



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA CAPACIDAD
INMUNOGENICA Y PROTECTORA DE LA PORINA
OmpC DE *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHI.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

CRISTINA DEL CARMEN GIL CRUZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

Cristina del Carmen
Gil Cruz

FECHA:

23/04/04

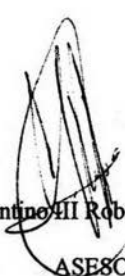
FIRMA:




Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Rodolfo Pastelin Palacios
Vocal	Prof. José Sulivan López González
Secretario	Prof. Constantino III Roberto López Macías
1er. Suplente	Prof. Raquel Ortega Muñoz
2º. Suplente	Prof. Enrique Ortega Soto.

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.


Dr. Constantino III Roberto López Macías

ASESOR


Cristina del Carmen Gil Cruz

SUSTENTANTE

DEDICATORIA.

A mis padres por todo el amor, apoyo, comprensión y consejos que me han dado día a día, por que sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, los quiero mucho.

A mi hermana Val por compartir tantos momentos conmigo, por todo el apoyo recibido, te quiero.

A Ricardo por todo el amor, paciencia, consejos, jalones de oreja brindados a lo largo de este tiempo, por compartir conmigo todos los momentos buenos y malos, por quererme como soy, y por tantas cosas que en un espacio tan pequeño no puedo expresar, Te Amo.

A mi familia en general por todo el apoyo recibido.

A mis amigas Rosalba, Perla, Tamara, Yessica y Hugo, por haber pasado tantos momentos conmigo tanto dentro como fuera de la facultad, por ayudarme en los momentos difíciles, por brindarme todo el apoyo en cada momento y por hacer que esta etapa haya sido inolvidable.

A Liliana, Oscar, George, Boites, Daniel, Vanessa, Chío y Raúl, por que a pesar de haberlos conocido al final de la carrera me han apoyado mucho, tanto en los momentos de estudio como fuera de ellos.

A Luisa, Maricela, Rebeca, Elizabeth, Aarón, al Maestro Rodolfo y Nestor, mis compañeros de laboratorio, por toda la ayuda brindada para la realización de este trabajo, por los consejos, las pláticas y todos los momentos que hacen que el tiempo en el laboratorio sea algo especial.

AGRADECIMIENTOS.

El presente proyecto fue financiado por el Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social. Proyecto FP 2003/020. Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Proyecto No. 33137-M.

Al Sr. Ricardo Vargas Orozco y el MVZ Daniel Sánchez Almaraz del Bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su valioso apoyo para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ingerbor Becker del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los Doctores Edmundo Calva y José Luis Puente por proporcionar las cepas de STYC 171 y STYF302 de *Salmonella typhi* utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Armando Isibasi gracias por haberme dejado formar parte de su equipo.

Al Dr. Constantino López Macías por considerarme para este proyecto, por la confianza, apoyo y consejos brindados durante mi formación en el laboratorio.

A la QFB Luisa Cervantes, al Dr. Rodolfo Pastelín y al Dr. Ismael Secundino por las enseñanzas, paciencia y consejos, que contribuyeron de manera muy importante en la realización de este trabajo.

A mis maestros

A mis compañeros de laboratorio por todos los momentos juntos.

INDICE

I. Abreviaturas

II. Resumen

III. Antecedentes

- * La fiebre tifoidea
- * Epidemiología y Estadísticas
- * *Salmonella enterica* serovar Typhi
 - Características bioquímicas de *S. typhi*
- * Infección por *Salmonella typhi*
- * Tratamiento contra la fiebre tifoidea
- * Respuesta inmune contra *Salmonella*
- * El perfil de anticuerpos
- * Vacunas contra la fiebre tifoidea
- * Moléculas inmunodominantes de *Salmonella typhi*
- * Porinas
 - Localización y estructura
 - La membrana externa
 - Actividad biológica de las porinas
 - Diferencias entre OmpC y OmpF de *S. typhi*
 - Respuesta inmune contra las porinas de *Salmonella typhi*.
 - Inmunogenicidad de OmpC y OmpF de *S. typhi*.

IV. Planteamiento del problema

V. Hipótesis

VI. Objetivo general

VII. Objetivos particulares

VIII. Materiales

- * Cepas bacterianas
- * Animales de laboratorio
- * Biológicos

IX. Métodos

- * Caracterización bioquímica de las cepas.
- * Obtención de la porina OmpC a partir de la cepa STYF302 de *S. typhi* a través del método de Nikaido modificado.
- * Determinación de Dosis letal media DL₅₀
- * Ensayo de Protección.

X. Resultados

XI. Discusión

XII. Conclusiones

XIII. Bibliografía

XIV. Anexo

- * Determinación de proteínas por el método de Lowry
- * Determinación de lipopolisacárido por cuantificación de KDO.
- * Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE
- * Identificación de proteínas por inmunoelectro transferencia Western Blot
- * Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida ELISA

I. ABREVIATURAS

ABS	Albúmina Sérica Bovina
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilen diaminotetraacetato disódico
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Isipor	Candidato a vacuna a base de porinas de <i>S. typhi</i>
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxioctulónico
LPS	Lipopolisacárido
OmpC _r	Porina OmpC recombinante
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos- salina
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecil sulfato de sodio
SSI	Solución salina isotónica
TBS	Solución amortiguadora Tris salina
TE	Solución amortiguadora Tris EDTA
ufc	Unidades formadoras de colonias

II. RESUMEN.

La fiebre tifoidea sigue siendo un problema importante de salud pública en países en vías de desarrollo. A lo largo de los años se han diseñado múltiples vacunas, sin embargo, no se ha logrado obtener una vacuna que induzca una protección de larga duración y barata que pueda ser aplicada en programas ampliados de vacunación en las zonas endémicas. Con el fin de desarrollar una vacuna que induzca protección de larga duración, que sea estable a temperatura ambiente y barata, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica se desarrolló una vacuna que actualmente se encuentra en estudios clínicos fase 1 (Isipor) hecha con porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*). 10 µg de Isipor protegen al 90% de los ratones al ser retados contra 500DL₅₀ de *S. typhi* en ratones. Estas proteínas son una mezcla de las proteínas OmpC y OmpF entre otras. Con el fin de determinar la participación de OmpF y OmpC en la protección, se obtuvo la porina OmpF de una cepa de *S. typhi* carente de la porina OmpC (STYC171); esta mostró una capacidad protectora de 60% contra 100DL₅₀ de *S. typhi*. En el presente trabajo se estudia la participación de OmpC en la protección inducida por Isipor. La porina OmpC se purificó y caracterizó a partir de la cepa STYF302 de *S. typhi* (la cual no expresa OmpF), se estudió la respuesta inmune humoral, y anticuerpos con actividad bactericida y la capacidad protectora inducidas por esta proteína. La porina OmpC se obtuvo con alto grado de pureza (libre de LPS determinado por KDO). OmpC indujo títulos altos de anticuerpos bactericidas de larga duración y una protección del 70% contra 20DL₅₀ y de 30% contra 100DL₅₀ del reto con *S. typhi*. La mezcla OmpC y OmpF (1:1) mostró una

protección del 50% contra 20DL₅₀, 30% contra 100DL₅₀ y 10% contra 500DL₅₀ lo cual equivale aproximadamente al 10% de la protección inducida por Isipor. Estos resultados nos indican que OmpC es la porina inmunodominante en la producción de anticuerpos y en la protección. Sin embargo, existen factores adicionales en Isipor que no se reconstituyeron en la mezcla OmpC y OmpF y que contribuyen a la inducción de la protección como puede ser la conformación de los epitopos dentro del trimero o la proporción en que se encuentren OmpC y OmpF dentro de Isipor.

III. ANTECEDENTES.

* La Fiebre Tifoidea

La fiebre tifoidea es una infección aguda generalizada del sistema retículoendotelial, del tejido linfóide endotelial y de la vesícula biliar; esta infección es causada por *Salmonella enterica* serovar Typhi. Los síntomas característicos de este padecimiento son fiebre persistente, dolor abdominal y dolor de cabeza. La transmisión de la fiebre tifoidea está ligada a lugares en donde no se cuentan con los servicios sanitarios necesarios, el agua no es de una calidad adecuada y existen portadores crónicos de *S. typhi* que sirven como reservorio de la infección. En las zonas endémicas, la mayor incidencia de fiebre tifoidea se presenta generalmente en niños en edad escolar ^{1,2}.

Típicamente, la fiebre tifoidea pasa a través de las siguientes 4 etapas: Incubación: El tiempo desde la ingestión de *Salmonella typhi* hasta la aparición de los primeros síntomas por lo general es de 1–2 semanas aproximadamente ³

Fase de invasión: Los primeros signos y síntomas son generalmente una fiebre intermitente elevada acompañada de cefalea persistente, tos no productiva, cansancio, insomnio, pérdida de apetito y malestar abdominal asociado frecuentemente con estreñimiento

Periodo de estado: Aproximadamente una semana más tarde, el paciente desarrolla una fiebre continua, bradicardia, pulso dicrótico, hepatomegalia y esplenomegalia. La hepatomegalia puede documentarse en un 33% de los casos y en una tercera parte de estos pacientes se encontrará ictericia. Los síntomas respiratorios pueden predominar en los primeros días de la fiebre tifoidea y

ocasionalmente puede documentarse neumonía en parches. En algunos pacientes la enfermedad semeja un proceso pulmonar primario. Los pacientes se quejan con frecuencia de malestar abdominal incluyendo estreñimiento, diarrea, dolor abdominal, sensibilidad del íleo o abdomen. La roséola tífica (pápulas rosas de aproximadamente de 2-4 mm de diámetro) aparece en el tronco de los pacientes caucásicos hasta en un 50% de los casos ^{1,4}.

Evolución: Los pacientes no tratados comienzan a mejorar por lo general 4 semanas después de la aparición de la enfermedad. La fiebre disminuye lentamente a lo largo de 2-3 semanas y pueden persistir los trastornos gastrointestinales. La recuperación completa puede requerir hasta 3-4 meses. Los pacientes tratados con antibióticos apropiados responden con una reducción gradual de la fiebre en un periodo de 3-5 días. En un 5-12% de casos la enfermedad es recurrente, en un 2-5% de los casos el paciente se convierte en portador crónico a pesar del tratamiento con antibióticos³. Los portadores crónicos están predispuestos a cáncer de vías biliares y también colorrectal, de páncreas, de pulmón y otros (Figura 1).

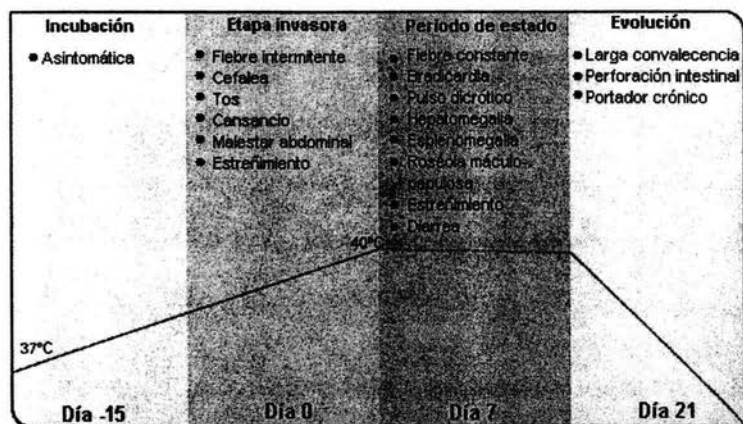


Fig. 1. Evolución clínica de la fiebre tifoidea ⁵.

* Epidemiología y Estadísticas

La Organización mundial de la salud reporta alrededor de 17 millones de casos de fiebre tifoidea a nivel mundial, de las cuales 600,000 son letales.

En México hasta la semana 51 del 2003 se reportaron 18,435 casos de fiebre tifoidea, de los cuales 34.5% son hombres y 65.5% mujeres, la mayoría de los casos se presentan en personas entre 25 y 44 años de edad. (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, *Información preliminar*)

Las entidades con una mayor incidencia de la enfermedad son: Sinaloa, Tamaulipas, Chiapas, Coahuila y Nuevo León, ésto se debe a que en estos lugares se registran temperaturas muy altas a lo largo del año y que en la mayoría de ellos la infraestructura sanitaria no es la adecuada. Debido a que en nuestro país todavía se registra una gran incidencia de fiebre tifoidea es necesario la implementación de planes de vacunación, y sobre todo, la creación de vacunas que respondan a las necesidades de la población ya que como se demuestra en

las estadísticas los lugares en donde se presentan la mayoría de los casos, son de clima cálido, de difícil acceso, además existe un alto índice de marginación en la población.

* ***Salmonella enterica serovar Typhi (S. typhi)***.

S. typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram-negativo, móvil, de flagelos peritricos, mide dos a tres micras, anaerobio facultativo, intracelular (Figura 2). Es una bacteria altamente adaptada al hombre ya que no se conocen otros reservorios naturales ².

Se han clasificado alrededor de 2463 serotipos (serovares) de *Salmonella*. En cuanto a la nomenclatura, existen diferentes propuestas, debido a estas los Centros para Control y Prevención de Enfermedades (CDC de sus siglas en inglés) la consideran de la siguiente manera; el genero *Salmonella* esta compuesto por dos especies, *S. enterica* en la cual se encuentran agrupadas 6 subespecies que se dividen en diferentes serotipos los cuales se designan de acuerdo a su fórmula antigénica.⁶



Fig. 2. Micrografía electrónica de *S. typhi* ⁷.

- **Características Bioquímicas de *S. typhi*.**

S. typhi es un bacilo móvil fermentador de glucosa con producción de ácido es lactosa y sacarosa negativo, además de producir ácido sulfhídrico ⁸.

Glu	Lac	Gas	Sul	Ind	Mov	Cit	Sac	Ure	Man	V
+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-

Tabla 1. Características bioquímicas de *S.typhi*

- * **Infección por *Salmonella typhi*.**

S. typhi entra al organismo a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, y penetra la membrana basal sin causar daño importante en los tejidos hasta llegar a la placas de Peyer, este proceso se lleva a cabo por las células M que son una población de células especializadas asociadas con la captación de antígenos del lumen intestinal ⁽⁸⁾; la bacteria posteriormente es fagocitada por los macrófagos y células dendríticas y es transportada a los ganglios linfáticos regionales donde se multiplica activamente ⁹.

Los sujetos infectados presentan una fase de bacteremia por la cual, los bacilos se distribuyen en el sistema fagocítico mononuclear en donde se reproducen y son liberadas nuevamente al sistema circulatorio. La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar ^{2,9-11}.

* Respuesta inmune contra *Salmonella*

En esta fase primaria de la infección los macrófagos y neutrófilos juegan un papel principal al fagocitar la mayor parte de las bacterias.

Una gran cantidad de bacterias son eliminadas por los fagocitos. Dentro del macrófago, los principales agentes antibacteriales son los intermediarios de oxígeno y nitrógeno reactivo. Al parecer los fagocitos eliminan a la bacteria con una fase inicial oxidativa dependiente de NADPH oxidasa, seguida de una fase nitrosativa prolongada mediante la cual el crecimiento de la bacteria es inhibido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Las bacterias en respuesta activan sus genes de virulencia produciendo, enzimas antioxidantes, sistemas de reparación, modificaciones estructurales de su LPS, etc. Por lo que algunas logran sobrevivir dentro del fagosoma e incluso multiplicarse dentro de él. No se conocen los mecanismos que determinan la muerte o supervivencia de la bacteria o del fagocito, sin embargo, la activación de los macrófagos por interferón γ (IFN- γ) o factor de necrosis tumoral α (TNF- α) parece ser un prerrequisito para la destrucción de la bacteria. Las que logran sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos provocan una segunda bacteremia que en casos fatales puede provocar un choque endotóxico y muerte.

Por otra parte la respuesta inmune contra *Salmonella typhi* también esta mediada principalmente por Linfocitos T específicos, que por su perfil principalmente de Th1 producen IFN- γ para activar a los macrófagos, además regulan la activación y maduración de linfocitos B para la producción de anticuerpos tanto en la respuesta primaria como secundaria. También participan

linfocitos T citotóxicos ya sea para eliminar los macrófagos infectados dejando desprotegida a la bacteria o directamente eliminándola a través de la producción de INF- γ . Los anticuerpos en el lumen intestinal principalmente IgM e IgA bloquean la entrada de la bacteria, probablemente por la inhibición de la adhesión de ésta a las células M y epiteliales ¹². También la opsonizan para provocar la fagocitosis y la fijación de complemento. Debido a que la respuesta de anticuerpos contra *S. typhi* es muy efectiva para evitar la fiebre tifoidea el uso de vacunas proporciona muy buenos resultados para evitar esta enfermedad.

* El perfil de anticuerpos.

Como se mencionó anteriormente, la respuesta inmune humoral contra *Salmonella* es importante para el control y prevención de la infección, se sabe que además de los anticuerpos de clase IgM e IgA del lumen intestinal también participan anticuerpos de clase IgG y las subclases de estos anticuerpos se encuentran relacionadas con el balance Th1/Th2.

En el ratón la IgG1 generalmente se encuentra asociada con una respuesta de tipo Th2, favorecida por interleucina 4 (IL4), mientras que respuestas de tipo Th1 se encuentran asociadas con la inducción de IgG2a, IgG2b, e IgG3 ¹³ favorecida por IFN- γ en el caso de IgG2a y TGF- β en el caso de IgG2b.

Cada una de estas subclases contribuye de manera diferente en la eliminación de distintos patógenos, IgG2a e IgG2b se unen con mayor fuerza a los receptores Fc y junto con la IgG3 pueden fijar complemento mejor que la IgG1; IgG3 puede unir bacteria y brinda protección al igual que IgG1 ^{13,14}.

La respuesta humoral inducida por algunos antígenos (generalmente bacterianos, virales o provenientes de parásitos) y adyuvantes promueven la

generación de las diferentes subclases de IgG, hacia un perfil adecuado para la protección.

Se ha visto que el balance Th1/Th2 se ve modificado por la naturaleza del antígeno, la dosis en que este se encuentra o la presencia de adyuvantes, algunos ejemplos son los siguientes, en el caso de la ovoalbumina, se ha visto que esta genera anticuerpos principalmente IgG1 (Th2) sin embargo en altas dosis de este antígeno o en presencia de LPS se puede inducir un cambio en este balance y la producción de anticuerpos, en este caso la aparición de anticuerpos IgG2a y la disminución de los anticuerpos IgG1^{15,16}.

En otros casos se ha observado que la presencia de un perfil tanto Th1 como Th2 se encuentra relacionado con la protección, como es el caso de la luminazina sintasa de *Brucella spp.* La cual al ser inmunizada en ratones, disminuye la infección y confiere protección contra *Brucella abortus*, y este perfil mixto (títulos altos de anticuerpos IgG1 e IgG2a), es independiente del adyuvante que se utilice¹⁴. Otro ejemplo es el caso del diseño de vacunas con múltiples antígenos virales para la infección con el virus de la inmunodeficiencia simio/humano, en este se pudo observar que al probar múltiples antígenos virales solamente cuando estos antígenos generan un perfil Th1/Th2 mixto, se indujo protección en monos contra la infección del virus¹⁷.

Se puede observar este tipo de respuestas aun en el caso de ratones que cuentan con células B específicas para un solo antígeno irrelevante, y que al infectarlos en este caso, con el virus de la estomatitis vesicular, virus de la polio y virus de la linfocoriomeningitis, se lleva a cabo una reedición de receptor la cual al genera anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus, estos anticuerpos

IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 tienen el mismo comportamiento que los generados por ratones normales retados con el virus de la estomatitis vesicular lo cual indica que este tipo de respuestas son importantes para la supervivencia a la infección.¹⁸

*** Tratamiento contra la fiebre tifoidea.**

La fiebre tifoidea se trata invariablemente con antibióticos. Un tratamiento eficaz reduce drásticamente el padecimiento y pérdida de vidas. Una respuesta clínica favorable se observa usualmente 1-2 días después de iniciar el tratamiento.

De manera más significativa, han aparecido y se han diseminado en todo el mundo muchas cepas de *S. typhi* que son resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados¹⁹.

Desde 1948 hasta la década de 1970 se utilizó ampliamente el cloranfenicol en todo el mundo, y en algunos países en vías de desarrollo, todavía es considerado el tratamiento estándar. Sin embargo, se han generado cepas de *S. typhi* resistentes al cloranfenicol. Lo anterior, unido al hecho de que el fármaco produce numerosos efectos colaterales indeseables incluyendo anemia aplásica, ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos. La amoxicilina, el cotrimazol y el trimetoprim-sulfametoxazol son tan eficaces como el cloranfenicol, y son seguros para el tratamiento en niños, sin embargo, en algunos lugares se han aislado cepas resistentes por lo que actualmente las quinolonas como la ciprofloxacina y las cefalosporinas de tercera generación son los fármacos de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea. Desafortunadamente, estos fármacos son caros, en el caso de los países en desarrollo no se encuentran al alcance de la mayoría de la población y representan una carga sustancial para los presupuestos

sanitarios de estos países ¹ , por lo que la prioridad es la prevención de la enfermedad y por lo tanto la generación y empleo de vacunas.

*** Vacunas contra la fiebre tifoidea.**

Vacuna de bacteria completa inactivada por calor (L)

La vacuna de bacteria completa inactivada por calor "L" (Pfeiffer y Kolle, Wright y colaboradores, 1896 ² fue por mucho la vacuna parenteral de bacteria completa inactivada mas ampliamente utilizada en el mundo, es relativamente fácil de preparar y estandarizar. Se produce básicamente calentando el medio en donde haya crecido *S. typhi* previamente por una hora a 56°C y resuspendiéndola en una solución al 0.5% de fenol en una concentración de 1×10^9 microorganismos por mililitro. La administración de dos dosis de esta vacuna proporciona una protección de aproximadamente 3 años, sin embargo, los efectos secundarios ocasionados principalmente por la cantidad de endotoxina son muy comunes, pueden ser fiebre, malestar generalizado, eritema local, induración y dolor; esto es un gran inconveniente para la administración de esta vacuna por lo que actualmente ya no se utiliza ².

Vacuna de bacteria completa inactivada por Acetona (K).

Esta vacuna se preparó por la evidencia de que la inactivación por acetona preserva el antígeno Vi, lo que incrementa la protección de esta vacuna comparada con la vacuna L mejorando también su estabilidad para el almacenamiento. Para su preparación, las bacterias son inactivadas con acetona después se secan o liofilizan. Aún cuando la protección conferida por esta vacuna es mayor que la de la vacuna L, aproximadamente de 7 años, los efectos

secundarios son iguales por lo que presenta las mismas desventajas que la anterior ².

Vacuna de cepa atenuada TY21a (Vivotif™)

La cepa Ty21a (Germanier et al ^{2,20,21}) es una cepa rugosa mutante de *galE*, proviene de la cepa silvestre Ty2 de *S. typhi* tratada con nitrosoguanidina, un agente mutagénico no específico. Se escogió una mutante que exhibía ausencia total de actividad de la enzima uridin difosfato galactosa-4-epimerasa y una reducción de aproximadamente el 80% de actividad de las enzimas galactocinasa y galactosa-1-fosfato uridil transferasa. De esta mutante se escogió una cepa que además estaba mutada para carecer del antígeno Vi, esta cepa se llamó Ty21a ².

Los residuos de galactosa son un componente importante del antígeno O del LPS de la *S. typhi*. La enzima codificada por el gen *galE*, UDP-galactosa-4-epimerasa isomeriza la UDP-glucosa en UDP-galactosa y viceversa. La UDP-galactosa proporciona la galactosa necesaria para el antígeno O del LPS liso de *S. typhi*. Cuando Ty21a crece en ausencia de galactosa no expresa el antígeno O porque no tiene una fuente de UDP-galactosa, en este estado no es inmunogénica, sin embargo, si crece con una fuente exógena de galactosa las otras vías de las enzimas de Leloir permiten que se asimile y se utilice para la síntesis del antígeno O ^{2,20}. Aún así, por la falta de la UDP-galactosa-4-epimerasa la cepa Ty21a acumula galactosa-1-fosfato y UDP-galactosa cuando crece en presencia de galactosa exógena porque no puede convertirlas en glucosa. In vitro se ha demostrado que la acumulación de estos productos intermedios lleva a la muerte de la bacteria por lisis. Durante mucho tiempo se pensó que las mutaciones de *galE* y Vi producían la inocuidad de Ty21a, sin embargo

actualmente se sabe que estas mutaciones no explican por si mismas la atenuación de esta cepa. Otras mutaciones también inducidas por el agente mutagénico no específico deben contribuir a la seguridad de esta vacuna.

Esta vacuna se administra en cuatro dosis orales, produce una protección de aproximadamente 5 años y no provoca reacciones adversas, sin embargo su costo es muy alto, por lo que no se utiliza en campañas de vacunación en países en desarrollo ^{2,20}.

Vacuna de Antígeno capsular Vi. (Thyphim Vi™)

Esta vacuna esta compuesta por el polisacárido Vi de la superficie celular extraído de la cepa Ty21 de *Salmonella typhi* ^{22,23}. El organismo se crece en medio de cultivo y el polisacárido capsular se precipita del cultivo con bromuro de hexadeciltrimetilamonio y se purifica por centrifugación diferencial y precipitación. Este método de extracción da por resultado un polisacárido Vi no desnaturalizado que preserva sus residuos O- y N- acetilos. La potencia y capacidad protectora del polisacárido Vi depende del peso molecular y la cantidad de residuos o-acetilo.

