeJ de aproximadamente 18-20g y se inyectó intraperitonealmente 5 ml solución de Hanks fría, se dio masaje durante 10 min. y se removió el líquido con ayuda de una

jeringa estéril; el líquido así obtenido se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se lavó dos veces con solución de Hanks estéril, resuspendiéndola posteriormente en medio RPMI 1640 complementado con glutamina 2mM, 2-β-mercaptoetanol 50µg/ml, gentamicina 200µg/ml. y 15% de SFB.

Se tomó una muestra exacta de esta suspensión celular y se contaron las células totales, los macrófagos se colocaron en placas estériles de 96 pozos (NUNC) a razón de 1×10^4 - 1×10^5 células/pozo. y se incubaron en una incubadora a 37°C con atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. El papel de los macrófagos es el de eliminar las células muertas y suministrar factores de crecimiento para el desarrollo inicial de los hibridomas.

4.2. Crecimiento de células de mieloma Ag8.

Se utilizó la línea celular X63-Ag8.653 (Ag8) deficiente de la enzima hipoxantina-fosforribosil-transferasa (HGPRT). Estas células de mieloma fueron descongeladas del nitrógeno líquido y cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 complementado al 10% con SFB (GIBCO BRL), 10^{-3} M de β-mercaptoetanol (MERCK), 2mM piruvato de sodio (GIBCO), estreptomycin a 100µg/ml y penicilina a 100UI/ml.; se mantuvieron en cultivo a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera de humedad, hasta tenerlas en condiciones ideales de crecimiento logarítmico y un porcentaje de viabilidad mayor del 85% para la realización de la fusión celular.

4.2.1. Determinación de la viabilidad celular.

Se cuantificó el porcentaje de células vivas en cultivo mediante el uso de una cámara de Neubauer; diluyendo una muestra del cultivo con azul de tripán al 0.2% a una relación 1:10, dicha viabilidad fue del 87%; para su uso en el momento de la fusión fueron cosechadas en fase de crecimiento logarítmico

4.3. Obtención de células esplénicas.

Se seleccionaron los ratones en los cuales se obtuvieron títulos de anticuerpos y se sacrificaron dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad, se obtuvo el bazo, y fue colocado en una caja de Petri conteniendo 10ml de RPMI sin complementar, éste fue macerado con ayuda de un tamiz (tela de organza) y el émbolo de una jeringa estéril, las células dispersas fueron centrifugadas a 2000 r.p.m. durante 5min. y posteriormente al paquete celular se le adicionó amortiguador de lisis (cloruro de amonio 0.83%) (MERCK), se incubó 2min. a 37°C y se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5min, se realizaron 2 lavados más al paquete celular y se contó el número total de células linfoides mediante una cámara de Neubauer

4.4. Fusión celular.

Las células de mieloma cosechadas en fase logarítmica (10^7 - 10^8 células), se centrifugaron a 1200rpm por 5 min y se resuspendieron en 10ml de RPMI para contar el número total de ellas, de esta manera y realizando las diluciones necesarias, las células Ag8 y linfoides fueron unidas en una proporción de 2:5 respectivamente, se centrifugaron a 1200 r.p.m. por 5 min., se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió suavemente para adicionarle lentamente 0.8ml de polietilenglicol (PEG) (GIBCO BRL) durante 1 min. dejando reposar la mezcla durante 3 min. a 37°C., se agregó entonces gota a gota 1 ml de RPMI sin complementar (previo a 37°C); y posteriormente otros 20 ml de medio, se centrifugó entonces a 800 rpm/3min. Al paquete celular se le adicionó 50ml de RPMI complementado con SFB 20%. Esta suspensión celular fue adicionada en placas de cultivo celular de 96 pozos, que 48 horas antes de la fusión fue necesario tener preparadas recubiertas con macrófagos de cavidad peritoneal en RPMI con SFB 20%; a cada pozo se le adicionó 100 μ l de la suspensión, teniendo como controles una fila de pozos con células linfoides, y otra fila con células Ag8 . Todas las placas fueron incubadas en una estufa para cultivo celular a 37°C y 5% de CO₂

4.5. Selección de hibridomas.

Después de 24 hr. el medio RPMI fue sustituido por medio HAT (RPMI 1640 suplementado con hipoxantina-aminopterin-timidina). Las células se mantuvieron en estas condiciones por 20 días. Las placas fueron revisadas diariamente mediante un microscopio invertido (Bausch Lomb).

hasta detectar las primeras células con crecimiento de células híbridas, las cuales fueron cuidadas diariamente hasta observar un crecimiento del 70 - 90% del área de cultivo, suficiente para secretar cantidades detectables de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo, la presencia de estos anticuerpos se realizó mediante la técnica de ELISA antes descrita. colocando el sobrenadante (primer anticuerpo) sin diluir, e incubándolo durante 18-24 hr a 4°C

4.6. Clonación de hibridomas.

Una vez seleccionadas las clonas productoras de anticuerpos anti-péptido y anti-LPS mediante la técnica de ELISA, éstas fueron clonadas mediante la técnica de dilución limitante, la cual consiste en contar las células híbridas en una cámara de Neubauer y realizar las diluciones necesarias a fin de tener 0.3 células por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos, es decir, tener aproximadamente 30 células viables en 10 ml de suspensión celular, considerando que se colocarán 100µl de la dilución en cada pozo, de esta manera las placas fueron incubadas nuevamente durante 7-10 días, tiempo durante el cual se detectaron las primeras clonas, y se desecharon los pozos que contenían más de una clona.

4.7. Criopreservación.

Para preservar los hibridomas obtenidos tanto de la fusión como de las subsiguientes clonaciones, fueron tomadas células en crecimiento logarítmico, centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. y el botón celular

(aproximadamente 10^6 células/ml.) resuspendido en 0.25ml. de solución crioprotectora esterilizada previamente por filtración.(1% de DMSO y RPMI 20% SFB). El criotubo (NUNC), en el cual fue colocada la suspensión celular, fue almacenado 24hr. a -70°C y posterior a este tiempo, se colocaron en nitrógeno líquido a -196°C .

