

11281

3^{2ej}

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS SINGENICAS

MURINAS A PCRINAS DE

Salmonella typhi 9, 12, Vid

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)

P R E S E N T A
MARIA VICTORIA MEJIA MEJIA

México, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

I.	RESUMEN.....	1.
II.	INTRODUCCION.....	3.
III.	MATERIALES Y METODOS.....	27.
1.)	<u>METODOS BACTERIOLOGICOS Y BIOQUIMICOS:</u>	
1.1.	CEPAS BACTERIANAS.....	27.
1.2.	CEPAS MURINAS Y ESQUEMA DE IMMUNIZACION.....	27.
1.3.	CULTIVO Y COSECHA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....	28.
1.4.	OBTENCION Y AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME).....	29.
1.5.	OBTENCION Y PURIFICACION DE PORINAS.....	30.
2.)	<u>METODOS ANALITICOS:</u>	
2.1.	DETERMINACION DE LIPOPOLISACARIDO (LPS).....	31.
2.2.	DETERMINACION DE PROTEINAS.....	31.
2.3.	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS - PAGE).....	31.
2.4.	ENSAYO IMMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA)....	32.
2.5.	MEDICION DEL TITULO DE ANTICUERPOS.....	33.
3.)	<u>METODOS IMMUNOLOGICOS:</u>	
3.1.	OBTENCION DE CELULAS ESPLENICAS.....	33.
3.2.	ACTIVACION DE CELULAS <i>in vitro</i>	34.
3.3.	MEDICION DE ACTIVACION DE ESPLENOCITOS.....	35.
IV.	<u>RESULTADOS.</u>	
A.	Aislamiento y caracterización de proteínas de membrana externa de <i>Salmonella typhi</i>	36.
a.)	Obtención de porinas.....	36.

B. Estimulación de esplenocitos inmunes de diversas cepas murinas singénicas.

1.) Respuesta inmune celular a proteínas de diversas cepas bacterianas 43.

2.) Respuesta inmune celular en híbridos F1 (BALB/c x C3H/HeJ) y F1 (BALB/c x C57BL/6) a proteínas de *Shigella flexneri*, *S. typhimurium* y *E. coli*..... 47.

3.) Respuesta inmune celular a Lipopolisacárido por ratones C3H/HeJ y C57BL/6J.....47.

4.) Respuesta inmune celular a Lipopolisacárido e híbridos F1 (BALB/c x C3H/HeJ)..... 50 .

C. Respuesta inmune humoral a proteínas, proteínas de membrana externa y lipopolisacárido en diversas cepas murinas singénicas.

1.) Respuesta inmune humoral a proteínas de diversas cepas bacterianas 50.

2.) Respuesta inmune humoral a proteínas en híbridos F1 (BALB/c x C57BL/6) y F1 (BALB/c x C3H/HeJ).....53.

3.) Respuesta inmune humoral a LPS en cepas singénicas murinas 53 .

4.) Respuesta inmune humoral a LPS en híbridos F1 (BALB/c x C57BL/6) y F1 (BALB/c x C3H/HeJ).53.

V. DISCUSION..... 57.

VI. BIBLIOGRAFIA.....62.

INDICE DE FIGURAS.

Fig.1.	Envolupa celular de las bacterias gram negativas	9.
Fig.2.	Organización de las moléculas de lipopolisacárido externa.	10.
Fig.3.	Complejo de histocompatibilidad del ratón (H-2).	19.
Fig.4	Moléculas clase I.	20.
Fig.5.	Moléculas clase II.	20.
Fig.6.	Análisis electroforético de proteínas de membrana externa de diferentes cepas de <i>Salmonella</i>	37.
Fig.7,8,9	Perfil cromatográfico de exclusión molecular de proteínas de membrana externa de <i>S.typhimurium</i> , <i>S. typhi</i> y <i>E.</i> <i>coli</i>	39, 40, 41.
Fig.10.	Análisis electroforético de porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,14d purificadas por cromatografía de exclusión molecular.	42.
Fig.11,12,13.	Respuesta inmune celular a porinas de diversas cepas bacterianas en diferentes cepas murinas.	44, 45, 46.
Fig.14	Respuesta inmune celular en híbridos F1 (BALB/c x C57BL/6) y F1(BALB/c x C57BL/6) a porinas de <i>S.</i> <i>typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>E.coli</i>	48.

Fig.15.	Respuesta inmune celular a LPS en ratones C3H/HeJ y C57Bl/6J.49.
Fig.16.	Respuesta inmune celular a LPS en híbridos F1 (BALB/c x C3H/HeJ).51.
Fig.17.	Respuesta inmune humoral a porinas en cepas murinas autógenas.52.
Fig.18.	Respuesta inmune humoral a porinas en híbridos F1(BALB/c x C57Bl/6) y F1 (BALB/c x C3H/HeJ).54.
Fig.19.	Respuesta inmune humoral a LPS en diversas cepas autógenas murinas.55.
Fig.20.	Respuesta inmune humoral a LPS en híbridos F1 (BALB/c x C57Bl/6) y F1(BALB/c x C3H/HeJ).56.

PRINCIPALES ABREVIATURAS.

Con A	Concanavalina A.
cpm	Cuentas por minuto como medida de radioactividad.
CDTA	Etilén Diamino tetracetato de sodio.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
H-2	Complejo de histocompatibilidad en el ratón.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil) 1-piper- azin-etano-sulfónico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
³ HTh	[Metil- ³ H] Timidina.
Ity	Gen de inmunidad a <i>Salmonella typhimurium</i> .
KDO	Acido 2-ceto-3-desoxioctulónico.
LPS	Lipopolisacárido.
Lps	Locus que controla la respuesta al LPS.
Mup-1	Proteína urinaria mayor.
Omp	Proteína de membrana externa.
PPD	Proteína purificada derivada de tuberculina.
Poly-I	Acido polinosínico.
PME	Proteínas de membrana externa.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
SFB	Sero fetal de ternera.

La resistencia de los ratones a la Salmonelosis murina está controlada genéticamente por el sistema H-2 y tres loci no pertenecientes al H-2: H-2^d, H-2^e, H-2^f, H-2^g y H-2^h.

Se buscó la cepa de ratón que diera con mejor respuesta a injertos a nivel del tipo H-2 para poder emplear el modelo murino en la inducción de protección a *Salmonella typhi* 9,12, Vid.

Se emplearon las siguientes cepas genéticas: C57BL/6 (H-2^b), BALB/c (H-2^d), A/J (H-2^a), DBA/2 (H-2^d), C3H/HeJ (H-2^k), C3HeB/FeJ (H-2^k), CBA/J (H-2^k) e híbridos F1 (BALB/c x C57BL/6), F1 (C3H/HeJ x BALB/c).

Los ratones fueron inmunizados con 30 μ g de proteína de membrana externa (PME) de *Salmonella typhi* 9,12, Vid. en solución salina vía intraperitoneal los días 0 y 7; El título de anticuerpos se determinó por el método de ELISA contra porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*; LPS de *Salmonella typhi* y PME de *Salmonella typhi* y *typhimurium*.