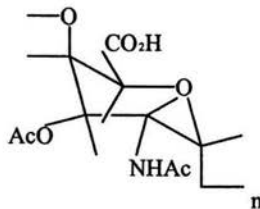


Fig. 3. Composición química del polisacárido Vi, un homopolímero de (1→4)- α -D-GalpANAC que es acetilado variablemente en el carbono 3 ².

Esta vacuna no provoca efectos adversos notorios, sin embargo por su naturaleza polisacáridica la protección proporcionada es de corta duración, aproximadamente 3 años ya que no induce memoria, por lo que no es ideal para utilizarse en zonas endémicas ². Además el reporte de brotes de tifoidea por *S. typhi* sin Ag Vi ², hace necesario buscar nuevas vacunas. Esta vacuna ha sido conjugada con el toxoide tetánico con el fin de incrementar la capacidad protectora y la memoria inmunológicas inducidas por el Ag Vi. Esta vacuna se encuentra en estudios de fase 3 de desarrollo de vacunas².

* Moléculas inmunodominantes de *S. typhi*

En la búsqueda de nuevas vacunas que ofrezcan una mayor protección por más tiempo, se estudiaron los componentes de la bacteria para encontrar las moléculas inmunodominantes. Los anticuerpos contra el LPS (antígeno O) correlacionan con la infección, no obstante, no inducen protección al igual que los anticuerpos contra el antígeno flagelar H, aunque se ha encontrado que la proteína de flagelo FliC produce cierta protección. Las proteínas de membrana externa (Omps) de *Salmonella typhi* provocan una protección del 100% del reto con 500 DL₅₀ de la bacteria virulenta en ratones ²⁴.

Las Omps de *Salmonella typhi* son principalmente las porinas OmpC, OmpF, etc., y la proteína modificable por calor OmpA. Estudios realizados con sueros de pacientes con fiebre tifoidea en fase convaleciente demuestran que la mayor parte de las inmunoglobulinas de clase IgG reconocen a las porinas ²⁵.

* La membrana externa.

Las células eucariontes así como las bacterias poseen membranas que separan su ambiente interno del externo que les permiten realizar actividades necesarias como el paso de nutrientes y desechos (Figura 4). Para realizar estas funciones, las membranas tienen vías de comunicación y transporte que consisten en receptores y canales ²⁶.

Las bacterias Gram-negativas están formadas por una membrana citoplasmática delgada y una membrana externa mucho más resistente, separadas por el espacio periplásmico. La membrana externa que se encuentra rodeando a la capa de peptidoglicana tiene varias funciones importantes:

1. Constituye una barrera para antibióticos, detergentes y otras sustancias tóxicas para la célula.
2. Contiene cadenas de carbohidratos hidrofílicos, generalmente cargados negativamente, que le ayudan a evitar la fagocitosis.
3. Su estructura superficial ha sufrido diversificación considerable con lo cual evade anticuerpos existentes y evita la digestión enzimática.
4. Contiene maquinaria para adherirse a componentes superficiales de las células del hospedero.

La membrana externa contiene al menos dos tipos de lípidos: LPS (distribuido únicamente en la capa externa de la membrana), fosfolípidos (distribuidos predominantemente, sino es que únicamente, en la porción interna de la bicapa), así como también proteínas características totalmente diferentes a las que componen la membrana citoplasmática entre las que dominan la lipoproteína mureína, cuya función es básicamente estructural, proteínas involucradas en

procesos de difusión específica, proteína OmpA, algunas enzimas como fosfolipasa A1 y proteasas además de porinas^{27,28}.

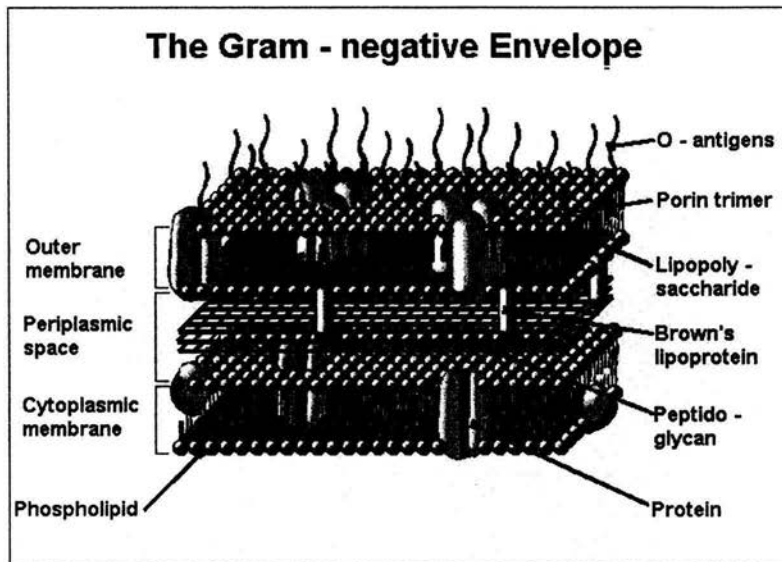


Fig. 4 Esquema de la membrana de las bacterias Gram-negativas²⁹.

* Porinas

Las porinas son poros o canales protéicos no específicos que pueden ser atravesados por pequeñas moléculas hidrofílicas. En la membrana externa se encuentran otras proteínas que funcionan como canales de difusión específicos y facilitan el paso de di, tri y oligosacáridos.

Las porinas se encuentran formando parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos. Forman canales o poros que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas con límite de exclusión de solutos aproximadamente de 600Da. Estas proteínas transmembranales se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a un barril y cada homotrímero es muy estable a la acción de detergentes y proteasas (Figura 4)³⁰.

El término porina fue empleado por primera vez por Nakae para señalar en *Escherichi coli* las propiedades de difusión general de las proteínas que forman poros, este tipo de canales permiten el paso de moléculas menores a 600Da, pero también facilitan el paso de cationes o aniones con cierto grado de selectividad, incluso algunas porinas como LamB y Tsx poseen alta selectividad para solutos como maltodextrina y nucleótidos respectivamente^{31,32}.

Debido a la hidrofobicidad de las porinas, no se posee información cristalográfica de la mayoría de estas proteínas transmembranales. La primer porina en cristalizarse dando los primeros datos sobre su estructura mediante

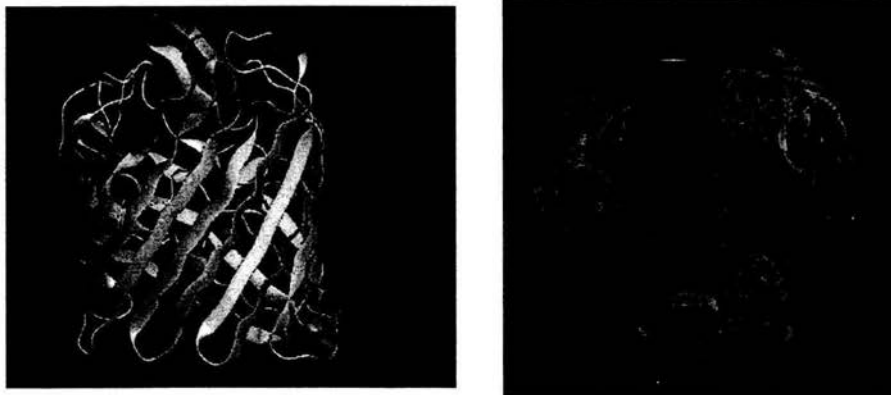
difracción de rayos X fue OmpF de *E. Coli*, obtenida por Garavito y Ronsenbursch³³. Se demostró que son trímeros compuestos de subunidades idénticas, cada subunidad consiste de 16 hojas β -plegadas antiparalelas unidas por asas con algunas α - hélices intercaladas. Cada monómero expone ocho asas cortas hacia el espacio periplásmico y ocho asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. La forma cilíndrica que caracteriza a las porinas se forma al cerrarse las estructuras β -plegadas de forma pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1³¹ (Figura 5).

La entrada al poro la delimitan largas prolongaciones del cilindro que al inclinarse hacia el centro del canal restringen su acceso. A la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de la hoja β -3 hacia el interior lo que constituye la zona de restricción que determina el paso de moléculas por su tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones hasta el otro extremo que desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria. Esto le confiere una forma parecida a un reloj de arena. En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, que está rodeado de "cinturones" de aminoácidos aromáticos que por su orientación e interacción con la membrana le permiten anclarse fuertemente a la misma³¹.

La estructura del trímero se forma mediante el entrecruzamiento de regiones hidrofóbicas de las vueltas β -15 y β -16, donde los diez residuos carboxilo

de la región β -16, en particular el último (una fenilalanina conservada en las porinas) son esenciales para el ensamblaje correcto y estabilidad de las porinas. Además la inserción de la hoja β -2 de una porina en el espacio que deja la internalización de la hoja β -3 en el poro de la porina adyacente y la inserción de su respectiva hoja β -2 en el espacio de la tercera, refuerza la forma trimerita^{26,30,34}. Las porinas entre si presentan gran homología, siendo las regiones más conservadas los segmentos β transmembranales y las más variables las asas externas³⁵.

En *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se han identificado las porinas OmpC, OmpF y PhoE, además de OmpD solo presente en *S. typhimurium*. En condiciones de laboratorio *S. typhi* sintetiza OmpC y OmpF además de otra proteína de membrana externa OmpA³⁶.



AFig. 5 **A)** Modelo del monómero de la porina OmpF de *E. coli*³⁷ **B)** Modelo del trímero de la porina OmpF de *E. coli*³⁸.

La cantidad de porinas presente en la membrana externa es relativamente constante aproximadamente de 2×10^5 siendo además una de las proteínas más abundantes en términos de masa que pueden llegar a representar hasta un 2% de las proteínas totales en la célula ³⁹. Se ha señalado que la cantidad relativa de las porinas OmpF, OmpC y PhoE de *E. coli* y *S. typhimurium*, son reguladas por las condiciones del medio como son la osmolaridad, temperatura, concentración de fosfatos y disponibilidad de oxígeno ³². PhoE sólo se expresa bajo condiciones de escasez de fosfatos ²⁷. La regulación recíproca de las porinas se ha propuesto como una respuesta adaptativa de las bacterias a diferentes entornos ³¹.

*** Actividad Biológica de las porinas.**

Las proteínas de las bacterias Gram-negativas se han utilizado como acarreadores para mejorar la respuesta inmune a diferentes antígenos o como antígenos candidatos a vacuna ^{40,41}.

Durante la interacción con el hospedero, las porinas de gran parte de las bacterias Gram-negativas, incluyendo *Salmonella*, activan al sistema inmune tanto innato como adaptativo y tienen actividades biológicas diversas en diferentes células eucarióticas. Por ejemplo, la inoculación de porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la pata de ratas induce edema de manera dosis dependiente y que este no se encuentra asociado a complemento, también se ha visto que las porinas son pirogénicas en conejos y que este fenómeno no se encuentra relacionado con contaminación de LPS ⁴².

Se tiene evidencia de que las porinas de *S. typhimurium* inducen aumento de TNF α , interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 6 (IL-6) en monocitos humanos y de IFN- γ e interleucina 4 (IL-4) en linfocitos humanos ⁴².

Entre los efectos generados por las porinas se encuentra el de inducir aumento de NO en macrófagos peritoneales de ratón tratados con IFN- γ ⁴².

Utilizando células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y células de sangre periférica humana se encontró que las porinas de *S. typhimurium* pueden estimular la migración de leucocitos a través del endotelio previamente activado con IL-1 β o sin activar; y tienen influencia en el aumento de la expresión de B7-2 en los linfocitos B.⁴²

Recientemente se demostró que las porinas de *Neisseria*, se unen a uno de los receptores de la familia de receptores de reconocimiento patrón (PRR), el toll like receptor-2 (TLR-2) que unen a moléculas llamadas PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos ^{43,44}.

Por otro lado, Galdiero *et al* reportaron recientemente que las porinas de *S. typhimurium* activan los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en la línea celular U937 ⁴², a través de la vía de señalización de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK), participando de manera muy importante p38. Esta activación es diferente en tiempo y elementos a la activación generada por el LPS en la misma célula, mediante la utilización de inhibidores ⁴².

* Diferencias entre OmpC y OmpF de *S. typhi*.

En *S. typhi*, la porina OmpC se presenta de manera constante tanto en alta como en baja osmolaridad, mientras que OmpF se osmorregula de manera similar a la de *E. coli* y *S. typhimurium*³². En un medio con contenido de nutrientes pobre y baja temperatura, la porina OmpF se expresa preferentemente en cambio la expresión de OmpC se efectúa cuando la bacteria se desarrolla en un medio con alto contenido de nutrientes, como el intestino de un hospedero mamífero, donde se presentan condiciones de alta osmolaridad, temperatura y baja disponibilidad de oxígeno. La concentración de oxígeno influye en la expresión de las porinas, en anaerobiosis se induce la expresión de OmpC en *S. typhi* y *E. coli*, sin embargo, OmpF se desregula. Con respecto a la temperatura, cuando esta cambia de 30°C a 37°C se induce OmpC en *S. typhi*⁴⁵.