4.8. Propagación in vivo.

Ratones previamente inoculados (7-10 días) con 0.5 ml de pristano (2,6,10,4-tetrametilpentadecano), se les inoculó intraperitonealmente 5×10^5 a 5×10^6 células de hibridomas; cuando el tumor se hizo evidente al cabo de 1 a 2 semanas, se inició la recolección diaria del líquido de ascitis mediante punción intraperitoneal en condiciones de esterilidad.

El líquido colectado fue centrifugado a 3000 rpm/5min, el paquete celular, cuyas células en óptimas condiciones son excelentes productoras de anticuerpos, fueron una parte colocadas en cultivo, para someterlas a cultivo de agotamiento, y otra parte fueron crioconservadas.

El líquido de ascitis libre de células colectado, fue almacenado a -20°C hasta su posterior purificación y caracterización.

4.9. Cultivo de agotamiento.

Esta técnica tiene como finalidad, concentrar el anticuerpo del sobrenadante de cultivo, anticuerpo que a diferencia del obtenido del líquido de ascitis, aunque en mucho menores cantidades, se encuentra relativamente purificado.

Las células productoras, se expandieron en una botella de cultivo de 75cm², hasta lograr una cantidad de 10⁶ células/ml, en un volumen final de 100ml, poco a poco, se fue disminuyendo la concentración de SFB al cultivo, 15%, 10%, 5%, 0% de RPMI-SFB, hasta lograr la muerte de toda la población celular. El cultivo se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante, el cual fue almacenado a -20°C hasta su posterior caracterización.

5. Caracterización de anticuerpos monoclonales.

5.1. Determinación de la cadena pesada de los anticuerpos secretados por los hibridomas (Isotipificación).

Para determinar que clase de Inmunoglobulina (IgG o IgM) está produciendo el hibridoma, así como el isotipo(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), se realizó la técnica de ELISA usando como segundo anticuerpo el conjugado polivalente (anti-isotipos IgG, IgM e IgA) de ratón unido a peroxidasa (del Kit ISO-2 SIGMA), de la siguiente manera:

Los anti-isotipos del Kit (IgG, IgM, IgA) se diluyeron 1:1000 en PBS, y se colocaron 100µl en cada pozo de una placa para ELISA, y se incubó durante una hora a 37°C, posteriormente, se lavó la placa 4 veces con PBS-tween 0.05% y los pozos se recubrieron con 200µl de solución de bloqueo (PBS-gelatina 2%), con la que se incubaron 2 horas 30 minutos a 37°C. Se colocaron 300µl de sobrenadante de cultivo de los hibridomas, así como del líquido de ascitis (dil. 1:5000) en cada pozo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, en atmósfera húmeda.

El conjugado anti-mouse polivalente (SIGMA), se diluyó 1:1500 en PBS, se adicionó 100µl de esta dilución en cada pozo de la placa y se incubó por 30 min. a temperatura ambiente, posterior al cual se añadió el sustrato (o-fenilendiamina y H₂O₂ en amortiguador de citratos 0.1M pH 5.6). A los 10 min. la reacción se detuvo agregando 50µl de H₂SO₄ 2.5 N. La placa fue leída a 490nm en el lector de ELISA.

5.2. Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad (PROTEINA A):

Se usó una columna de proteína A para purificar el anticuerpo obtenido mediante líquido de ascitis dada la gran interacción que existe entre la proteína A y la región Fc de los anticuerpos, separando de esta manera el isotipo IgG de otras proteínas presentes. La columna de proteína A en soporte de sepharosa. fue previamente lavada 10 veces su volumen con cada una de las siguientes soluciones: urea 2M, cloruro de litio 1M, y glicina 100mM pH 2.5, esto con el fin de tener la columna en condiciones ideales para su uso, sin la presencia de otros componentes dejados en experimentos anteriores.

El líquido de ascitis se diluyó 1:5 con solución de Hanks ajustando el pH con TRIS 1M pH 8, solución que fue pasada por la columna 3 veces, en seguida de lo cual, se iniciaron 2 lavados de la columna, primero se lavó 10 veces su volumen con TRIS 100mM pH 8 y posteriormente el mismo volumen de lavados con TRIS 10mM pH 8 o hasta obtener una absorbancia igual a 0, momento en el cual se procedió a eluir el anticuerpo

purificado (IgG) usando glicina 100mM pH3, los eluatos fueron colectados en volúmenes de 1ml en eppendorf conteniendo 0.5ml de TRIS 1M pH 8, esto, para estabilizar el pH del anticuerpo obtenido. A cada una de la fracciones obtenidas tanto de los lavado como de la elusiones, se les tomó la absorbancia a 280nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU 640). Los eluatos conteniendo el anticuerpo se guardaron en un refrigerador a -20°C. (se les realizó la cuantificación proteica mediante el método de Lowry, empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia).

5.3. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE se realizó usando una unidad electroforética para geles verticales en placa, en condiciones reductoras y no reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.5% de acrilamida, 0.3% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguados tris-HCl 0.35M pH 8.8. y el gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13 % de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de tris-HCl 0.125 M pH 6.8. y como buffer muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS 2%, β -mercaptoetanol al 5% para condiciones reductoras, y sin este reactivo para condiciones no reductoras, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

El corrimiento electroforético se inició a 25mÅ por placa y se usó como amortiguador de corrimiento Tris 0-025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3; cuando el corrimiento electroforético finalizó, los geles se

tiñeron en una solución de azul de Coomasie R-250 en metanol-ácido acético-agua (45:10:45) durante una hora e inmediatamente decoloradas empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel quedó transparente y las bandas de las proteínas observadas con claridad.