Los esplenocitos de estos ratones se obtuvieron al día 21 para el ensayo de proliferación celular *in vitro*, se utilizó como antígeno porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*.

Se cultivaron 200000 células esplénicas por pozo en medio RPMI 1640 complementado con Gentamicina 10 μ g/ml, 2 β -mercapto-etanol 5×10^{-5} M, L-Glutamina 2mM, Penicilina 200 u/ml y SFB al 10%; durante 5 días.

... de ... se ... de ... por ...
... en las capas H-2K y H-2B; una
... FI y la menor

... de la ... a las ...
... el ...
... con los ...
... las ...
... de 5,17,441 5,12,444.

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99

II.

INTRODUCCION

La Fiebre tifoidea es el resultado de una infección generalizada, causada por la ingestión o invasión intestinal de la Enterobacteria gram-negativa *Salmonella typhi*. Esta bacteria intracelular, móvil, anaerobia; Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae*, género *Salmonella* y especie *typhi*.

De acuerdo a la clasificación de Kauffmann-White, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9 y 12; los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie se encuentra el antígeno "Vi". La fórmula: 9,12,Vi:d denota a *S. typhi* en forma abreviada (44).

Thomas Willis, en 1659, describió los signos y síntomas de la fiebre tifoidea; sin embargo, durante años se confundió con el tifo. En 1782 Ruxham describió las dos enfermedades febriles como entidades clínicas diferentes: la fiebre putrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo). Jenner en 1850, en su libro titulado: "Sobre la identidad y la no identidad de las fiebres tifoidica y tifosa", demostró que las lesiones de la placas de Peyer y nódulos linfáticos eran específicas de la fiebre tifoidea. William Budd, en 1856, estableció que la enfermedad era transmitida a través de alimentos y aguas contaminadas con materia fecal proveniente de individuos enfermos (35,36).

Eberth, en 1880, describió la presencia del bacilo tifoidico en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de pacientes con fiebre tifoidea. Pfeiffer, en 1885, hizo el primer aislamiento del bacilo a partir de heces.

En 1895, Widal describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (35). La primera inmunización experimental con una suspensión de microorganismos vivos de *Salmonella typhi*, fue realizada en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y en ratones por Bauner y Pfeiffer en 1887. Kikovich posteriormente empleó bacilos muertos con el mismo propósito. Lo anterior indujo a Wright en Inglaterra y a Pfeiffer y Kolle en Alemania, a emplear en 1897 por primera vez, vacunas inactivadas en la inmunización de humanos. Cuando estas vacunas se aplicaron en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica se encontró una disminución significativa de la mortalidad, así como una atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que sufrieron la enfermedad (27).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas aplicadas por vía oral, hechas a base de bacterias muertas. Las vacunas tifoideas elaboradas con bacterias muertas siguieron utilizándose durante décadas sin conocerse su efecto protector real, ya que se carecía de modelos animales para probar su eficacia y no se lograba relacionar el efecto protector con algún indicador serológico.

En 1955, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, con el fin de probar la eficacia de las vacunas preparadas a base de células enteras de *Salmonella typhi* inactivadas con acetona (vacuna K) y con calor-fenol (vacuna L). Estos estudios demostraron que la vacuna K fue la mejor y se encontró que la protección era mayor cuando se aplicaban dos dosis (15,32,71).

El hecho de que las vacunas parenterales presenten efectos colaterales ha motivado la búsqueda de nuevos inmunógenos protectores. Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran a base de bacterias vivas. Una de ellas se elabora a base de una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomycinina para su crecimiento y otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (designada por Germanier como Ty21a) (30,85). Los resultados obtenidos con la vacuna hecha a base de bacterias estreptomycinina-dependiente fueron contradictorios, ya que en algunos casos no hubo protección (49).

Los estudios realizados con la vacuna de Germanier en Egipto demostraron que protegió al 95% de la población vacunada (29,37); sin embargo, cuando se aplicó en Chile, se encontró que con tres dosis administradas (cápsulas con capa entérica), con intervalos de 2 o 21 días entre cada dosis, solo se inducía protección del 51 al 67% (28).

Por otro lado, se han estudiado los antígenos de superficie específicos de *Salmonella typhi* como probables candidatos a vacunas contra la fiebre tifoidea: antígeno somático "O" (endotoxina y/o lipopolisacárido), antígeno flagelar "H" y el antígeno capsular "Vi". Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O" jugaba un papel importante en la protección, por lo que se elaboró una vacuna a base del oligosacárido de repetición del lipopolisacárido (LPS). La protección obtenida con esta vacuna fue escasa y de corta duración (34,45).

Con respecto al antígeno flagelar "H", se ha demostrado que tampoco está relacionado directamente con la inmunidad protectora. Tully y cols. (1962) observaron que al inmunizar chimpances con una cepa rugosa de *S. typhi*, se inducía la producción de anticuerpos contra el antígeno "H", pero no se obtenía protección a pesar de los títulos altos de anticuerpos antiflagelares (85).

La falta de relación de los anticuerpos anti-Vi con un estado inmune protector ha sido demostrada por varios investigadores (2,34,68); sin embargo, otros estudios revelan que el antígeno "Vi" por sí solo es capaz de inducir protección (1,73).

En los últimos años, las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram-negativas han adquirido gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el papel que desempeñan en la relación huésped-parásito. La importancia de estas PME se pudo entender gracias al estudio de métodos específicos que permitieron separar la membrana externa de la citoplasmática. Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* empleando esferoplastos preparados con lisozima y EDTA; estos se lisaron por choque osmótico y posteriormente se separó en un gradiente de sacarosa la membrana externa de la citoplasmática (52). El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME (65). Schnaitman describió una metodología que evita la preparación de esferoplastos y consiste en el rompimiento de las bacterias en una prensa francesa, seguido de la sedimentación de la envoltura celular y de la solubilización de la membrana citoplasmática con un detergente no iónico.

La identificación de las PME se hizo por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Schnaitman fue el primero en informar que *Escherichia coli* contenía una proteína principal, la cual constituía el 70 % de las proteínas totales de la membrana (77); poco después, él y otros investigadores demostraron por electroforesis que en realidad eran cuatro (7,37). Schmitges y Henning describieron una proteína principal, que electroforeticamente se podía separar en dos bandas (76). Actualmente se sabe que el número de las PME es variable y depende de la información genética de la bacteria y su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo y temperatura.

Las PME que más se han estudiado son las de *E. coli* y *S. typhimurium*.

Di Rienzo, Nakamura e Inouye en 1978 y Osborn y Wu en 1980, hicieron una revisión extensa de ellas y las clasificaron en proteínas principales y menores (20,66).

Las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100000 copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente solo se expresan 5. Dentro de las proteínas principales se encuentran:

1) Proteínas matrices o porinas (*Omp C*, *Omp D*, *Omp F*, *pho E*), forman poros de difusión que permiten el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana (58).

2) Proteína modificable por el calor (*Omp A*), involucrada en los procesos de conjugación y actúa como receptor para fagos y colicinas (16,17).

3) Lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana (8).

En la figura 1 se muestra los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y en la figura 2 la organización de las proteínas de membrana externa.

Con respecto a las proteínas menores se ha demostrado que ellas intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular y que están relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad de fosfolipasa A (20,56,66).

Debido a la localización de las (PME) sobre la superficie de las Bacterias Gram negativas, estas han sido consideradas como antígenos importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora, siendo tal vez, las Porinas las proteínas responsables de tal protección. Frasch y cols. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos. Los anticuerpos anti-PME presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento (26).

Buchanan y Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger a chimpancés contra la uretritis gonocócica estaba presente en la membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* (9).

Posteriormente, demostraron que las proteínas de dicha membrana eran las que conferían la protección específica en cobayos a los que se había inducido una infección gonocócica experimental (9).

Figura 1 .
ESQUEMA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS
GRAM NEGATIVAS

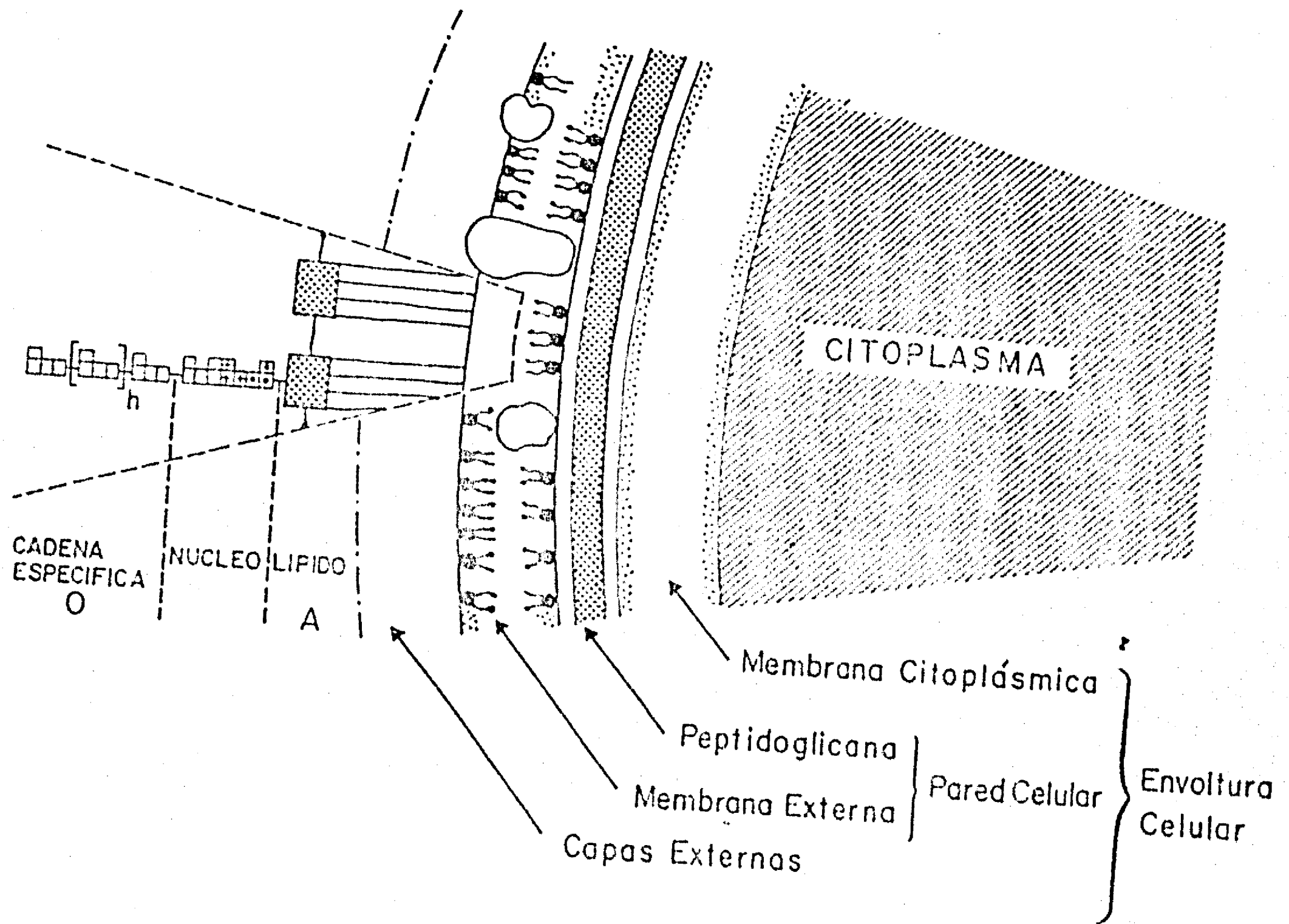
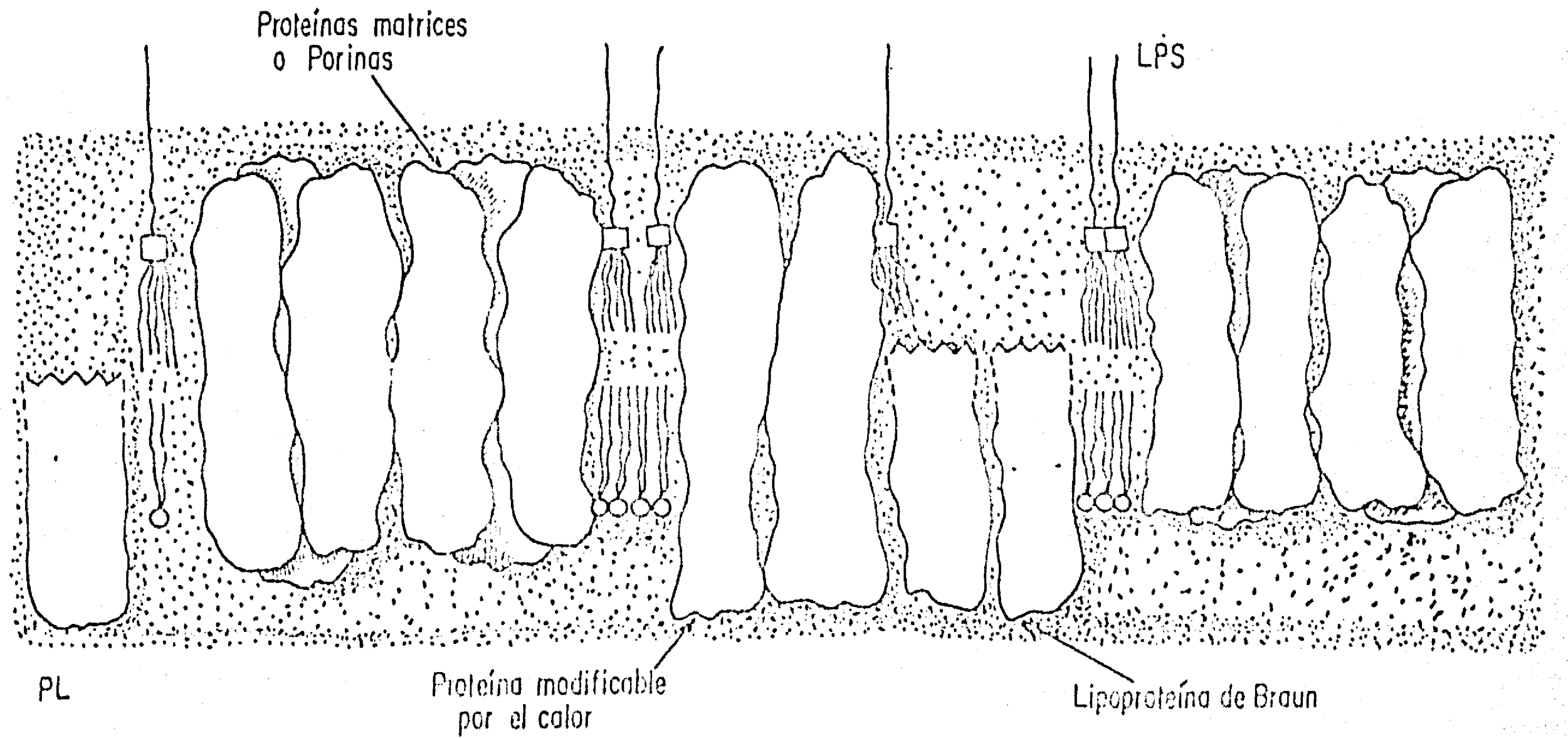