La expresión de las porinas se regula mediante el operón *ompB* que codifica para las proteínas OmpR y EnvZ³⁶.

La porina OmpC por tener un diámetro mas pequeño, reduce la permeabilidad a las sales biliares y otras moléculas hidrofóbicas grandes, también a los antibióticos, pero aun permite aproximadamente el 50% de la permeabilidad de OmpF para la glucosa. OmpC es mas útil para la bacteria dentro del hospedero debido a que restringe la entrada de solutos dañinos para la misma, además de que dentro del hospedero se encuentran condiciones suficientes de nutrientes para su supervivencia⁴⁶.

Mientras que el diámetro de OmpF es mas grande que el de OmpC lo que le permite tener un flujo mas alto para moléculas importantes como la glucosa ⁴⁷.

Porina	Radio	Peso molecular	Osmolaridad	Temperatura	Concentración de oxígeno
OmpF	0.58nm	38306 Da	Se expresa a baja osmolaridad	Menor expresión a 37°C	Se expresa mayormente en aerobiosis
OmpC	0.54nm	37083 Da	Expresión Constante	Mayor expresión a 37°C	Se expresa mayormente en anaerobiosis

Tabla 2. Diferencias en la estructura y expresión de las porinas OmpC y OmpF⁴⁵⁻⁴⁷

*** Respuesta inmune contra Porinas de *Salmonella typhi*.**

Debido a que uno de los blancos de la respuesta inmune contra *S. typhi* son las porinas, éstas se purificaron y los estudios de protección en ratones demostraron que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. typhi* ⁴⁸. También se demostró que estas proteínas son el blanco no sólo de los anticuerpos sino también de linfocitos T en humanos que se recuperan de la enfermedad y en individuos vacunados con la cepa atenuada Ty21a. Resultados obtenidos en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio ⁴⁹ indican que la vacuna oral de Germanier induce respuesta inmune celular contra porinas y OMPs de *S. typhi* probablemente debida a una infección autolimitada producida

por la cepa Ty21a capaz de generar protección a través de respuestas celulares y humorales similares a aquellas que se generan en pacientes convalecientes de fiebre tifoidea. Estos resultados también muestran que las porinas son buenos inmunógenos y que funcionan como blanco de la respuesta inmune celular contra *S. typhi*. Tanto las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con fiebre tifoidea como las PBMCs de voluntarios humanos vacunados oralmente con Ty21a respondieron contra porinas y proteínas de membrana externa de *S. typhi*⁴⁹.

Por ello en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, se diseñó una vacuna a base de porinas de *S. typhi* a la que se le denominó Isipor, que además de inducir la protección, por su naturaleza proteica, es capaz de producir memoria y no requiere de cadena fría por ser estable a temperatura ambiente. Esta vacuna se encuentra actualmente en estudio clínico fase I⁵⁰.

*** Inmunogenicidad de OmpC y OmpF de *S. typhi***

El estudio molecular demostró que la preparación de porinas está constituida por una mezcla proteica donde fueron identificadas OmpC y OmpF.

Para estudiar los mecanismos de protección inducidos por estas proteínas se identificó y clonó el gen *ompC* de *S. typhi* dentro del plásmido pST13. La porina OmpC de *S. typhi* fue expresada en *E. coli* (UH302) carente de sus propias porinas⁵¹. La OmpCr purificada de esta bacteria fue capaz de conferir protección hasta de un 40% contra el reto con 100 DL50 de *S. typhi* en el modelo del ratón⁵¹.

La inmunogenicidad de la porina OmpF de *S. typhi* se estudió purificando la porina de la cepa de *Salmonella typhi* STYC171 la cual carece de la porina OmpC, en este estudio se encontró que la OmpF induce una protección hasta de 60% contra 100DL₅₀, mientras que protege hasta un 90% contra 20DL₅₀⁵². También se probó la capacidad protectora de una mezcla 1:1 de OmpCr y OmpF en la cual se observó que la capacidad protectora de esta es mucho menor a la de las porinas, por lo se necesita aislar la porina OmpC nativa de *Salmonella typhi* para poder estudiar y comparar la participación dentro de la protección de estos dos componentes⁵³.

IV. Planteamiento del problema.

Se ha estudiado que las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (constituidas por las porinas OmpC y OmpF) inducen una protección del 90% contra 500 DL₅₀ del reto con *Salmonella typhi*, estas porinas se están estudiando como candidatos a vacuna contra la fiebre tifoidea en estudios clínicos fase 1. Con el fin de entender los mecanismos moleculares de inducción de protección se encontró que la porina OmpF nativa protege hasta un 60% contra el reto 100 DL₅₀ *S. typhi* e induce una respuesta inmune humoral bactericida elevada y de larga duración. La contribución de OmpC en la protección ha sido estudiada a través de una porina OmpC recombinante (OmpCr) obtenida de *E. coli* UH302pST13, OmpCr protege menos que la OmpF, hasta un 40% contra 100 DL₅₀, sin embargo induce una mayor respuesta humoral bactericida de larga duración. Con el propósito de resolver esta paradoja y dilucidar la contribución verdadera de OmpC en la inducción de la respuesta inmune humoral y protección, en el presente

trabajo se estudió la respuesta inmune humoral bactericida y capacidad protectora de la porina OmpC nativa de *S. typhi*.

V. HIPOTESIS.

La OmpC nativa de *Salmonella enterica* serovar Typhi induce una mejor respuesta inmune humoral bactericida y de protección que OmpF nativa.

VI. OBJETIVO GENERAL.

- ✓ Evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de la porina OmpC nativa de *Salmonella enterica* serovar Typhi y compararla con la de OmpF e Isipor.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✓ Purificar y caracterizar la porina OmpC a partir de la cepa *Salmonella enterica* serovar Typhi STYF 302.
- ✓ Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por OmpC y compararla con OmpF.
- ✓ Evaluar la capacidad bactericida de los anticuerpos inducidos por OmpC y compararla con la inducida por OmpF.
- ✓ Evaluar la capacidad protectora de OmpC y compararla con la de OmpF y la de la mezcla OmpC + OmpF.

VIII. MATERIALES.

* Cepas Bacterianas:

Salmonella enterica serovar Typhi cepa ATCC 9993 (cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC)

Salmonella enterica serovar Typhi cepa STYF 302 (Cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi carente de OmpF)

Salmonella enterica serovar Typhi cepa STYC 171 (Cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi carente de OmpC)

* Animales de laboratorio.

Se utilizaron ratones de cepa BALB/c (lty sensible) hembras y machos de 8-10 semanas (Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental UNAM)

* Biológicos.

Porinas purificadas por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* ATCC 9993.

OmpF purificada por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* STYC 171

OmpCr purificada por el método de Nikaido a partir de *E. coli* cepa UH302/pST13^{31,51}.

Sueros de ratón

Los ratones fueron sangrados por cavidad retroorbital colectando la sangre en tubos microtainer con gel serparador (Becton Dickinson).

La sangre se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero fue almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.

IX. METODOS

Caracterización Bioquímica de las cepas.

Las cepas de *S. typhi*, ATCC 9993 STYC171 y STYF302 fueron caracterizadas bioquímicamente con las siguientes pruebas.

*TSI (Triple azúcar y hierro)

*MIO (movilidad, indol, ornitina)

*Citrato de Simmons.

* Obtención de la Porina OmpC a partir de la cepa STYF302 de *S. typhi*, a través del método de Nikaido modificado.

Se cultivó *S. typhi* STYF302 en 10 L de medio mínimo A (70g K₂HPO₄, 30g KH₂PO₄, 10g (NH₄)₂SO₄, 5g citrato de sodio, 10g extracto de levadura, 50g glucosa, 0.1% MgSO₄) hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 540 nm que corresponde a la fase logarítmica tardía del crecimiento de la bacteria. Se cosechó centrifugando a 7,000 rpm 15 minutos a 4°C, y se lavó 2 veces con una solución de Tris-HCl 0.05M (pH 7.7). La pastilla bacteriana se pesó y se resuspendió en solución de Tris-Cl 0.05M (pH 7.7) hasta obtener 50 mL de suspensión bacteriana. Se rompió la bacteria en un molino Dyno-mill y la suspensión se centrifugó a 7,000 rpm 30 minutos a 4°C .

El sobrenadante se retiró y se trató con 25µL de DNAsa 10000 U/mL y 25µL de RNAsa 10000 U/mL y 2.77 mL de solución de MgCl₂ 1M por cada 10g de biomasa húmeda obtenida de la cosecha, por 30 minutos a 37°C 120 rpm para eliminar el DNA y RNA.

Se ultracentrifugó a 45,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 100ml de solución de Tris HCl-SDS 2%, se incubó 30 minutos a 32°C 120 rpm y se ultracentrifugó a 40,000 rpm, 30 minutos a 20°C. El botón resultante se resuspendió en 25 mL de solución de Tris HCl-SDS 2%, se incubó nuevamente por 30 minutos a 32°C 120 rpm y se ultracentrifugó a 40,000 rpm 30 minutos 20°C. El botón se resuspendió en 20 mL de amortiguador de Nikaido SDS 1% (Tris 0.05M, NaCl 0.4M, EDTA 0.005M) pH 7.7. Se incubó 2 horas a 37°C 120 rpm y se ultracentrifugó a 40,000 rpm 45 minutos a 20°C. Se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante se purificó en una columna de Sephacryl S-200 (XK100 Pharmacia) a un flujo de 5mL/min con amortiguador de Nikaido SDS 0.5% pH 7.7. Se colectó el primer pico obtenido en el cromatograma y se dializó en PBS pH 7.2 durante 4 días para eliminar el SDS.

*** Determinación de la Dosis Letal Media DL₅₀**

Dado que la *S. typhi* no es un patógeno que cause infección en ratones se utilizó un modelo infeccioso utilizando mucina por vía intraperitoneal para simular el proceso infeccioso.

Se creció la bacteria hasta alcanzar una fase logarítmica temprana sobre una caja de agar soya tripticaseína (Bioxon), se resuspendió en solución salina isotónica hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 540 nm esta suspensión contiene 1×10^9 ufc/ml. A partir de esta suspensión se realizaron las diluciones 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10 , 2 en una solución de mucina gástrica (Mucina tipo II: Crudo de estómago de cerdo, SIGMA) al 5% en amortiguador TE (tris 50 mM, EDTA 2.5mM) pH 7.2.

Se realizaron cuentas viables por el método de vaciado en placa con agar soya tripticaseina (Bioxon) de las últimas 3 diluciones para conocer el número exacto de ufc que se inocularon.

Con la dilución 2×10^6 se prepararon 5ml de una suspensión 1.2×10^6 , 6×10^5 , 3×10^5 , 1.5×10^5 y 7.5×10^4 ufc/mL. Cada una de estas diluciones se inoculó a grupos de 6 ratones, 0.5 mL vía intraperitoneal. Los ratones se mantuvieron en observación por 10 días registrando el número de sobrevivientes.

Con el número real de ufc/mL y sobrevivientes se calculó la dosis letal media por el método de Reed y Muench. Se graficaron la cantidad acumulativa de sobrevivientes y muertos para cada dosis, asumiendo que un ratón que murió a una dosis hubiera muerto también en las dosis más altas y que un ratón que sobrevivió a una dosis también hubiera sobrevivido a dosis más bajas. Se calcula el porcentaje de mortalidad para cada dosis. Y se aplica la siguiente ecuación:

$$DL_{50} = NBi + (NBs - NBi) \left(\frac{50\% - Mi}{Ms - Mi} \right)$$

Donde:

DL_{50} = Dosis letal media

NBi = ufc del porcentaje de mortalidad inferior

NBs = ufc del porcentaje de mortalidad superior

Mi = Porcentaje de mortalidad inferior

Ms = Porcentaje de mortalidad superior

*** Ensayo de Anticuerpos Bactericidas**

Se utilizaron los sueros de ratones inmunizados los días 0 y 15, previamente descomplementados con una fuente de complemento externa en presencia de un número de bacterias (~250) en cultivo. Los sueros a ensayar fueron descomplementados calentandolos en un Termoblock a 56°C por 30 minutos. Como fuente de complemento externo se utilizó suero normal de cobayo diluido (1:4) en PBS estéril.

En el ensayo de anticuerpos bactericidas se usaron placas de cultivo de fondo redondo (Corning Incorporated, Costar® 3799) en donde se depositaron las muestras.