5.4. Citometría de flujo (FACS).

Se cultivó una colonia de las bacterias *S. typhi* 9,12,Vi:d, *E. coli* K12, y *S. typhimurium*, durante toda la noche a 37°C en medio mínimo M9 (6g de Na₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 1g. de NaCl, 2ml. de MgSO₄ 1M, 10ml. de glucosa al 20% y 0.1ml de CaCl₂ 1M), en agitación constante, el cultivo fue centrifugado a 7000 rpm en fase de crecimiento logarítmico, y los botones bacterianos lavados con PBS estéril (ajustado a un pH de 7.4), posteriormente, con esta misma solución se ajustó la bacteria, hasta una densidad óptica de 0.6 a 540nm. (aproximadamente 1x10⁹ bacterias/ml), se realizó una dilución 1:10 (con lo que se tienen 1x10⁸ bacterias/ml) y se colocaron en tubos eppendorf alícuotas de 100µl de esta dilución, los tubos se centrifugaron a 2,500 rpm/10min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500µl de sobrenadante de cultivo de agotamiento de los hibridomas, los tubos se incubaron toda la noche a 4°C. posterior a lo cual se centrifugaron nuevamente y se eliminó el sobrenadante, las pastillas se lavaron con PBS-suero normal de conejo 2% y posteriormente se agregó el conjugado (anticuerpo anti-IgG de ratón unido covalentemente a Isotiocianato de fluoresceína) a una dilución 1:1000 en PBS-SNC 2% y fueron incubados a 4°C por 30min. El sobrenadante fue eliminado por

centrifugación y las pastillas de células se lavaron con PBS-SNC 2% añadiendo posteriormente 500µl de yoduro de propidio (100µg/ml) a una dilución 1:1000 en PBS-SNC 2% y se procedió a realizar las lecturas en el aparato de FACS (FACScan Becton Dickinson).

5.5. Pruebas de aglutinación en placa del anticuerpo anti-LPS.

5.5.1. Aglutinación directa.

Una colonia previamente cultivada en agar luria, de *S. typhi* 9,12,Vi:d, *S. paratyphi A*, y *E. coli*, se sembró en medio mínimo A (0.3g. de KH_2PO_4 , 0.7g. de K_2HPO_4 , 0.05g. de Citrato de sodio, 0.1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100ml de agua destilada), y se incubó a 37°C con agitación constante durante 18-20hr (crecimiento logarítmico), se realizó la cuenta bacteriana tomando la absorbancia de la suspensión bacteriana a 520nm. A partir de una absorbancia igual a 0.6 (1×10^9 bacterias/ml.), se realizaron diluciones de la suspensión bacteriana al doble con PBS estéril, obteniéndose de esta manera diferentes diluciones de cantidades conocidas de bacteria, 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 bact/ml.

El líquido de ascitis obtenido fue sometido a diluciones al doble (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) con PBS estéril a partir del líquido concentrado.

Las pruebas de aglutinación se realizaron sobre una placa de vidrio para aglutinación. Se tomó una gota de las diluciones del líquido de ascitis y una gota de las diluciones de las bacterias con ayuda de una pipeta paster y fueron puestas en contacto sobre la placa.

5.5.2. Pruebas de hemaglutinación.

Para la realización de esta prueba, se obtuvo el LPS de las bacterias *S. gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. typhi* 9,12 Vi:d, *S. typhi* 0901, y *E. coli* K-901 de la siguiente manera: Se sembró y se ajustó la bacteria hasta tener 1×10^9 bacterias/ml de la manera que ya se mencionó. A 2.5ml de esta dilución bacteriana se le sometió a ebullición a 100°C por una hora, se centrifugó a 6000 rpm/10min, y se recuperó el sobrenadante.

Al líquido de ascitis se le realizaron con PBS estéril, diluciones seriadas al doble a partir de la muestra concentrada, obteniéndose así 500µl de cada dilución, finalmente, a cada una de estas se les adicionó 50µl de glóbulos rojos sensibilizados, y se observó la reacción de aglutinación.

VII. RESULTADOS

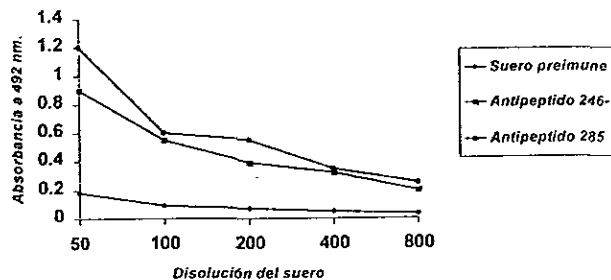
1. Titulación de los sueros antipéptido y anti-LPS.

Se probó el reconocimiento de los sueros de los ratones sangrados posterior a su inmunización mediante la técnica de ELISA, observándose lo siguiente:

- En el suero de los ratones inmunizados con la mezcla adyuvante-péptido 246-254 se observa un claro reconocimiento de estos hacia la porina rOmpC nativa, en comparación con el registrado por el suero preinmune, esto nos indica que las regiones reconocidas por estos anticuerpos se encuentran expuestas en la porina (gráfica No. 1)

Respuesta de anticuerpos totales hacia el conjugado resina-péptido 246 254 y 285-303 OmpC

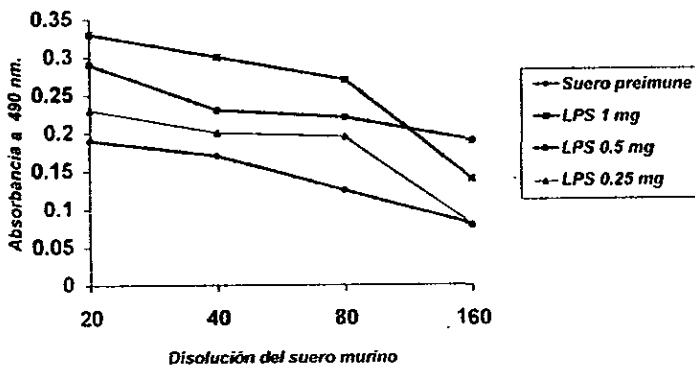
Gráfica 1



- El suero de los ratones inmunizados con la mezcla proteína-LPS también observó un aumento en el reconocimiento con respecto al suero preinmune, hacia el LPS Re de *S. typhi* empleado como antígeno (gráfica No. 2).