Figura 2.

ORGANIZACION DE LAS PROTEINAS EN LA MEMBRANA EXTERNA



La respuesta inmune celular consiste en una intrincada red de interacciones celulares que inician con la captación del antígeno por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos degradan las fracciones antigénicas a péptidos de menor tamaño (94); después, por un proceso no bien definido expresan estos fragmentos inmunogénicos en su membrana en conjunto con glicoproteínas de superficie codificadas por genes de clase II del sistema principal de histocompatibilidad (denominados I-A, I-E) en el ratón y (DP, DQ, DR) en el humano. Solo entonces los linfocitos T cooperadores reconocen al antígeno e inician una respuesta contra él. Después del reconocimiento antigénico los linfocitos T4 son activados y las clonas específicas contra los diferentes epítomos son expandidas; como consecuencia, estas células secretan una serie de factores solubles de comunicación celular (linfocinas), entre los cuales se encuentra IL2 cuya función principal es actuar como factor de crecimiento de linfocitos T. Otra linfocina secretada por los linfocitos T4 es el interferón gama (92). Este tiene varios efectos biológicos sobre diversos tipos celulares: efecto antiviral, activación de macrófagos y activación de diversos genes entre los cuales se encuentran los del sistema principal de histocompatibilidad.

Algunos estudios llevados a cabo con *Salmonella typhimurium* indican la importancia de la inmunidad celular para el control de esta infección. Se ha demostrado que la presencia de inmunidad celular (hipersensibilidad tardía) contra antígenos proteicos de *Salmonella typhimurium*, está en relación directa con el nivel de protección contra la enfermedad. En un modelo murino de Fiebre tifoidea Collins y

Mackness encontraron una estrecha relación entre el desarrollo de inmunidad e hipersensibilidad retardada (DTH) después de la inmunización con dosis subletales de *Salmonella* (41,42).

Otros estudios en ratones indican que por medio de transferencia pasiva de linfocitos T específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium* es posible conferir resistencia a ratones no inmunizados.

El principal problema para el estudio de la fiebre tifoidea es que *S. typhi* es patógena solo en humanos y chimpancés (23). Debido a esto, se tiene al ratón como el mejor modelo experimental, ya que presenta una infección natural muy similar a la fiebre tifoidea humana (6,51,57).

La Salmonelosis murina igual que en el hombre se transmite por la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces de animales infectados o portadores (81); después de que la infección tiene lugar por vía oral, la bacteria coloniza el intestino delgado sin causar síntomas apreciables, posteriormente, estas bacterias entran a tejido submucoso atravesando el epitelio veloso ó a través de las células M de las placas de peyer; de aquí, se diseminan por vía linfática a todo el torrente circulatorio y sistema fagocítico mononuclear, donde las bacterias son fagocitadas por macrófagos de bazo e hígado (células de Kupffer). Estas células son el principal sitio de multiplicación de la *Salmonella* en los siguientes días de la infección (12,51). Su multiplicación tiene lugar intracelularmente, protegiéndose de los anticuerpos y antibióticos (51). La cantidad de bacterias en hígado y bazo llega a ser aproximadamente de 10^8 bacterias/órgano, la infección

puede llegar a presentar una bacteriemia incontrolable y toxemia produciéndose rápidamente la muerte.

La Salmonelosis murina puede ser dividida en dos fases: fase temprana (menos de 10 días de infección) y fase tardía (mayor a 10 días de infección) (58,84).

El periodo de incubación de la *Salmonella typhimurium* es de 3 a 6 días. La Salmonelosis murina puede variar desde una infección leve con signos clínicos a una enfermedad aguda y fatal. Los ratones se muestran menos activos, adoptan una postura encorvada con distensión abdominal, pelaje áspero, pérdida de peso, a veces diarrea, esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía (81). No todos los ratones llegan a sufrir salmonelosis al reto con la bacteria; Estudios anteriores han demostrado que la resistencia natural, a un número de diferentes agentes infecciosos (bacterias, hongos, virus y protozoarios) esta controlada en parte, por la constitución genética de cada cepa en particular (64), un ejemplo de tal control genético son los diferentes grados de susceptibilidad a *Salmonella typhimurium*.

Benacerraf y Germain (1978), McDevitt (1976), Klein (1975), y Snell (1976), demostraron la influencia del complejo de histocompatibilidad en el ratón (H-2) sobre la susceptibilidad o resistencia de diferentes cepas de ratón a infecciones bacterianas (93).

Otros grupos, además de los anteriores, han caracterizado genéticamente la resistencia innata a *Salmonella typhimurium* en cepas de ratones híbridos (Plant y Glynn 1976; Horinaeche 1979; O'Brien 1979,1986; Robson and Vas 1972.)

En ratones singénicos inoculados por la misma ruta, se vio una susceptibilidad variable dependiendo de cada cepa en particular al reto con *Salmonella typhimurium*. Por ejemplo: Se demostró que para las cepas C57BL/6 y BALB/c la LD50 parenteral para una cepa virulenta de *S.typhimurium* era de menos de 10 bacterias y para A/J, CBA/J y C3H/HeJ la LD50 era mayor de 10^4 bacterias (57,61). Esta diferencia en la respuesta del ratón a *Salmonella typhimurium*, sirve como modelo para el control genético de la resistencia a organismos infecciosos y para evaluar los mecanismos de inmunidad a fiebre tifoidea, otros mecanismos efectores tales como: producción de anticuerpos, inmunidad celular, actividad fagocítica y capacidad bactericida del macrófago se han considerado (69).