Se hicieron diferentes diluciones de los sueros a ensayar para cada una de las fechas, usando PBS estéril como diluyente. Posteriormente, de la dilución 1:10⁵ usada en la cuenta viable y previamente homogeneizada se toman 20µL y se depositaron en cada uno de los pozos con las diluciones de suero. Se utilizó un control estándar de crecimiento con 25µL de bacteria y 50µL de PBS, que dio un número de bacterias en todos los ensayos (~250).

A continuación se agregaron 25µL de complemento en los pozos respectivos. En el ensayo se realizaron controles de complemento agregando 25µL de PBS, 25µL de fuente de complemento y 20µL de bacteria, 25µL de complemento inactivado y 20µL de la solución bacteriana.

Ensayos de protección.

Se utilizaron 15 grupos de 10 ratones los cuales fueron inmunizados con 10µg del antígeno correspondiente por vía intraperitoneal, se reinmunizaron el día 15 y se retaron el día 25 con 24, 120 y 600 DL₅₀ de *S. typhi* y se mantuvieron en observación durante 10 días. La distribución de los grupos se muestra en la siguiente tabla.

Antígeno	Dosis letal
10µg Isipor	24 DL ₅₀
	120 DL ₅₀
	600 DL ₅₀
10µg OmpC	24 DL ₅₀
	120 DL ₅₀
	600 DL ₅₀
10µg OmpF	24 DL ₅₀
	120 DL ₅₀
	600 DL ₅₀
10µg OmpC+10µg OmpF (Mezcla)	24 DL ₅₀
	120 DL ₅₀
	600 DL ₅₀
SSI	24 DL ₅₀
	120 DL ₅₀
	600 DL ₅₀

Tabla 3. Distribución de los grupos de ratones utilizados para el ensayo de protección.

Esquema de inmunización.



X. RESULTADOS.

* Identificación bioquímica de la Cepa.

Se realizaron las pruebas bioquímicas TSI, MIO y Citrato de Simmons para caracterizar las dos cepas utilizadas durante el desarrollo de los experimentos.

Prueba	Característica Evaluada	Características reportadas para <i>S. typhi</i>	Cepa ATCC9993	Cepa STYF302	Cepa STYC171
TSI	Glucosa	+	+	+	+
	Sacarosa/Lactosa	-	-	-	-
	H ₂ S	+	+	+	+
	Producción de gas	-	-	-	-
MIO	Movilidad	+	+	+	+
	Indol	-	-	-	-
	Ornitina	+	+	+	+
Citrato de Simmons	Crecimiento	-	-	-	-

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas ATCC9993, STYF302.

Los resultados anteriores identifican a las cepas como *S. typhi*.

Se comprobó que la cepa STYF302 tiene resistencia a Kanamicina, creciéndola en un medio que contenía este antibiótico, de donde se obtuvo la cepa que se utilizó durante los experimentos.

* Purificación de la proteína.

La porina OmpC nativa se purificó por el método de Nikaido ⁵⁴, las proteínas obtenidas fueron separadas por medio de cromatografía de exclusión molecular obteniéndose diferentes fracciones que se representan en el cromatograma de la figura 5.

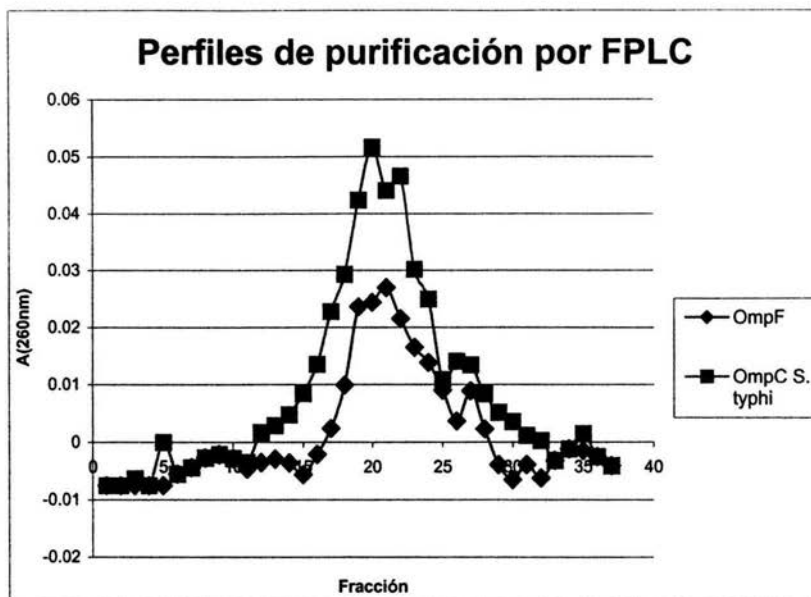


Fig. 6. Comparación de los perfiles de purificación por cromatografía de OmpF, OmpC y OmpCr; en el caso de OmpCr la proteína se obtuvo de la fracción 9 a la 15, para OmpC de la 16 a la 24 y para OmpF de la 16 a la 26.

Con el fin de analizar la eficiencia de la purificación de la OmpC y verificar la pureza e identidad de ésta, se estudiaron muestras de los diferentes pasos de la purificación y el producto final por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 7a). La eliminación de bandas y el enriquecimiento de una banda con un corrimiento electroforético relativo a 36 KDa que corresponde a la porina OmpC, nos indica que la purificación fue eficiente y que se obtuvo un producto sin contaminación con otras proteínas de diferentes pesos moleculares. La porina OmpC nativa correspondió a la banda inferior de las porinas (Fig. 7a, 7b). Con el fin de

verificar la presencia de trimeros de OmpC característicos de esta proteína en su forma nativa, se analizó la proteína purificada en un gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras mostrando el patrón electroforético característico de los trimeros con un peso aproximado de 110-120 Kda (datos no mostrados).

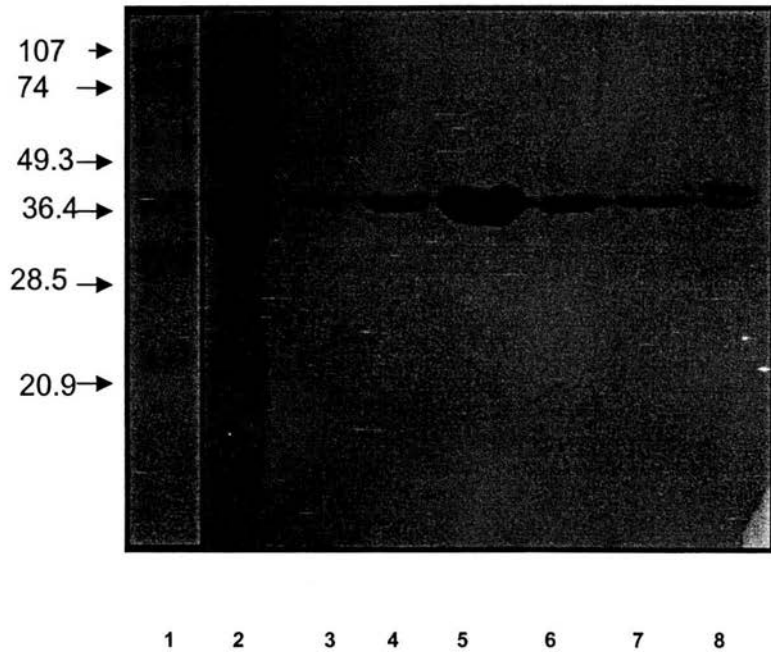


Fig. 7a. SDS-PAGE Acrilamida 12% en condiciones reductoras de los diferentes pasos de purificación del método de Nikaido. 1 Pesos moleculares (New England Biolabs), 2 Sobrenadante del primer paso de Nikaido, 3 Sobrenadante del segundo paso del Nikaido, 4 botón obtenido en el tercer paso de Nikaido, 5 OmpC sin purificar, 6 y 7 OmpC purificada por cromatografía, 8 Isipor.

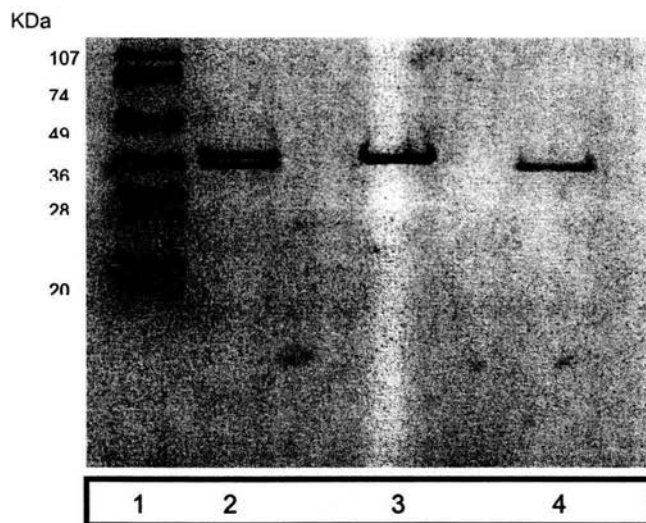


Fig. 7b. SDS-PAGE Arcilamida 12% en condiciones reductoras de las diferentes porinas 1) Pesos moleculares(New England Biolabs), 2) Isipor 3) OmpF 4) OmpC nativa.

Para corroborar la identidad de la proteína purificada se realizó una inmunoelectrotransferencia (western blot). El corrimiento electroforético corresponde a OmpC y la reacción con el anticuerpo anti-porinas nos indica que la OmpC conserva su identidad antigénica aun después de haberse purificado de un cepa diferente que Isipor lo cual indica que la OmpC purificada y la contenida en Isipor tienen las mismas cualidades antigénicas.



Fig. 8. Westernblot 1.Pesos moleculares preteñidos (New England Biolabs), 2. Isipor, 3. OmpC,4. OmpF.

*** Evaluación de la participación de OmpC dentro de la respuesta humoral inducida por Isipor.**

Para evaluar la participación de la porina OmpC dentro de la respuesta humoral y caracterizar los anticuerpos producidos, se inmunizaron grupos de 3 ratones con 10 μ g de OmpC al día cero se reinmunizó al día 15. En el caso de los anticuerpos de clase IgM se observó un título máximo en la respuesta primaria de anticuerpos, y este fue disminuyendo a lo largo de los días. Para los anticuerpos de clase IgG se observaron títulos desde el día 4 después de la inmunización y se obtuvo el título más alto al día 25 después de la reinmunización es decir, en la respuesta secundaria y se pueden observar títulos altos en la respuesta de larga duración; al mismo tiempo se realizó un control con SSI el cual fue negativo en cada uno de los casos.

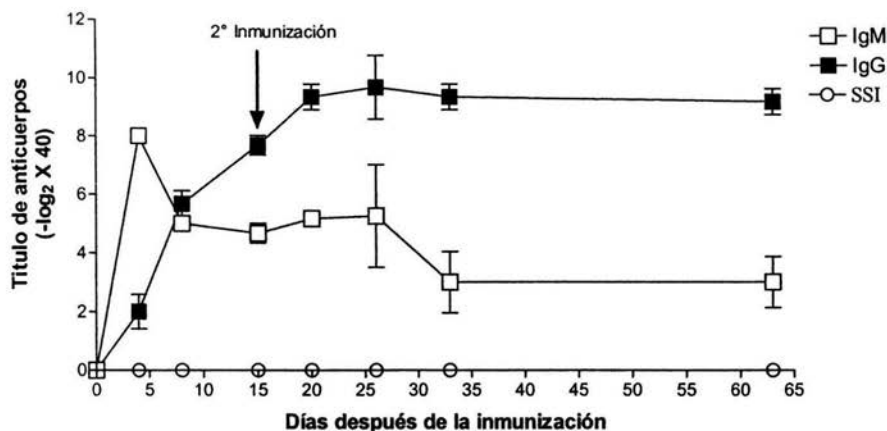


Fig. 9. OmpC induce altos títulos de anticuerpos de clase IgM e IgG de larga duración.

Con el fin de caracterizar la respuesta de anticuerpos IgG se determinaron los isotipos inducidos por OmpC. La respuesta de anticuerpos IgG1 se caracteriza por una elevación del título de anticuerpos a partir de la reimmunización, lo que indica que este tipo de anticuerpos se empiezan a producir en la respuesta secundaria de anticuerpos y además son de larga duración, ya que se pueden observar títulos altos hasta el día 60 después de la primera inmunización. Estos anticuerpos son importantes dentro de la protección ya que funcionan como anticuerpos bloqueadores y estos se ven favorecidos cuando se encuentra presente IL4 es decir un ambiente de tipo Th2^{55 13}.