Reconocimiento del LPS Re por el suero de los ratones inmunizados con la mezcla proteína-LPS

Gráfica 2



2. Reconocimiento de los hibridomas productores de anticuerpos específicos.

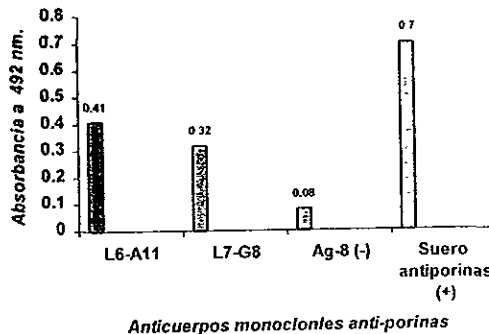
2.1. Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

La mayor parte de los hibridomas productores de anticuerpos fueron congelados, sólo aquellos que tuvieron las absorbancias más elevadas fueron clonadas mediante la técnica de dilución limitante, el reconocimiento de las clonas productoras se evaluó por lo tanto mediante un ensayo de ELISA:

- Los anticuerpos dirigidos contra el péptido 246-254, reconocieron a la porina de *S. typhi* obtenida mediante el método de Nikaido, lo cual nos indica que las regiones que reconocen estos anticuerpos se encuentran expuestas en la superficie de la porina (Gráfica No. 3).

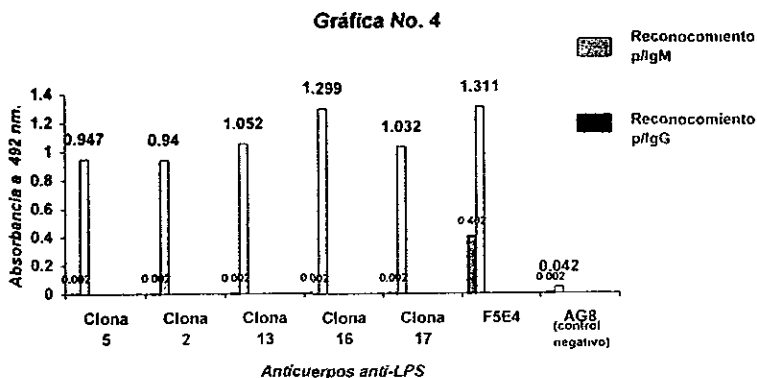
Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales L6-A11 y L7-G8 hacia las porinas totales de *S. typhi*

Gráfica No. 3



- Se obtuvieron dos hibridomas productores de anticuerpos anti-LPS de 2 clonaciones subsecuentes, las cuales presentaron D.O mayores a la unidad, G3B7 y F5E4 de 1.15 y 1.3 respectivamente, esta última fue clonada por tercera ocasión y se obtuvieron 5 clonas, de cada una de ellas se obtuvo liquido de ascitis de peritoneo de ratón, cuya reactividad fue valorada usando en la prueba de ELISA suero anti-IgG de ratón y suero polivalente como 2º anticuerpo.(Gráfica No. 4); como antígeno se colocaron 2 µg/pozo de LPS de *S. typhi*. Todas las clonas presentaron lecturas altas de absorbancia con el suero polivalente, mientras que el hibridoma de la cual se obtuvieron presentó reactividad hacia IgG.y hacia el suero polivalente Los títulos observados en el control negativo (sobrenadante de cultivo de células Ag8), siempre fueron menores de 0.08 de D.O.

Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-LPS hacia el LPS de *S. typhi* y determinación de la Ig que reconoce



2.2. Isotipificación de los anticuerpos monoclonales anti-LPS.

La prueba de isotipificación se realizó mediante la detección de la cadena pesada de la inmunoglobulina obtenida, se probaron tanto el líquido de ascitis como los sobrenadantes de cultivo de las clonas obtenidas, el primero a una dilución 1:5000, y el sobrenadante de cultivo se probó tal cual, sin diluciones, de esta manera se observó que los isotipos encontrados en esta prueba corroboraron los resultados obtenidos en la prueba de ELISA normal, es decir, la clona F5E4, tuvo reactividad hacia IgG2b, IgM, e IgA, mientras que el resto de las clonas que resultaron de la clonación de esta, fueron isotipo IgM a excepción de la clona 17. que presentó reactividad con líquido de ascitis hacia IgG1, y con sobrenadante de cultivo hacia IgM (cuadro No. 1 y Gráfica No. 5); estos resultados son de importancia, ya que nos indican la obtención de clonas puras. El control negativo Ag8 obtuvo títulos menores de 0.05 de D.O.

Cuadro No. 1

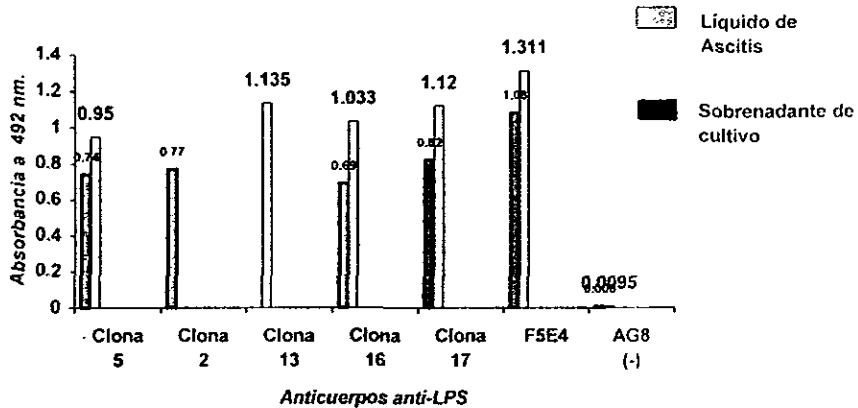
Isotipificación de los anticuerpos monoclonales anti-LPS

	<i>IgM</i>	<i>IgA</i>	<i>IgG1</i>	<i>IgG2b</i>
<i>clona 5 (SN)</i>	0.74	*	*	*
<i>clona 5 (ascitis)</i>	0.95	*	*	*
<i>clona 16 (SN)</i>	0.69	*	*	*
<i>clona 16(ascitis)</i>	1.033	*	*	*
<i>clona 13(ascitis)</i>	1.135	*	*	*
<i>clona 17 (SN)</i>	*	*	0.82	*
<i>clona 17(ascitis)</i>	*	*	1.120	*
<i>clona 2 (SN)</i>	0.77	*	*	*
<i>F5E4 (ascitis)</i>	1.311	1.08	*	1.0

* Títulos menores de 0.05 de D.O.