En la regulación del sistema inmune y en el control genético a *Salmonellosis*, participan moléculas codificadas por genes, algunas de las cuales son halladas dentro de un complejo llamado sistema principal de histocompatibilidad (MHC).

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El sistema principal de histocompatibilidad está formado por un conjunto de genes que codifican glicoproteínas que se expresan sobre la superficie celular en todos los vertebrados.

Estas moléculas son importantes para el reconocimiento inmune y de señales entre células, ejerciendo regulación en la discriminación

entre lo propio y lo extraño por parte del individuo. El complejo principal de histocompatibilidad en el ratón se denomina H-2, el cual está situado en el cromosoma 17 (4,11,25,67,82) y en el humano es el HLA (human leukocyte antigens) situado en el cromosoma 6 (4,67).

El descubrimiento de las moléculas de histocompatibilidad proviene de dos campos diferentes: El trasplante y la inmunogenética, los primeros fenómenos de trasplantes estudiados fueron con células tumorales en ratones; P. Gorer comprobó en cepas endogámicas de ratones el fundamento inmunológico de las reacciones de trasplante y determinó que las proteínas de la superficie celular eran los antígenos responsables del rechazo del trasplante. A partir de 1930 se obtuvieron los principales conocimientos sobre la genética y los sistemas de histocompatibilidad (14). Luego, Peter Medawar vio estas observaciones en injertos de piel, demostrando que si un aloinjerto inducía anticuerpos era rechazado como resultado de la inmunidad celular (4,53). Más tarde, los estudios de Shreffler y J. Klein simplificaron el sistema H-2 y reconocieron que más de un loci era responsable de las diversas reacciones, además demostraron la región S que codifica para moléculas clase III.

En esta época, el trasplante clínico inicia su desarrollo con los estudios de J. Dausset en 1958, quien describió la presencia de anticuerpos contra los leucocitos humanos en el suero de personas que habían recibido varias transfusiones, en mujeres multiparas y voluntarios inmunizados con leucocitos (4,11). Posteriormente, en la década de los 60 con el estudio de F. Lilly se vió el efecto regulador en las interacciones celulares por parte del H-2 en la resistencia al virus

de la leucemia en un modelo murino. Al mismo tiempo, los estudios de Benacerraf y MacDevitt aclararon la función del *locus I* del MHC en la respuesta de animales endogámicos a antígenos proteicos, encontrando que a un mismo antígeno (DNP-poli-L-lisina) la respuesta se podía predecir de acuerdo a sus genes de respuesta inmune (Ir)(3,4,5).

El complejo H-2 está constituido por tres tipos de moléculas: clase I, clase II y clase III, las cuales están comprendidas dentro de 5 regiones (K, A, E, S, D).

Los genes clase I están contenidos en las regiones K y D ; los genes clase II en las regiones A y E (región I-A y I-E) y los genes clase III en la región S figura 3.

Moléculas clase I :

Los genes clase I, antes conocidos como antígenos definidos serológicamente (SD), están localizados en cuatro loci definidos genéticamente como: H-2K, H-2D/H-2L, Tla y Qa-2,3 (11,25,67). Los antígenos K y D se localizan en la membrana de la mayoría de las células nucleadas (con excepción de las células musculares, neuronas y endotelio corneal, estas moléculas clase I son reconocidas por linfocitos CD8 (T citotóxicos) cuando las células se encuentran infectadas por virus.

Las moléculas clase I son llamadas antígenos de trasplantes, debido a que se descubrieron como resultados de estudios de rechazo de tejidos tanto en ratones como humanos.

Son glicoproteínas integrales de membrana en la superficie celular; cada una de las moléculas clase I está compuesta de una cadena pesada alfa de 45 kd codificada en el cromosoma 17 y una cadena ligera llamada Beta 2 microglobulina de 12 kd la cual es constante y es codificada en el cromosoma 2.

Estas dos moléculas forman un heterodímero en la membrana celular y están unidas entre sí por uniones no covalentes figura 4.

Moléculas clase II:

Los genes clase II están en la región I y se subdividen en 5 loci (I-A; I-E; I-J; I-B; I-C); solo en I-A y I-E se identificaron los productos de genes. La subregión I-A contiene tres loci que codifican para las cadenas A α , A β y E β ; mientras que la subregión I-E contiene el locus que codifica para la cadena E α . Una célula procedente de un célula endogámica expresa potencialmente dos polipéptidos diferentes de clase II: A α ,A β y E α ,E β (4).

Estas moléculas clase II son reconocidas por linfocitos T cooperadores(CD4) y se hallan en la superficie de las células que presentan antígeno como los macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y también en linfocitos T activados; Las moléculas clase II figura 5 consisten en dos péptidos α y β , la cadena alfa de 30 kd y la cadena beta de 27 kd, unidas no covalentemente y ambas codificadas por el MHC, estas dos cadenas atraviesan la membrana plasmática y cada cadena polipeptídica está compuesta de dos dominios (α 1 y α 2 ; β 1 y β 2) los cuales son extracelulares; ambas cadenas son polimórficas, aunque hay

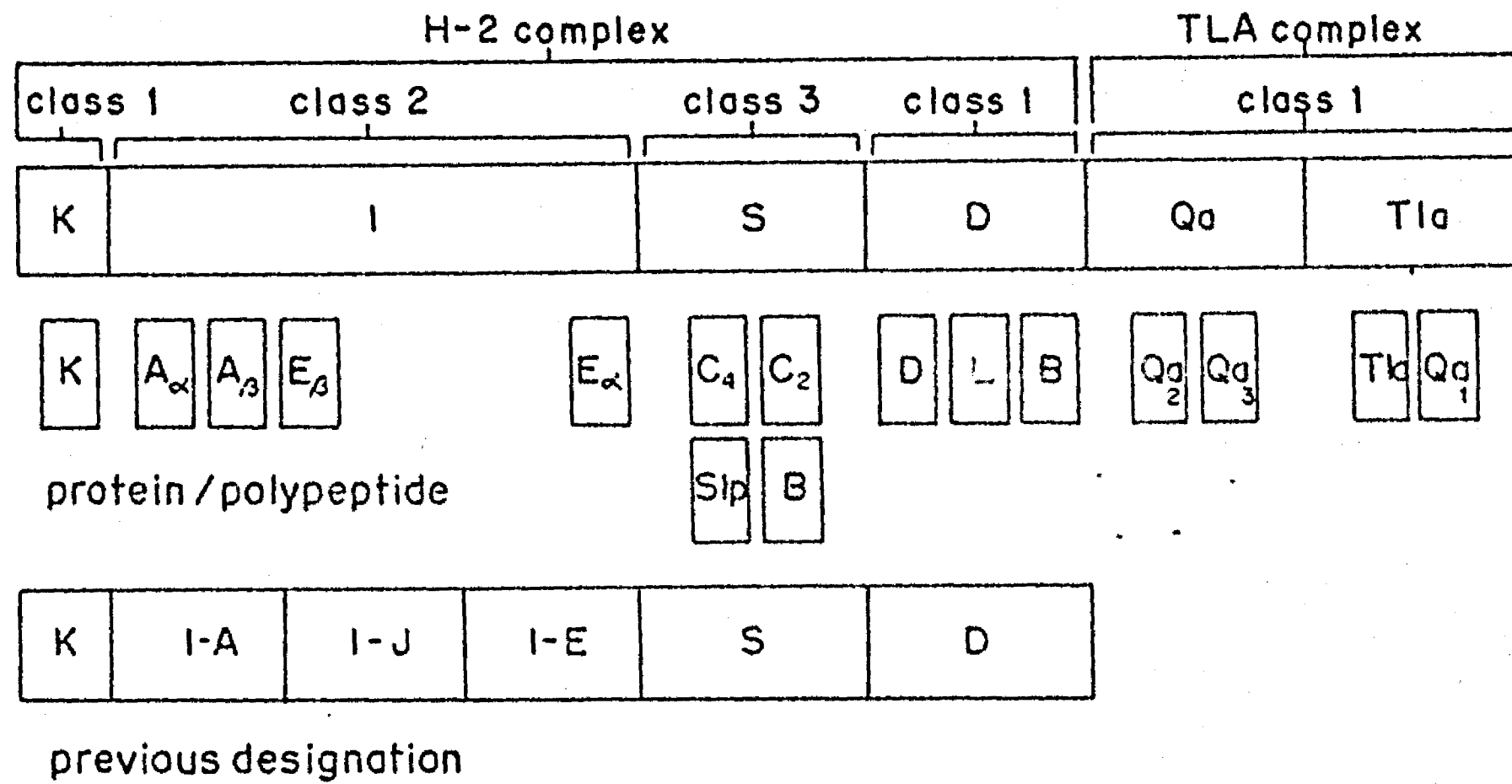
más variación estructural en la cadena β . Estas moléculas clase II se requieren para la presentación del antígeno a células T, en la cooperación T/B para producir anticuerpos y en interacciones de regulación entre células T.