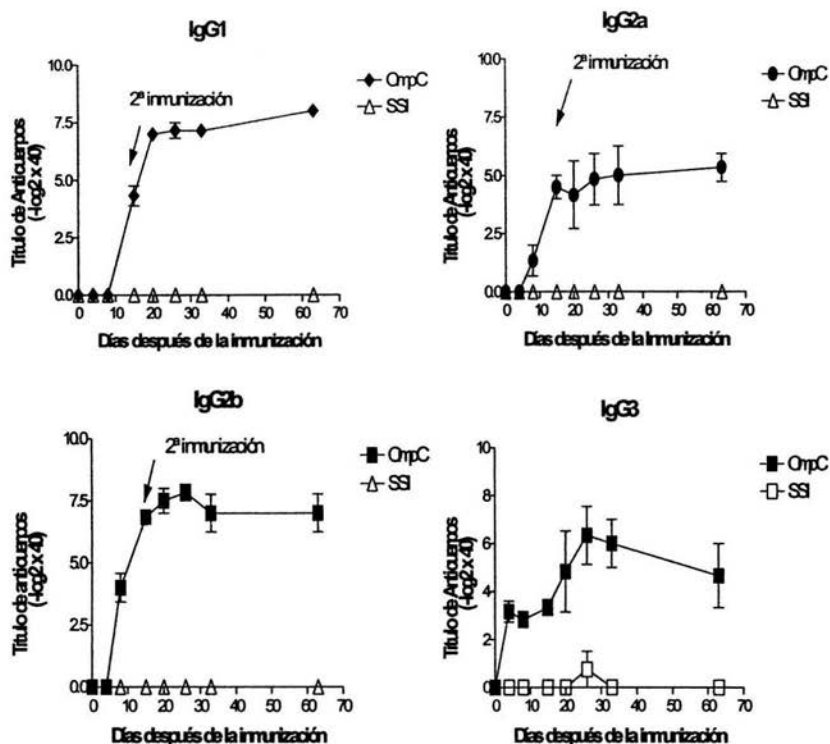


Fig. 10. OmpC induce altos títulos de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 de larga duración en ratones inmunizados con 10 μ g por vía intraperitoneal de la proteína en los días 0 y 15.

En el caso del isotipo IgG2a se observa la aparición de anticuerpos desde el día 8, que aumenta a lo largo del tiempo obteniéndose títulos altos y de larga duración. Este isotipo está relacionado con concentraciones altas de IFN- γ y son fijadores de complemento^{13,18}.

Para el isotipo IgG2b se observa la misma tendencia que para los anticuerpos de clase IgG2a, títulos altos de anticuerpos de larga duración; estos anticuerpos al igual que los de IgG2a, estos anticuerpos son buenos fijadores de complemento.

El caso de IgG3 se encontraron títulos altos de anticuerpos de larga duración estos anticuerpos pueden unirse a la bacteria y proporcionan protección¹³.

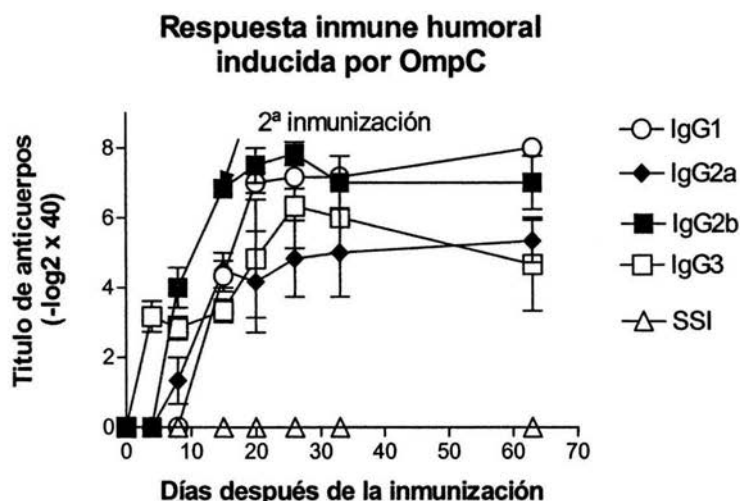


Fig. 11. Grafica comparativa entre las diferentes subclases de IgG inducidas por 10 μ g de OmpC.

*** Contribución de OmpC en la inducción de anticuerpos bactericidas.**

Con el fin de determinar la contribución de OmpC en la capacidad bactericida de los anticuerpos inducidos por Isipor se realizaron ensayos de anticuerpos bactericidas con los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con OmpC y se comparó con la actividad bactericida de los sueros anti-Isipor y anti-OmpF. Como título se consideró la última dilución en la que se obtuvo el 50% de lisis de *S. typhi*. Los resultados nos indican que la OmpC nativa tiene una mayor actividad bactericida que OmpF y menor que Isipor.

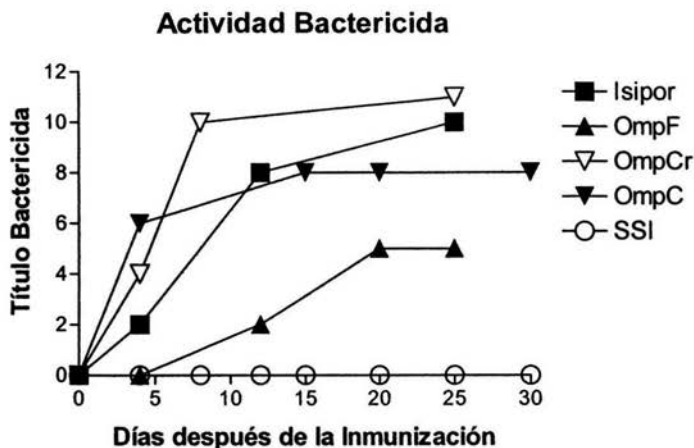


Fig. 12. La porina OmpC es el componente principal de Isipor en la inducción de anticuerpos con actividad bactericida. Grupos de 3 ratones fueron inmunizados con 10 μ g de OmpC por vía intraperitoneal al día 0 y 15. Al día indicado se determinó la actividad lítica de la mezcla de suero sobre *S. typhi*.

* Capacidad protectora de la porina OmpC

Con el fin de determinar la contribución de OmpC en la protección inducida por Isipor, se realizaron ensayos de protección los ratones se mantuvieron en observación durante 10 días.

Los retos se realizaron considerando que una DL₅₀ es equivalente a 117000 ufc de acuerdo a ensayos previos (datos no mostrados) en donde se determinó este número de bacterias.

Después de haber realizado el reto se observó el porcentaje de supervivencia durante los 10 días posteriores al reto.

Antígeno(cantidad en inmunización y reinmunización)	Dosis letal	Porcentaje de Supervivencia
10µg Isipor	24 DL ₅₀	100
	120 DL ₅₀	100
	600 DL ₅₀	90
10µg OmpC	24 DL ₅₀	70
	120 DL ₅₀	30
	600 DL ₅₀	0
10µg OmpCr	24 DL ₅₀	20
	120 DL ₅₀	20
	600 DL ₅₀	0
10µg OmpF	24 DL ₅₀	60
	120 DL ₅₀	20
	600 DL ₅₀	0
10µgOmpC+10µgOmpF (Mezcla)	24 DL ₅₀	50
	120 DL ₅₀	30
	600 DL ₅₀	10
SSI	24 DL ₅₀	0
	120 DL ₅₀	0
	600 DL ₅₀	0

Tabla 4. Ensayo de protección, Se muestra el antígeno inmunizado, DL₅₀ Utilizada y porcentaje de supervivencia de cada grupo del ensayo de protección.

La porina OmpC es capaz de inducir la protección hasta de 70% contra el reto de 24DL₅₀ y hasta un 30% contra le reto de 120DL₅₀ de *S. typhi*, el efecto protector de esta porina no es suficiente para evitar la muerte de los ratones a 600DL₅₀.

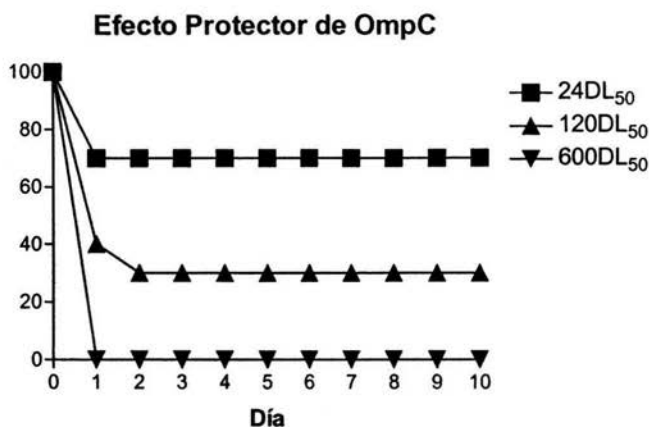


Fig. 13. Capacidad protectora de OmpC frente a 24,120 y 600 DL₅₀ de *S. typhi* durante un periodo de 10 días después del reto.

La mezcla OmpC y OmpF fue capaz inducir protección hasta de un 50% contra 24 DL₅₀, 30% contra 120 DL₅₀ y hasta un 10% contra 600 DL₅₀ de *S. typhi* esta protección se encuentra muy por debajo de la que induce Isipor (obtenida de la cepa silvestre).

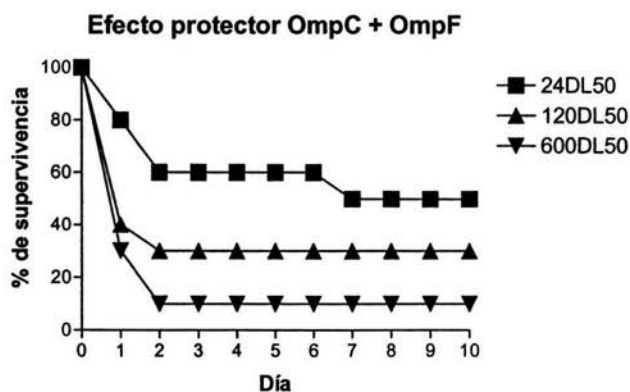


Fig. 14. Capacidad protectora de la mezcla OmpC + OmpF frente a 24,120 y 600 DL₅₀ de *S. typhi* durante un periodo de 10 días después del reto.

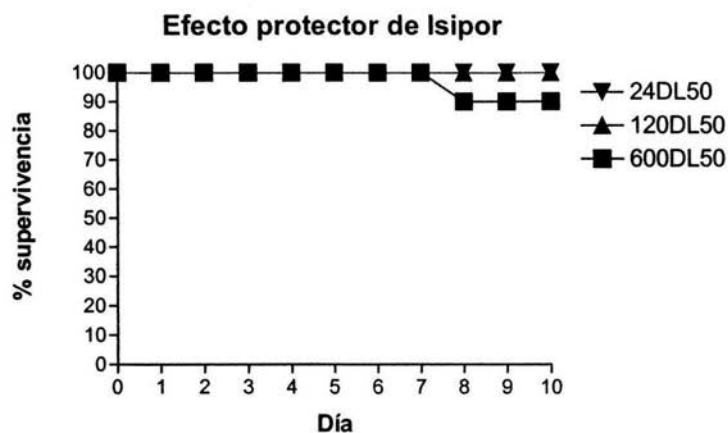


Fig. 15. Capacidad protectora de Isipor frente a 24,120 y 600 DL₅₀ de *S. typhi* durante un periodo de 10 días después del reto.

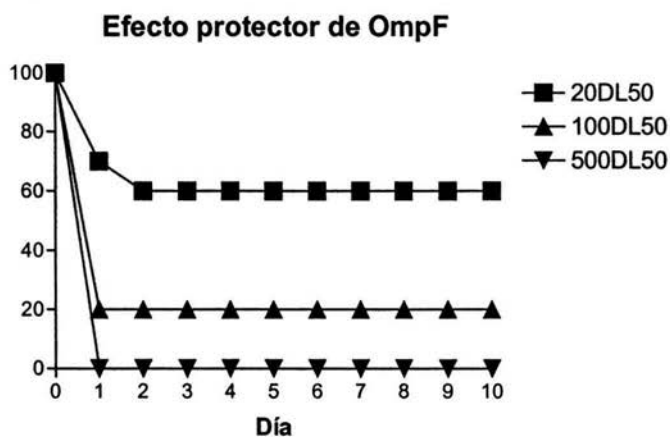


Fig. 16. Capacidad protectora de OmpF frente a 24,120 y 600 DL₅₀ de *S. typhi* durante un periodo de 10 días después del reto.