Isotipificación de los anticuerpos monoclonales anti-LPS

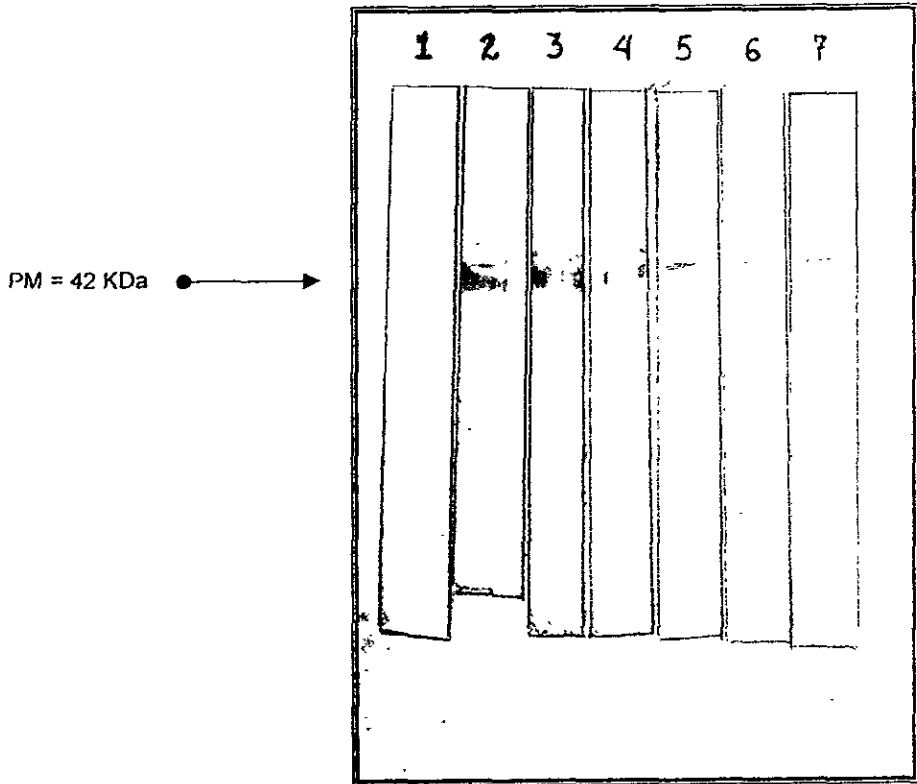
Gráfica No. 5



2.3. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Los anticuerpos monoclonales L6-A11 (reactividad anti-246-254), y L7-G8 (reactividad anti-285-303) obtenidos de sobrenadante de cultivo, fueron puestos en contacto con la porina rOmp C de *S. typhi* previamente sometida a corrimiento electroforético y transferida a papel, como puede observarse, existe un claro reconocimiento del anticuerpo monoclonal hacia la porina. (gráfica No. 6).

Gráfica No. 6



SDS-PAGE de los anticuerpos monoclonales L6-A11 y L7-G8

Carril No. 1. control negativo, Ag8

Carril No. 2. y 3. Control positivo, anti-OmpC

Carril No. 4. y 5. anticuerpo monoclonal L6-A11

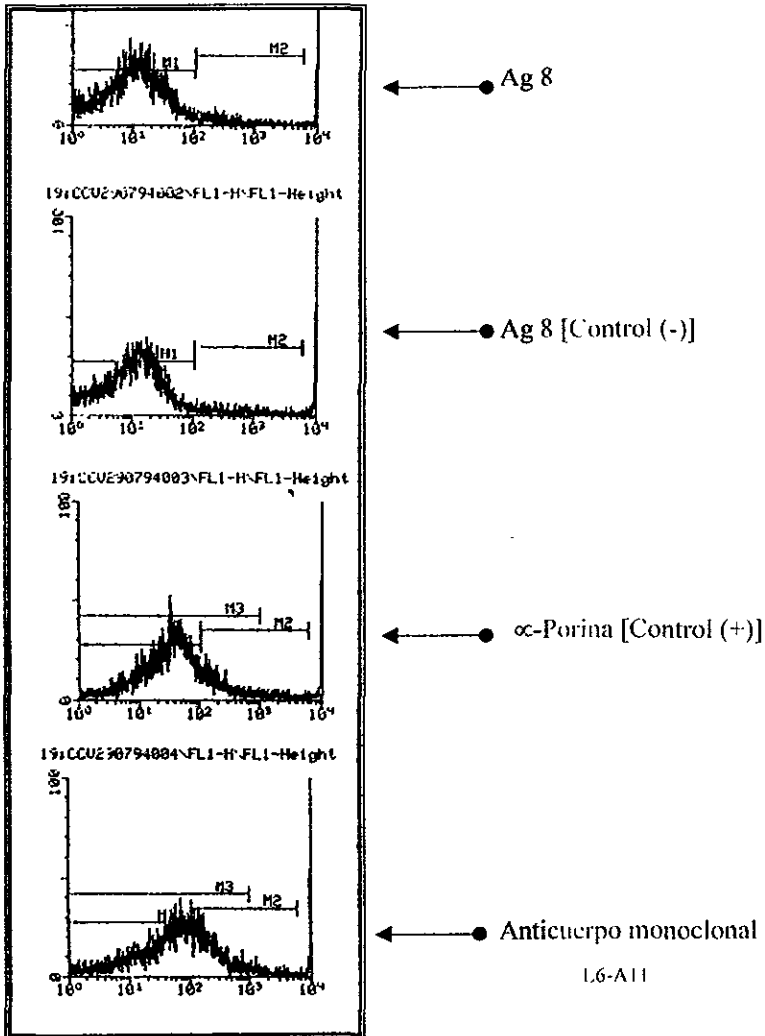
Carril No. 6. y 7. Anticuerpo monoclonal L7-G8

2.4. Análisis por Citometría de flujo (FACS).

Los anticuerpos monoclonales L6-A11 obtenidos de sobrenadante de cultivo, fueron puestos en contacto con las bacterias *E. coli* K12 y *S. typhi* 9,12,Vi:d mediante un ensayo de FACS. Las gráficas obtenidas muestran que los anticuerpos anti-péptido son capaces de reconocer a la bacteria completa, esto indicado por el desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha, en comparación con el sobrenadante de cultivo de células de mieloma Ag8 utilizado como control negativo. El anticuerpo monoclonal muestra reconocimiento únicamente hacia *S. typhi*, debido básicamente a que la región 246-254 es específica de esta bacteria, y no está presente en ninguna parte de la secuencia de la porina OmpC de *E. coli*.