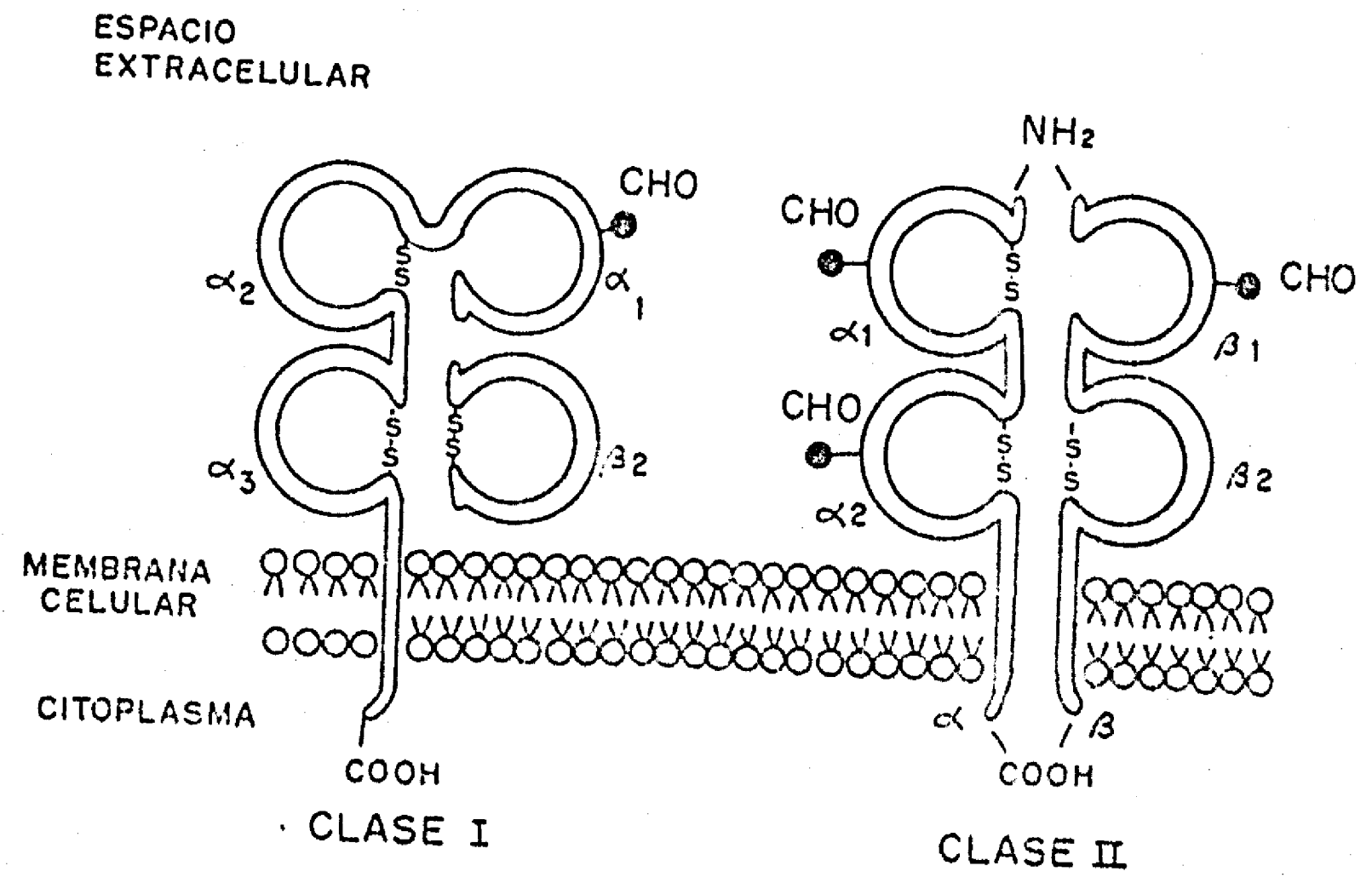
Moléculas clase III:

Los genes clase III se encuentran en la región S y codifican para la estructura primaria de las proteínas del complemento C2, Factor B, C4a y C4b. Las moléculas clase III están formadas por cuatro genes que codifican para dos proteínas de la vía clásica del complemento C2 y C4 y una de la vía alterna que es el factor B. El gen que codifica para C4 se encuentra duplicado (C4a y C4b).

Además, se encuentra un marcador el cual es el SIp, este tiene dos alelos SIp^a (si está presente) y SIp⁰ (si no está presente) este marcador es una proteína limitada al sexo, pues se encuentra generalmente en sueros de ratones machos, esta limitación sexual parece ser un efecto hormonal (67). Además, se encuentran dos genes que codifican para la 21-hidroxilasa (21-OH-A y 21-OH-B); en resumen, el orden de estos genes en la región S es el siguiente: 21-OH-B, C4, 21-OH-A, SIp, Bf y C2 ; hay una organización similar en la región clase III del complejo HLA del humano.

chromosome 17





CONTROL GENETICO A la infección de *Salmonella typhimurium* por los LOCUS Ity, Lps y Xid.