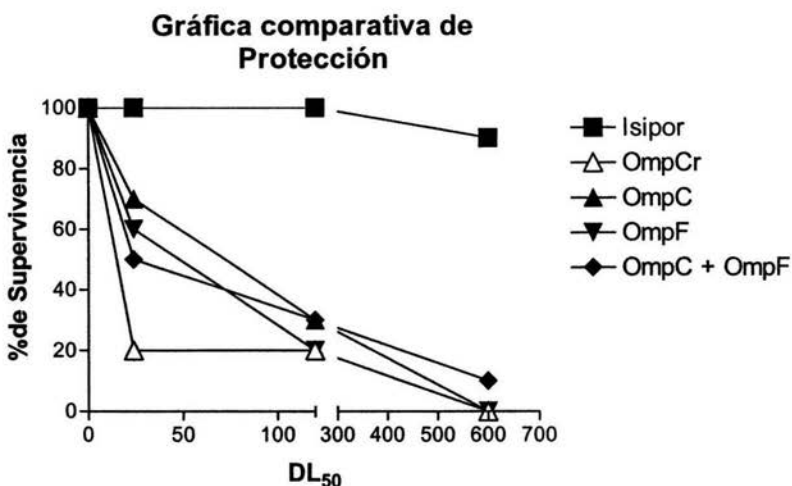


Fig. 17. Comparación de la capacidad protectora de Porinas OmpC, OmpF y de la mezcla OmpC + OmpF durante 10 días posteriores al reto.

Para determinar la contribución de OmpC en la protección, se comparó la capacidad protectora de Isipor, OmpF y OmpC. Isipor protege hasta 100% contra 24 y 120 DL₅₀ y hasta en un 90% contra 600DL₅₀ de *S. typhi* como ha sido reportado previamente. OmpF indujo una protección hasta de 60% contra 24DL₅₀ y de 20% contra 120DL₅₀. No se observó protección en el caso de 600DL₅₀ (Fig. 17). Con base en los resultados obtenidos en la respuesta humoral, capacidad bactericida y protección podemos concluir que OmpC es la porina que tiene el papel dominante en la inducción de protección inducido por Isipor, Sin embargo la contribución de ambas porinas es importante para incrementar el nivel protector, aunque OmpC y OmpF no fueron capaces de reconstituir el efecto protector de Isipor, dejando en evidencia la participación de otros factores presentes en Isipor involucrados en la inducción de protección.

XI. DISCUSION.

En el presente trabajo se reporta primero la purificación de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar typhi uno de los componentes de la vacuna que no se había purificado en su forma nativa, para poder realizar esto, se utilizó una cepa carente de OmpF. Se caracterizó primero la cepa por medio de pruebas bioquímicas y una vez que se tuvo la certeza de que se trataba de la cepa correcta se purificó la proteína por el método de Nikaido y cromatografía de exclusión molecular. La proteína obtenida fue sometida a pruebas para garantizar su identidad, como electroforesis SDS-PAGE y western blot en los cuales de acuerdo a los patrones de corrimiento electroforético se pudo identificar a la proteína, además de que en el caso del western blot se observó la identidad antigénica de la proteína. Otro control que se realizó y que es muy importante para poder establecer una comparación entre los resultados es la cuantificación de LPS presente en la mezcla mediante la cuantificación de KDO, se observó que las muestras se encontraban por debajo del límite de detección de la prueba, aun cuando se sabe que no se puede eliminar completamente el LPS contenido en las porinas debido a que al parecer contienen una pequeña cantidad dentro de su estructura (El LPS es un activador policlonal de linfocitos aún en cantidades de nanogramos), sin embargo como se mencionó en la introducción, se han hecho estudios en los que se ha bloqueado la acción del LPS y en los que se puede observar que el efecto obtenido se debe únicamente a las porinas⁴².

Una vez purificada OmpC como segunda parte del trabajo se observó su contribución dentro de la producción de anticuerpos bactericidas y en la protección.

En el caso de la producción de anticuerpos, se pudo observar que hay títulos altos desde los primeros días después de la inmunización tanto para IgM como para IgG lo cual nos indica que la OmpC es un antígeno altamente inmunogénico. En el caso de los anticuerpos de clase IgM se puede observar una gran producción de estos al día 4 (título de 8) y esta producción va disminuyendo a lo largo de los días pero sin desaparecer, esto nos habla de un antígeno altamente inmunogénico y que produce una respuesta de larga duración, al comparar esta respuesta con las obtenidas para Isipor y OmpF, se puede observar, que en el caso de OmpF se inducen títulos bajos de esta clase de anticuerpos y estos también son de larga duración aunque con títulos más altos en esta parte de la curva que para OmpC, en el caso de Isipor se observan títulos altos de IgM desde un principio al igual que en el caso de OmpC y una respuesta de larga duración con títulos parecidos a los inducidos por OmpF por lo cual se puede apreciar que ambas porinas participan activamente dentro de la producción de anticuerpos.

Para los anticuerpos de clase IgG, se puede observar que estos se encuentran desde la respuesta primaria de anticuerpos, para OmpC y se ve un claro incremento en la respuesta secundaria, la presencia de anticuerpos de clase IgG desde los primeros días se puede deber por una parte a cierta reactividad cruzada con algún antígeno que se pudiera encontrar en la flora habitual del ratón o a que estos antígenos sean reconocidos por células B1 las cuales tienen la capacidad de producir inmunoglobulinas de manera espontánea preferentemente de clase IgM, pero también de clase IgG. La respuesta secundaria de anticuerpos es de larga duración y como se puede observar con títulos extremadamente altos

para una respuesta de memoria (alrededor de 9 al día 60). Los anticuerpos inducidos por las porinas siguen la misma tendencia que para la OmpC, mientras que en el caso de inmunización con OmpF no se encuentra una respuesta de IgG en etapas tempranas, por lo cual la porina OmpC es la que produce una respuesta primaria de IgG dentro de las porinas.

Por último, al detectar los isotipos de IgG presentes se puede observar una gran cantidad de anticuerpos IgG2a y de IgG2b los cuales son fijadores de complemento, además de títulos altos de IgG1 que se ven favorecidos cuando en el microambiente se encuentran concentraciones altas de IL-4 característica de una respuesta de tipo Th2 y como se mencionó anteriormente se cuenta con evidencia de que otras porinas (*S. typhimurium*) inducen la producción de esta citocina en linfocitos humanos⁴² lo cual sugiere que OmpC tiene un comportamiento similar; mientras que también se observan títulos altos de anticuerpos IgG2a los cuales se favorecen en un ambiente con altas cantidades de IFN- γ , lo cual nos sugiere una respuesta de tipo Th1 correlacionando con lo reportado en la literatura, que las porinas *S. typhimurium* inducen producción de IFN- γ en linfocitos humanos⁴². Tomando en cuenta la cinética de estos isotipos se puede ver claramente que se encuentran títulos altos de anticuerpos que pueden participar en las etapas tempranas de la infección, ya sea como anticuerpos bloqueadores o bactericidas, y también dado al perfil de anticuerpos relacionado con un perfil de Th1, estos mediarían una respuesta que podría ser más efectiva en la etapa tardía de infección, es decir cuando *S. typhi* se comporta como patógeno intracelular ya que sugieren una respuesta celular citotóxica, sin

embargo son buenos fijadores de complemento así que también pueden actuar como bactericidas en etapas tempranas.

En los ensayos bactericidas se encontró que la OmpC produce títulos mayores de anticuerpos bactericidas que la OmpF desde el día 4 después de la inmunización y los cuales van en aumento y se mantienen aún al día 30, y como se esperaba, estos son menores a los de Isipor.

En los resultados obtenidos en el estudio de protección realizado para OmpC se encontró una protección de hasta un 70% contra 24DL₅₀ y de 30% contra 120DL₅₀ de *S.typhi*, sin embargo no se encontró protección a 600 DL₅₀. Comparando estos datos con los obtenidos para la OmpF se puede observar que la protección inducida por OmpC es mayor en un 10% tanto para 24 como para 120DL₅₀, esto se puede deber que la porina OmpC se encuentra en una mayor proporción en la superficie de la bacteria y por lo tanto hay una mayor cantidad de sitios de unión para los anticuerpos producidos, por lo cual puede haber una mayor cantidad de complemento fijado a la bacteria, además de que estos anticuerpos pueden funcionar como opsoninas para los macrófagos y de esta manera también se podría ver incrementada la fagocitosis, y posteriormente la activación de otras células de la respuesta inmune haciéndola más eficiente.

En cuanto a la protección ejercida por la mezcla de OmpC y OmpF, se puede ver que esta es mucho menor que la ejercida por Isipor, sin embargo, es la única que induce protección a 600DL₅₀, esto se puede deber a que aunque se encuentran las dos proteínas principales, estas no se encuentran en la proporción real, además de que puede haber otros componentes que estén influyendo dentro de la protección.

Previamente se encontró que OmpF indujo 60% de protección contra 100DL₅₀, sin embargo, en los experimentos aquí reportados observamos una protección de 20% a 120DL₅₀. Desafortunadamente, aunque fue planeado el experimento de la misma forma, la cantidad de bacterias utilizadas para el reto finalmente correspondió a un exceso de bacteria que se tradujo en la diferentes DL₅₀ utilizadas en el experimento.

Tomando en cuenta todos los resultados anteriores podemos decir que la OmpC nativa es el componente principal dentro de la protección inducida por Isipor y que ambas porinas (OmpC y OmpF) son esenciales para la inducción tanto de la protección, como de la respuesta humoral característica de Isipor.

Un punto importante, es el hecho de que la OmpC es el componente mayoritario en la producción de anticuerpos bactericidas ya que la capacidad de OmpF en este rubro es casi nula.

El hecho de que se hayan encontrado títulos de anticuerpos con actividad bactericida sumamente altos para OmpCr, una cinética de anticuerpos igual a la de OmpC y sin embargo una protección menor a la de todas las demás porinas denota que una molécula obtenida de forma recombinante no siempre reproduce de manera exacta la actividad biológica de la molécula original, y que la producción de anticuerpos bactericidas no es el único mecanismo que interviene en la protección contra la infección de *S. typhi* medida por Isipor.

XII. CONCLUSIONES.

- La protección inducida por 10µg de OmpC es de 70% contra 20DL₅₀ y de 30% contra 100DL₅₀.
- La OmpC induce una alta producción de anticuerpos de clase IgM desde los primeros días después de la inmunización y estos son de larga duración.
- La OmpC induce la producción de anticuerpos de clase IgG desde los primeros días después de la inmunización aumentando en la respuesta secundaria, estos anticuerpos son de larga duración, y de todos los isotipos de IgG. .
- La OmpC produce mayor cantidad de anticuerpos bactericidas que OmpF.
- OmpC es el componente principal dentro de la protección inducida por Isipor.
- Ambas porinas (OmpC y OmpF) son esenciales para la inducción tanto de la protección como de la respuesta humoral característica de Isipor

XIII BIBLIOGRAFÍA

1. Keusch GT. Salmonellosis. Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th, 671-676. 1994. McGraw-Hill.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

2. Levine MM. Typhoid fever vaccines. Plotkin SA, Orenstein WA Vaccines. 3rd, 781-814. 1999. USA, Saunders Company.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

3. Caygill,C.P., Hill,M.J., Braddick,M., & Sharp,J.C. Cancer mortality in chronic typhoid and paratyphoid carriers. *Lancet* **343**, 83-84 (1994).
4. Hook EW. Salmonella species (including typhoid fever). Mandell GL et al. 3rd, 1700-1716. 1990. Churchill Livingstone. Principles and Practice of Infectious Diseases.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

5. www.gsk.com.mx/ . 2001.

Ref Type: Electronic Citation

6. F.W.Brenner,R.G.V.F.J.A.R.T.a.B.S. Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2465-2467 (2000).
7. www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm . 2000.

Ref Type: Electronic Citation

8. Romero Cabello, R. *Salmonella*. Microbiología y Parasitología Humana. 298-305. 1999. México, Editorial Médica Panamericana.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

9. Mastroeni,P. & Menager,N. Development of acquired immunity to Salmonella. *J. Med. Microbiol.* **52**, 453-459 (2003).
10. Levine,M.M., Tacket,C.O., & Sztein,M.B. Host-Salmonella interaction: human trials. *Microbes. Infect.* **3**, 1271-1279 (2001).

11. Mittrucker, H.W. & Kaufmann, S.H. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 457-463 (2000).
12. Raupach, B. & Kaufmann, S.H. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 417-428 (2001).
13. Lefeber, D.J., Benaissa-Trouw, B., Vliegenthart, J.F., Kamerling, J.P., Jansen, W.T., Kraaijeveld, K., & Snippe, H. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect. Immun.* **71**, 6915-6920 (2003).
14. Velikovskiy, C.A., Goldbaum, F.A., Cassataro, J., Estein, S., Bowden, R.A., Bruno, L., Fossati, C.A., & Giambartolomei, G.H. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect. Immun.* **71**, 5750-5755 (2003).
15. Morokata, T., Ishikawa, J., & Yamada, T. Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol Lett.* **72**, 119-126 (2000).
16. Ramirez Saldaña Maricela. Influencia de las modificaciones estructurales del lípido A del lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* sobre la respuesta de anticuerpos antígeno específica. 2003.