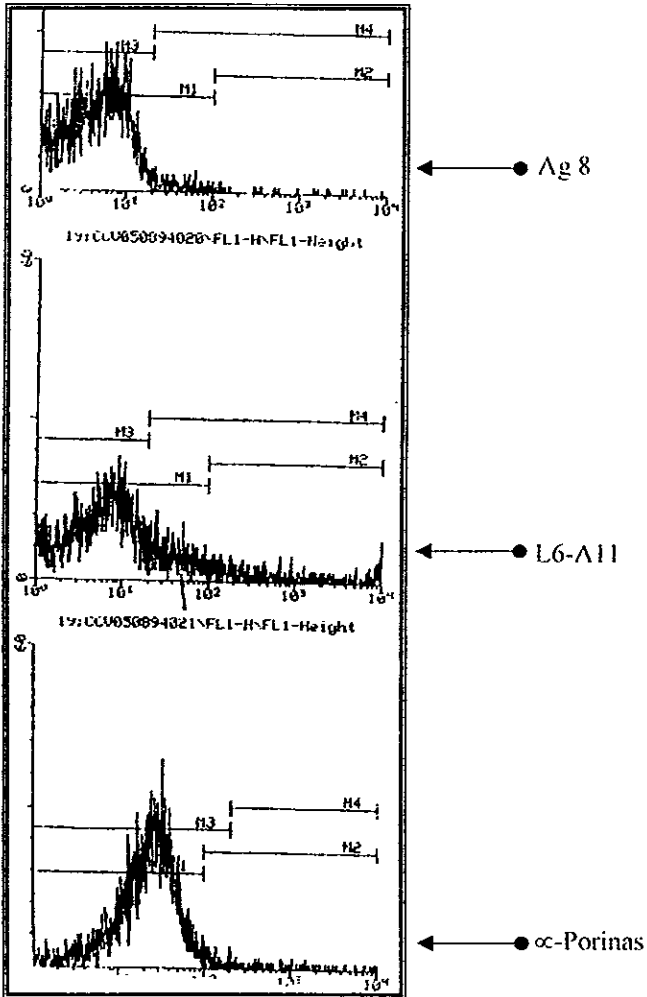
Estos resultados confirman que la región 246-254 de la porina OmpC de *S. typhi* predicha como región potencialmente antigénica por programas computacionales se encuentra expuesta en la superficie de la bacteria y es reconocida por los anticuerpos monoclonales (gráficas Nos. 7 y 8).

Gráfica No. 7



Reconocimiento de la bacteria completa *S. typhi* por el anticuerpo monoclonal L6-A11 de la porina OmpC de *S. typhi* 9, 12, VI: d

Gráfica No. 8



Reconocimiento de la bacteria completa *E. coli* por el anticuerpo monoclonal L6-A11 de la porina OmpC de *S. Typhi* 9, 12, VI: d

3. Pruebas de aglutinación del anticuerpo anti-LPS.

Para determinar la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-LPS para aglutinar a la bacteria completa de *Salmonella typhi*, se realizaron dos pruebas de aglutinación: la prueba de aglutinación directa y la prueba de hemaglutinación.

3.1. Prueba de aglutinación directa.

Prueba en la cual, los títulos de anticuerpo utilizado fue muy baja (1:2 y 1:4) considerando que se probó con anticuerpo obtenido de líquido de ascitis; en el cuadro que se muestra en seguida, solo se anotaron los títulos de anticuerpo en el cual se observó aglutinación. Como puede notarse, de las 6 clonas obtenidas 3 presentaron reactividad cruzada con diferentes especies de *Salmonella* (clona F5E4, clona 13, clona 16), 2 presentaron reactividad casi nula (+/-) hacia *S. typhi*, (clona 17 y clona 2), y sólo 1 (clona 5), aglutinó sólo a *S. typhi* en forma visible (++), aunque como ya se había mencionado, con títulos bajos de anticuerpo (cuadro No. 2).

3.2. Prueba de hemaglutinación.

En esta prueba se usaron eritrocitos sensibilizados con el LPS de diferentes especies de bacterias, se probó únicamente la clona 5, y se observó nuevamente el mismo resultado que el obtenido en la aglutinación

directa, a títulos bajos se observó aglutinación evidente (+++) de los eritrocitos recubiertos con el LPS de *S. typhi* 9,12 Vi:d (cuadro No. 3), mientras que con *E. coli* y las otras dos especies de Salmonela no se presentó aglutinación.

Cuadro No. 2

Títulos de aglutinación de los anticuerpos monoclonales anti-LPS frente a diversas bacterias gram negativas

ANTICUERPO MONOCLONAL	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. paratyphi</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. newport</i>
clona 5 dil 1:2	-	2	-	2	-
clona 13 dil 1:2	-	2	2	2	-
clona 17 dil 1:4	-	-	-	-	-
c-17 c/cabra anti-ratón	-	4	*	+	*
c-16 dil 1:2	-	2	2	-	-
c-2 dil 1:2	-	-	-	-	-
c-F5E4 dil 1:2	-	2	2	2	-
IgM de anti-LPS de conejo	-	320	*	160	*
policlonal sin purificar	-	160	*	*	*
bacteria+PBS (control neg.)	-	-	-	-	-

* Prueba no realizada.

Cuadro No. 3

Títulos de hemaglutinación de los anticuerpos monoclonales anti-LPS frente a diversas bacterias gram-negativas

anticuerpo	<i>E. coli</i> K 901	<i>S typhi</i> 9,12 Vi:d	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. newport</i>
C-5 dil 1:2	-	2	-	-
c-5 dil 1:4	-	4	-	-
c-5 dil 1:8	-	8	-	-
c-5 dil 1:20	-	-	-	-
c-5 dil 1:40	-	-	-	-
IgG de α LPS de conejo	-	-	-	-
α -LPS conejo sin purificar dil 1:640	-	640	-	-

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

1. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-porinas.