La respuesta de los ratones a la infección por *Salmonella typhimurium* (tifoidea murina) esta controlada además del sistema H-2, por la expresión de tres loci no pertenecientes al sistema H-2 los cuales son: locus Ity, Lps y Xid.

Locus Ity:

El locus Ity (Inmunidad a typhimurium) está situado sobre el cromosoma 1, controla el crecimiento inicial de la *Salmonella typhimurium* en sistema fagocítico mononuclear (bazo e hígado), después del reto intravenoso o subcutáneo con *Salmonella typhimurium* (Plant y Glynn, 1979) (54,57).

Este gen dominante no unido al H-2 es el regulador primario de la resistencia inata a la salmonelosis, debido a que el alelo de susceptibilidad (Ity^S) y el alelo de resistencia (Ity^R) están distribuidos entre todas las cepas de ratones singénicos.

El gene Ity parece estar estrechamente relacionado con los genes que regulan la respuesta de ratones a *Leishmania donovani* (Lsh), *Mycobacterium bovis* (Beg) y a *Mycobacterium lepraemurium* (Lnc) (33,63,83).

Los ratones homocigotos para el alelo que confiere la susceptibilidad (Ity^S/Ity^S) no pueden controlar la replicación temprana de la *Salmonella* en bazo e hígado y mueren tempranamente (menos de 10 días de post-inoculación), observándose además un aumento paralelo en el peso del bazo (Plant y Glynn 1976) (70); mientras los ratones resistentes (Ity^R/Ity^S o Ity^R/Ity^R) pueden controlar bien el crecimiento bacteriano en el sistema fagocítico mononuclear (82).

La célula efectora para la expresión del alelo Ity es el macrófago (57,70). Algunos de los hallazgos que apoyan esta teoría son los siguientes:

1) Los Linfocitos T no se necesitan para la restricción del crecimiento temprano de *S.typhimurium*, estos estudios se realizaron en ratones atímicos nu/nu del fenotipo Ity^R , en los cuales se observó un eficiente control del crecimiento bacteriano (Metcalf y O'Brien 1982); (57,58).

2) Maier y Oels (1972) reportaron que los macrófagos peritoneales de los ratones BRVR, los cuales eran Ity^R destruían a *Salmonella typhimurium* mejor que los macrófagos de la cepa BSVS susceptible a *Salmonella* (57).

Locus Lps:

El LPS es un componente integral de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, posee un amplio espectro de actividades biológicas (fiebre, hipoglicemia y necrosis tumoral) (59,91) y funciones inmunológicas representando así, a la endotoxina y al antígeno somático O.

Clásicamente, el LPS es conocido como un antígeno independiente de células T (19), siendo mitógeno para linfocitos B (79,89). el lípido A puede actuar como adyuvante debido a la capacidad de inducir mitogénesis en células B (79,88).

Estudios de Ziegler y otros han visto que el LPS aumenta la expresión de la molécula *Ia* en macrófagos peritoneales (91).

Químicamente, el LPS está compuesto de tres regiones principales: a) Polisacárido-O el cual está covalentemente unido a el core (núcleo), el cual a su vez se encuentra unido al lípido A via un trisacárido de ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico (KDO) (79).

Estudios genéticos han demostrado que la respuesta a LPS (endotoxina) en diferentes tipos de células está controlada por la expresión del loci *Lps* (22,75,91) el cual se encuentra a la mitad del cromosoma 4 (86) estrechamente unido al locus de la proteína urinaria mayor (Mup-1) (61,89).

Los ratones que son homocigotos o heterocigotos para el alelo normal *Lpsⁿ* (C3H/18FeJ, BALB/c, C57BL/6) responden a bajas dosis de endotoxina, mientras los animales que son homocigotos para el alelo defectivo *Lps^d* (C3H/HeJ) no responden a LPS.

Los hallazgos de Sultzer en 1968, donde el ratón C3H/HeJ era resistente a los efectos letales del LPS, proporcionó un modelo importante para investigar el control genético de la resistencia a la endotoxina (13,14,31) tanto *in vivo* como *in vitro* (86).

La baja respuesta mitogénica de los ratones C3H/HeJ a LPS se ha visto que es intrínseca a la célula B y no se debe a la presencia de células supresoras o a la ausencia de células T cooperadoras; Además, hay evi-

dencias que sugieren que la interacción del LPS con las células B de C3H/HeJ produce una señal inhibitoria más que iniciar una actividad celular (31).

Por otro lado, las células de bazo de los C3H/HeJ responden normalmente a otros mitógenos de células B. Estos resultados indican que la respuesta del Linfocito B a LPS envuelve la interacción del LPS con componentes específicos de la membrana, los cuales son defectuosos en los ratones C3H/HeJ (90); Aunque estos ratones no responden a los efectos mitogénicos y policlonales del LPS (88) se ha visto que dan respuesta a otros mitógenos de linfocitos B como son el Sulfato Dextrán, Poly-I y PPD (14,31,80) Además, son altamente susceptibles a infección por *Salmonella typhimurium* (86) a pesar de ser Ity^r (61). Esta susceptibilidad parece estar controlada por el alelo *Lps^d* (86), O'Brien y Rosenstreich proponen que la multiplicación no controlada de *S.typhimurium* puede resultar de la incapacidad de los macrófagos *Lps^d* de ser activados por el LPS sobre la superficie celular de *S. typhimurium* (86).

Locus Xid:

Este tercer loci es un alelo recesivo ligado al cromosoma X confiriendo susceptibilidad a la *Salmonella typhimurium* solamente en pocas cepas de ratones (CBA/N) (62).

La susceptibilidad Innata a *S.typhimurium* en estos ratones es una consecuencia en la respuesta de anticuerpos (Ig G) disminuida y retardada a la *Salmonella* (inmunodeficiencia).

El hallazgo de que por lo menos tres genes gobiernan la respuesta a *S.typhimurium* en ratones singénicos, sugiere que el resultado final de infección (sobrevivencia o muerte) es determinado por una serie de eventos inmunológicos y que un defecto en cualquiera de estos pasos puede resultar en la muerte del animal. Por lo tanto, la identificación de los productos de estos genes de resistencia a la *S. typhimurium* es importante en la definición de las interacciones huésped-parásito (59).

OBJETIVO PRINCIPAL.

-Determinar la respuesta inmune celular y humoral a porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en diferentes cepas de ratones singénicas a nivel del haplotipo H-2, para poder emplear el mejor modelo murino en la inducción de protección a fiebre tifoidea.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Aislar y caracterizar PME y porinas de las siguientes cepas: *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, *Salmonella typhimurium* y *E. coli*.

- Valoración de la respuesta inmune celular y humoral a las Porinas de las diferentes Enterobacterias ya mencionadas, en diferentes cepas singénicas murinas a través de transformación blastoide y la técnica de ELISA.

- Determinar la respuesta a lipopolisacárido de *Salmonella typhi* en la cepa que no responde (C3H/HeJ), la cual es Lps^d, lty^r comparable con otras cepas de ratones Lpsⁿ.