Ref Type: Thesis/Dissertation

17. Mooij, P., Nieuwenhuis, I.G., Knoop, C.J., Doms, R.W., Bogers, W.M., Ten Haaf, P.J., Niphuis, H., Koornstra, W., Bieler, K., Kostler, J., Morein, B., Cafaro, A., Ensoli, B., Wagner, R., & Heeney, J.L. Qualitative T-helper responses to multiple viral antigens correlate with vaccine-induced immunity to simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **78**, 3333-3342 (2004).
18. Lopez-Macias, C., Kalinke, U., Cascalho, M., Wabl, M., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., & Lamarre, A. Secondary rearrangements and hypermutation generate sufficient B cell diversity to mount protective antiviral immunoglobulin responses. *J. Exp. Med.* **189**, 1791-1798 (1999).
19. Rowe, B., Ward, L.R., & Threlfall, E.J. Multidrug-resistant *Salmonella typhi*: a worldwide epidemic. *Clin. Infect. Dis.* **24 Suppl 1**, S106-S109 (1997).
20. Germanier, R. & Fuer, E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**, 553-558 (1975).

21. Germanier,R. & Levine,M.M. The live oral typhoid vaccine Ty21a: recent field trial results. *Ann. Sclavo. Collana. Monogr* **3**, 19-22 (1986).
22. Robbins,J.D. & Robbins,J.B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* **150**, 436-449 (1984).
23. Wong,K.H., Feeley,J.C., Northrup,R.S., & Forlines,M.E. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. I. Isolation and immunologic properties in animals. *Infect. Immun.* **9**, 348-353 (1974).
24. Isibasi,A., Ortiz,V., Vargas,M., Paniagua,J., Gonzalez,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.* **56**, 2953-2959 (1988).
25. Ortiz,V., Isibasi,A., Garcia-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.* **27**, 1640-1645 (1989).
26. Jap,B.K. & Walian,P.J. Structure and functional mechanism of porins. *Physiol Rev.* **76**, 1073-1088 (1996).
27. Nikaido,H.a.V.M. Outer membrane. *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology* **1**, 7-22 (1987).
28. Osborn,M.J.a.W.C.P. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol* **34**, 369-422 (1980).
29. www.brunel.ac.uk/depts/bl/project/.../gramnegi.htm . 2002.

Ref Type: Electronic Citation

30. Nikaido,H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905-3908 (1994).
31. Bing K.Jap and PeterJ.Walian Structure and Functional Mechanism of Porins. *Physiol Rev.* **76**, 1073-1088 (1996).
32. Martinez-Flores,I., Cano,R., Bustamante,V.H., Calva,E., & Puente,J.L. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 556-562 (1999).
33. Garavito,R.M.a.R.J.P. Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial X-ray analysis. *J. Cell. Biol.* **86**, 327-329 (1980).

34. Nikaido,H. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* **97**, 85-100 (1983).
35. Singh,S.P., Singh,S.R., Williams,Y.U., Jones,L., & Abdullah,T. Antigenic determinants of the OmpC porin from Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* **63**, 4600-4605 (1995).
36. Puente,J.L., Verdugo-Rodriguez,A., & Calva,E. Expression of Salmonella typhi and Escherichia coli OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on Escherichia coli OmpR. *Mol. Microbiol* **5**, 1205-1210 (1991).
37. http://medical.faculty.ncl.ac.uk/biomed/sbg/HomePages/HomePage?HomePage_ID=Lakey_JH . 2000.

Ref Type: Electronic Citation

38. Porins.
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=graphics;pdbId=2OMF;page=0;pid=1333994476882> . 2003.

Ref Type: Electronic Citation

39. Neidhardt, Frederick C. Editor. **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. second[1]. 1996. ASM Press.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

40. Gilleland,H.E., Jr., Gilleland,L.B., & Matthews-Greer,J.M. Outer membrane protein F preparation of Pseudomonas aeruginosa as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* **56**, 1017-1022 (1988).
41. Raully,I., Goetsch,L., Haeuw,J.F., Tardieux,C., Baussant,T., Bonnefoy,J.Y., & Corvaia,N. Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of Klebsiella pneumoniae. *Infect. Immun.* **67**, 5547-5551 (1999).
42. Galdiero,M., Vitiello,M., & Galdiero,S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 57-64 (2003).
43. Akira,S., Takeda,K., & Kaisho,T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675-680 (2001).

44. Massari,P., Henneke,P., Ho,Y., Latz,E., Golenbock,D.T., & Wetzler,L.M. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* **168**, 1533-1537 (2002).
45. Contreras,I., Munoz,L., Toro,C.S., & Mora,G.C. Heterologous expression of Escherichia coli porin genes in Salmonella typhi Ty2: regulation by medium osmolarity, temperature and oxygen availability. *FEMS Microbiol Lett.* **133**, 105-111 (1995).
46. Nikaido,H. Outer membrane. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* **1**, (1996).
47. Kenney,L.J. Kinase activity of EnvZ, an osmoregulatory signal transducing protein of Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 303-311 (1997).
48. Isibasi,A., Ortiz-Navarrete,V., Paniagua,J., Pelayo,R., Gonzalez,C.R., Garcia,J.A., & Kumate,J. Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* **10**, 811-813 (1992).
49. Blanco,F., Isibasi,A., Raul,G.C., Ortiz,V., Paniagua,J., Arreguin,C., & Kumate,J. Human cell mediated immunity to porins from Salmonella typhi. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**, 73-80 (1993).
50. Rosa María Salazar-González,C.M.-B.J.C.N.C.J.A.P.-A.M.C.C.L.-M.a.A.I. Induction of cellular immune response and anti-Salmonella typhi Bactericidal Antibodies in human volunteers by immunization with strain specific Porins. *Accepted for publication Immunol Letters* (2003).
51. Isibasi,A., Paniagua,J., Rojo,M.P., Martin,N., Ramirez,G., Gonzalez,C.R., Lopez-Macias,C., Sanchez,J., Kumate,J., & Ortiz-Navarrete,V. Role of porins from Salmonella typhi in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **730**, 350-352 (1994).
52. Gilleland,Jr.H.E.P.M.G.M.J.M.a.B.R.D. Use of purified outer membrane protein F (Porin) preparation of Pseudomonas aeruginosa as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* **44**, 49-54 (1984).
53. Cervantes L. Evaluación de capacidad inmunogénica y protectora de la porina OmpF de Salmonella enterica serovar Typhi. 2003.

Ref Type: Thesis/Dissertation

54. Nikaido,H. Isolation of outer membranes. *Methods Enzymol.* **235**, 225-234 (1994).

55. Clifford M. Snapper and Fred D. Finkelman in *Fundamental Immunology*, Edn. 4. ed. William E. Paul 831-862 (Liippincott-Raven, 1999).
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L., & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
57. Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J., & Carlo, D.J. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* **85**, 595-601 (1978).

XIV. ANEXO.

* Determinación de proteínas por el método de Lowry.

La cantidad de proteína obtenida en la solución de OmpF se cuantificó por el método de Lowry ⁴⁸. Utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) 0.05-0.6 mg/mL

Se tomaron 0.1 ml de la solución de proteína respectivamente y se precipitaron con 20µl de ácido tricloroacético al 72%, centrifugando a 12,000 rpm por 30 minutos. Se adicionaron 200µl de NaOH 0.5 N y se hirvieron por 10 minutos. Se adicionó 1ml de una solución de NaCO₃ 2%, CuSO₄ 0.01% y tartrato de sodio y potasio 0.01%, y 100 µl de reactivo de Folin-Cicalteau 1 N, se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz y se leyó la absorbancia a 750 nm.

La concentración de proteínas se calculó con la siguiente ecuación:

$$mg/ml \text{ de } porinas = \frac{1.751Z(100 - \%H)(\%N_2)}{0.2802VR}$$

donde:

Z= cantidad en µg de ABS de la interpolación de la absorbancia de cada una de las muestras con la curva patrón.

%H= Porcentaje de humedad de la ASB

%N₂=Porcentaje de Nitrógeno de la ASB

V=Volumen en µl de la muestra problema

R=JK

J= factor de corrección del porcentaje de humedad

K=factor de corrección del porcentaje de nitrógeno

Determinación de lipopolisacárido por cuantificación de KDO

La cantidad de lipopolisacárido (LPS) contaminante de la solución de OmpF se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis ⁵⁷, empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.) de 1-20 µg/mL. Se tomó la cantidad correspondiente de la solución y se lleva a 500 µL con H₂SO₄ 0.2N, se hirvió por 30 minutos. Se agregaron 0.25 mL de HIO₄ 0.04M y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0.25mL de NaAsO₂ 2.6, cuando el color café desapareció se agregaron 0.5mL de ácido tiobarbitúrico 0.6% y se hirvió por 15 minutos. Se agregó 1 mL de Dimetilsulfoxido y se leyó la absorbancia a 548 nm. La cantidad de KDO se calculó interpolando la absorbancia de la muestra en la curva patrón

- **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE**

La electroforesis SDS-PAGE de proteínas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Biorad) y sistemas de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.2 % de acrilamida, 0.32% de bis-acrilamida, 0.10% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 4.2% de acrilamida, 0.12% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. Las muestras se analizaron en condiciones reductoras y no reductoras.

Para las condiciones reductoras el amortiguador de muestra contenía además β -mercaptoetanol al 5% y las muestras se hirvieron 3 minutos en él. El corrimiento electroforético se llevó a cabo con 10 mA en el gel introductor y 15 mA en el separador. El amortiguador de corrimiento contenía Tris 0.025M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente los geles se tificaron 30 minutos en una solución de azul de Coomasie R-250 al 0.1% en metanol-ácido acético-agua (5:1:4). Se decoloraron empleando una solución de metanol-ácido acético -agua (1:1:8).

- **Identificación de Proteínas por Inmunoelctrotransferencia (Western blot)**

Las proteínas separadas electroforéticamente, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Micron Hybond-C Amersham), en una unidad de transferencia electrónica (Biorad) por 14 horas a 16V con una solución amortiguadora de transferencia (25mM Tris, 200mM Glicina en metanol-agua 1:4) pH 8.3 .En los siguientes pasos se utiliza la solución amortiguadora TBS (100mM de Tris-Cl y 0.9% de NaCl pH7.5). La membrana de nitrocelulosa se bloquea con una solución de TBS-leche al 5% (Svelty Nestlé) incubando 1 hora a 37°C 60rpm. Se lava con TBS-tween 20 al 0.05% 4 veces y una vez con TBS. Como primer anticuerpo se utiliza suero de ratón en una dilución 1:500 en TBS-leche 5% incubándose por 1.5hr a 37°C 60 rpm. Se lava 5 veces con TBS-tween 20 0.05% y una vez con TBS. Como segundo anticuerpo se utiliza un anticuerpo de cabra anti IgG totales de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Zymed) en una dilución 1:800 en TBS-leche 5%; se incuba i hora a 37°C 60 rpm. Terminada la incubación se lava 7 veces con TBS-Tween 0.05% y una vez con TBS . La

membrana se revela con una solución de 4-Cloro- α -naftol (0.3% 4-cloro- α -naftol en metanol -PBS 1:5 y H₂O₂ 1:1000). Cuando se observan las bandas se lava con agua destilada para detener la reacción.

- **Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA)**

Se recubrieron microplacas de 96 pozos (costar®) con el antígeno correspondiente (OmpF, OmpCr, porinas de *S. typhi*) en una concentración de 10 μ g/mL en amortiguador de carbonatos pH 9.5, y se incubó durante 1 hora a 37°C (incubadora Shel-lab, 2100) y toda la noche a 4°C. Se dieron cuatro lavados con una solución agua - Tween 0.1% y se bloquearon con PBS - leche 5.0% (Svelty, Nestle) incubando durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavaron 4 veces con la solución de lavado usada anteriormente.

El primer anticuerpo (sueros de ratón) se agregó en diluciones seriadas dobles, partiendo de una dilución 1:40, en PBS - leche 5% y se incubó durante 1.5 horas a 37°C. Nuevamente se lavaron las placas 4 veces. El segundo anticuerpo (anticuerpo de cabra anti IgM, IgG totales, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 de ratón conjugado a peroxidasa de rábano, Zymed) se añadió en una dilución 1:1000 en PBS - leche 5% y se incubó durante 1 hora a 37°C. Por último se lavaron 4 veces y se revelaron agregando una solución de 0.5mg/mL de o-fenilendiamina en solución amortiguadora de citratos pH 5.6 y H₂O₂, dejando incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La reacción se detiene agregando H₂SO₄ 2.5 N. Se determinó la densidad óptica a 490 nm utilizando un lector de microplacas (Dynex Technologies, MRX II). Los títulos del suero se

determinaron a partir del número de diluciones consecutivas del suero antes de perder la señal de la reacción, tomando en cuenta el triple del valor promedio de los controles negativos para determinar ese punto. Se utilizaron como controles positivos sueros de ratón previamente titulados para el antígeno respectivo.