En trabajos previos⁽³⁰⁾, se analizó la secuencia de la porina OmpC de *S. typhi* mediante algoritmos de predicción de epitopos con los programas ANTIGEN y FLEXPPO del paquete PCGENE, se eligieron así, 10 regiones potencialmente antigénicas que presentaron de acuerdo al programa los valores más altos de hidrofiliidad y antigenicidad, finalmente, comparando con la secuencia de la porina OmpC de *E. coli*, se eligieron las regiones comprendidas entre los aminoácidos 246-254 (TSNGSNPS) y 285-303 (LQSKGKDISNGYGASYGDQ) de los que se realizó la síntesis química en fase sólida

Posteriormente, con estos péptidos se obtuvieron sueros policlonales de ratones inmunizados con el conjugado resina-péptido, se realizó su caracterización inmunoquímica y se encontró que estas regiones constituyen determinantes antigénicos expuestos en la porina y en la superficie de la bacteria, sin embargo, debido a la policlonalidad de estos sueros, no fue posible un reconocimiento específico hacia *S. typhi* dada la similitud entre la PMEs de las bacterias gram negativas⁽³¹⁾, por lo que se hizo necesaria la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas regiones.

Se obtuvieron 10 clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-péptido, 5 productoras de anticuerpos antipéptido 285-303 y 5 productoras de anticuerpos antipéptido 246-254, todas reconocen de manera específica a las porinas obtenidas por el método de Nikaido, tanto con la prueba de ELISA, como con SDS-PAGE, este último utilizado específicamente para las clonas L6-A11 y L7-G8, donde ambas mostraron un reconocimiento específico hacia la porina. En ambos casos, este reconocimiento sugiere que los determinantes antigénicos que reconocen estos anticuerpos se encuentran expuestos en la superficie de la bacteria. Por otra parte, al realizar el ensayo de citometría de flujo (FACS), se observa que el anticuerpo monoclonal L6-A11 (región 246-254) desplaza la fluorescencia hacia la derecha cuando se pone en contacto con la bacteria completa de *S. typhi*, con lo que se deduce que existe un reconocimiento específico debido a que esta región no es compartida con *Escherichia coli*, sino que es específica de *S. typhi*, lo cual puede ser de gran importancia en la respuesta inmune específica de esta bacteria.

2. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-LPS.

Tomando en cuenta que la respuesta humoral es mayor cuando se usan antígenos de naturaleza proteica, en el presente trabajo se usó como antígeno, una preparación proteica-LPS (porinas-LPS) para lograr así obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el LPS de *S. typhi*. De esta manera se obtuvieron 2 clonas productoras de anticuerpos que reconocieron en forma específica al LPS de *S. typhi*.

En la determinación de la cadena pesada de los anticuerpos generados (isotipificación), se observa que la clona F5E4 presenta anticuerpos del tipo IgA, IgM e IgG2b, lo cual puede ser normal, dado que las mezclas de LPS con proteínas puede inducir a la producción de isotipos IgG2, y el lipopolisacárido a su vez genera anticuerpos del tipo IgM, de hecho esto se manifiesta aún más al reclonar estas células. ya que se obtuvieron clonas puras que generan anticuerpos del tipo IgM, IgA e IgG1 (cuadro No. 1).

En lo que respecta a los resultados de las pruebas de aglutinación, se observa un reconocimiento real hacia la bacteria completa traducido en la aglutinación de ésta al ponerla en contacto con los anticuerpos monoclonales.

Se sabe que el fenómeno de aglutinación es más evidente cuando el antígeno se pone en contacto con anticuerpos del tipo IgM, y es más leve en anticuerpos del tipo IgG lo cual se observa claramente en la clona 17 que genera anticuerpos isotipo IgG1; posteriormente a que se agregó el anticuerpo cabra anti-ratón, la aglutinación se generó ya que éste ayudó a evidenciar la presencia del anticuerpo y por lo tanto su reconocimiento hacia el antígeno (cuadro No.2).

Dado que el resto de clonas fueron del tipo IgM sólo se probó la clona 5 en la prueba de hemaglutinación (cuadro No. 3), prueba en la cual se observa un claro reconocimiento del anticuerpo monoclonal hacia *S. typhi* 9,12 Vi:d, esto sin las reacciones cruzadas observadas en la aglutinación directa hacia las otras especies de Salmonela, sobre todo con

S. paratyphi, con la cual *S. typhi* comparte el antígeno 12. En la prueba, la aglutinación se observa mucho más evidente (+++) a una dilución mayor del anticuerpo (1:8), lo cual era de esperarse dado que el antígeno Vi fue destruido al someter a ebullición el cultivo bacteriano, con lo cual se evitó la interferencia que éste antígeno realiza sobre el antígeno O.

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

IX. CONCLUSIONES

- Fue posible la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-porinas y anti-LPS.
- Las regiones 246-254 y 285-303 seleccionadas por algoritmos de predicción, son epitopos de la porina OmpC expuestos en la superficie de *Salmonella typhi*, las cuales son reconocidas por anticuerpos inducidos contra estas.
- El anticuerpo monoclonal anti-porina L6-A11, presenta reconocimiento específico hacia la bacteria completa (*S. typhi*), reconocimiento que al no ser compartido, puede tener un papel importante en la respuesta inmune específica y sobre el control de la infección por *S. typhi* en el modelo murino.
- Los anticuerpos monoclonales anti-LPS obtenidos son capaces de reconocer al LPS de *S. typhi*
- Los anticuerpos monoclonales anti-LPS generados, fueron capaces de aglutinar a la bacteria completa en forma específica, siendo la técnica de hemaglutinación más sensible con respecto a la aglutinación directa.
- Es posible el uso de estos anticuerpos, como una forma alternativa de diagnóstico de la fiebre tifoidea, sobre todo en portadores asintomáticos.

REFERENCIAS

- 1.- Kumate J, Gutierrez G. (Eds). Fiebre Tifoidea, en Manual de Infectología. 7ª ed. México: ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 1980
- 2.- Nikaido H, Porins and specific channels of bacteria. J Biol Chem 1994; **269**:3905-3908.
- 3.- Cowan SW, Rosenbusch P. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. Science 1994; **264**:914-916
- 4.- Nikaido H, Vaara M. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability Microbiol Rev.1985; **49**:1-32.
- 5.- Di Rienzo J.M, Nakamura K, Inouye M. The outer membrane proteins of gram negative bacteria: biosintesis, assembly, and function". Annu Rev Biochem 1987; **47**:481-532.
- 6.- Osborn M.J, Wo HC. Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria. Annu Rev Microbiol. 1980; **34**:369-422.
- 7.- Nikaido H, Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. Methods Enzimol.1983; **97**:85-100.
- 8.- Cowan S W, Schirmer G, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit R A, Jansonius J N, Rosenbusch J.P. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. Nature 1992; **358**:727-733.
- 9.- Jap B K. Molecular design of pho E porin and its funtional consequences. J Mol Biol.1989; **205**:407-419.
- 10.- Brass M J. The cell envelope of gram-negative bacteria: new aspects of its functions in transport and chemotaxis". Curr Top Microbiol Immunol.1986; **129**:1-16.

- 11.- Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, González C, Moreno J, Kumate J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect Immun* 1988; **56**:2953-2959
- 12.- Ortiz V, Isibasi A, García-Ortigoza E, Kumate J. Immunoblot Detection of class-specific Humoral Immune Response to Outer Membrane Proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever" *J Clin Microbiol.* 1989; **27**:1640-1645
- 13.- González C, Isibasi A, Ortiz V, Paniagua J, García A, Blanco F, Kumate J. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol Immunol.* 1993; **37**:793-799.
- 14.- Isibasi A, Ortiz V, Paniagua J, Pelayo R, Gonzalez C R, García J A, Kumate J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins *Vaccine* 1992; **10**:811-813.
- 15.- Lüderitz O, Freudenberg M.A., Galanos C., Lipopolisacarides of gram-negative bacteria En: Zazin CS. Rottem S. (eds) *Microbias Membrane Lipids* 1982; **17**:79-151 New York Academic Press.
- 16.- Roit M. Y. (Ed). *Encyclopedia of Immunology*. 2ª ed. New York: Academic Press.1992: vol 3
- 17.- Rietschel E.T., and Brade H. Bacterial endotoxins. *Am J of Emer Med* 1992; **2**:60-69.
- 18.- Stites P D, Stobo D J, Wells V J. *Inmunología básica y clínica*. 6ª ed. México: Editorial El Manual Moderno S.A.1988.
- 19.- Roitt M. Y. *Inmunología fundamentos*. 7ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A. 1994.
- 20.- Glynn L E. *Structure and funtion of antibodies*. editado por L.E: Glynn and M.W. Steward. 1981.

- 21.- Roeder J D, Mei-Guey Lei, Morrison D C. Endotoxic - Lipopolysaccharide-Specific Binding Proteins on Lymphoid Cells of Various Animal Species: Association with Endotoxin Susceptibility. *Infect Immun* 1989; **57**:1054-1058
- 22.- Morrison D C, and Ulevitch R J. A review The interaction of bacterial endotoxins with cellular and humoral mediation systems. *Am J Pathol.* 1978; **92**:527-618.
- 23.- Stack A M, Saladino R A, Thompson C, Sattler F, Weiner D L, Parsonnet J, Nariuchi H. Failure of prophylactic and therapeutic use of a murine anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody in *Escherichia coli* sepsis in the rabbit". *Critical Care Medicine* 1995; **23**(9):1512-1518.
- 24.- Haziot A, Rong G W, Lin X Y, Silver J, Goyert M S. Recombinant Soluble CD14 Prevents Mortality in mice Treated with Endotoxin (*Lipopolysaccharide*) *J. Immunol.* 1995; **154**:6529-6532.
- 25.- Weckesser J, Drews G. Lipopolysaccharides of Photosynthetic Prokaryotes. *Ann Rev Microbiol.* 1979; **33**:215-239.
- 26.- Abbas K A, Litchman H A, Pober S J. Cellular and molecular Immunology. 2^{ed}. U.S.A.: W.B. Saunders Company. 1994.
- 27.- Springer Verlag, Heidelberg, and Peters J H, Baumgarten (eds) *Monoclonal Antibodies*. Ed. Springer Laboratory. 1991.
- 28.- Pappas G M. Immunodiagnostic Assays. en: *The Biobusiness Handbook*. Ed. Humana Press. 1994
- 29.- Kohler G, Milstein C, Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1995; **256**: 495-497.
- 30.- Paniagua Solis J, Martín Orozco N, Ortiz Navarrete V, Ramírez G, Gonzalez C R, Isibasi A. Predicted epitopes of *Salmonella typhi*" OmpC porin are exposed on the bacterial surface" *Inmunol Infect Dis.* 1995; **5**:244-249.

- 31.-Cázares Dominguez V. Mapeo de dos epitopos de la porina OmpC de Salmonella typhi Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México, 1994.
- 32.-Hoop T P, y Woods K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; **78**:3824-3828.
- 33.- Karplus M, y McCammon A. Dynamics of proteins: elements and function. Ann Rev Biochem. 1983; **53**:263-300.
- 34.- Bairoch A, PCGENE: The nucleic acid and protein sequence analysis software system. (TM) IntelliGenetics Inc. University of Genova, Switzerland.1990.
- 35.- Janeway Ch A, Travers P. Immunobiology. The immune system in health and disease. 3º ed. London, St. Fco: Current Biology Ltd.1997.
- 36.- Rubin H R, Wenstein M D. Salmonellosis. Microb. Path. and Clinic. features; Stratton Intercont. Med. Book Corp, New York.1979.
- 37.- Lynch M J, Stanley S R, Mellor L D. Métodos de Laboratorio. 2ª ed. México D.F: Nva edit. Ineteramericana 1989.