III. 2. MATERIAL Y METODOS

1.) METODOS BACTERIOLOGICOS Y BIOQUIMICOS:

1.1.) Cepas Bacterianas:

Se emplearon las siguientes cepas: *Salmonella typhi* (aislada de un paciente con fiebre tifoidea), *Salmonella typhimurium*: donada por el Instituto Nacional de Higiene y Escherichia coli K12: donada por el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos.

1.2.) Cepas murinas sincénicas y esquema de inmunización:

CEPAS	<u>H-2</u>	<u>Ity</u>	<u>Lps</u>
BALB/c	d	s	n
C57BL/6	b	s	n
A/J	a	r	n
DBA/2	d	r	n
CBA/J	k	r	n
C3H/HeJ	k	r	d
C3He/BJeJ	k	r	n
F1(BALB/c x C57BL/6)	(d/b)	(s/s)	(n/n)
F1(BALB/c x C3H/HeJ)	(d/k)	(s/r)	(n/d)

Las cepas singénicas utilizadas fueron obtenidas de Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine. De estas cepas se derivaron los híbridos, cuyo entrecruzamiento y crianza se realizó en el Bioterio del Laboratorio de Investigación sobre antígenos parasitarios del Instituto Nacional de Higiene.

Los ratones fueron inmunizados con 30 ug de Proteína de Membrana Externa (PME) de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en solución salina fisiológica vía intraperitoneal (i.p), los días 0 y 7, al mismo tiempo se tuvo un grupo testigo, el cual fue inmunizado en los mismos tiempos con solución salina fisiológica.

1.3.) Cultivo de bacterias y cosecha de las cepas bacterianas:

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

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

1.4.) Obtención y aislamiento de las proteínas de membrana externa:

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman (78), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logaritmico se ajustaron a una absorbancia de 1.0 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación a 180 watts (Lab line Ultratrip Labsonic system sonicator) por períodos de 2 min en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.3. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, ésta se centrifugó a 7000 xg durante 15 min, del sobrenadante se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a 200000 xg/45 min a 4°C (L8 80 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.), el sedimento se solubilizó con Tritón X-100 al 2% en Hepes 0.01 M pH 7.4. La fracción insoluble en Tritón X-100 (membrana externa y peptidoglicana) se sedimentó por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas y para lograr la extracción de las PME se resuspendió en Tris-HCl pH 7.2 que contenía Tritón X-100 al 2% y 5 mM de EDTA, se incubó durante 10 min a 37°C y posteriormente se ultracentrifugó a 200000 xg/45 min./20°C (78). Las PME se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron.

1.5.) Obtención y purificación de porinas por exclusión molecular:

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (56). Las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico, se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Lab-sonic system sonicator) en periodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Seguido de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 xg /15 min, la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 xg/30 min a 20°C, ésta se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de SDS al 2% y se incubó 30 min a 32°C, y se ultracentrifugó nuevamente. El sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente y por ultracentrifugación se obtuvo la peptidoglicana, las proteínas unidas a ella se extrajeron incubando 2 h a 37°C con tris 50 mM, pH 7.7 adicionado de 2% de SDS, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y 0.05% de β -mercaptoetanol; después de centrifugar a 100 000 xg/30 min/25°C; el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 ml/h.

2.) METODOS ANALITICOS:

2.1.) Determinación de Lipopolisacárido (LPS):

El contenido de LPS presente en las preparaciones de PME y porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto 3-desoxi-octulosónico (KDO) según el método de Karkhanis (40). Empleando una curva patrón de KDO .

2.2.) Cuantificación de proteínas:

La cuantificación del contenido de proteínas tanto en las preparaciones de PME (obtenidas por Schnaitman) como en las de porinas purificadas (Nikaido); se realizó de acuerdo al método de Lowry (50) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

2.3.) Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):

La SDS-PAGE de PME y porinas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos (48). El gel separador contenía 11.2 % de acrilamida, 2.5 % de bis-acrilamida, 0.19 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8.

El gel espaciador contenía 5 % de acrilamida, 0.13 % de bis-acrilamida 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 %, β -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005 % . El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante aproximadamente 6 h, empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1 % , pH 8.3. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fué transparente.

2.4.) Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida: ELISA.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-PME y anti-porinas en el suero de los ratones, se empleó el método de ELISA (24). Para ello, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), con 5,0 μ g/ml de PMC, PORINAS Y LPS en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio pH 9.6), 2 hrs, a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C . Una vez transcurrido este tiempo, se lavó dos veces con PBS-Tween al 0.1% (PBS-T) y se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-leche al 2%) y se dejaron dos horas a 37°C, luego , se agregó 100 μ l de los sueros problema y se incubó la placa durante 2.0 h a 37°C; después de cuatro lavados con PBS-T se agregaron 100 μ l de conjugado (inmunoglobulinas de , cabra anti-inmunoglobulinas y

se incubó la placa 1.5 h a 37°C; después de 4 lavados con PBS-T se agregaron 100 µl de solución de sustrato (O-fenilendiamina, H₂O₂ en amortiguador de citratos pH 5.6) y a los 20 min, la reacción se detuvo agregando 1 gota de ác. sulfúrico 2.5 M. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (minireader II Dynatec).

2.5. Medición del título de anticuerpos:

Densidad óptica inmune con antígeno. = Índice de Densidad

Densidad óptica inmune sin antígeno. óptica inmune.

Densidad óptica testigo con antígeno. = Índice de Densidad

Densidad óptica testigo sin antígeno. óptica testigo.

Índice densidad óptica inmune - Índice densidad óptica testigo.=

Diferencial de densidad óptica.

3.) METODOS INMUNOLOGICOS:

3.1.) Obtención de células esplénicas:

Los bazo de los ratones inmunizados con PME de *Salmonella typhi* se obtuvieron a los 21 días; en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar se extrajo el bazo y se depositó en una caja de petri conteniendo 5 ml. de solución de Hank's. Con

el objeto de liberar las células esplénicas se disgregó el bazo; la suspensión así obtenida, se lavó tres veces con solución de Hank's, a 1200 rpm/10 minutos; en la segunda lavada se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio 0.16 M.

y tris-HCl 0.17 M (10 ml) pH=7.65; Por último, el sedimento celular se resuspendió en medio RPMI 1640 complementado con Gentamicina 10 ug/ml, 2 Beta-mercapto-etanol $5 \times 10^{-5} M$, L-Glutamina 2 mM, Penicilina 200 u/ml y SFB 10%. El número de células viables se contó en una cámara de Neubauer, haciendo previamente una dilución 1:10.

3.2) Activación celular *in vitro*:

El ensayo de proliferación celular *in vitro*, se realizó cultivando 200000 células esplénicas por pozo, en placas de 96 pozos de microcultivo, en un volumen de 200 ul de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y utilizando como antígenos: porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* a una concentración entre 6 y 50 ug/ml, y LPS a una concentración de 5 ug/ml. Como control de viabilidad se usó Con A a una concentración de 10 ug/ml. este cultivo se realizó a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 5 días, en las últimas 18 hrs. del cultivo se agregó 1 uCi de Timidina tritiada (Amersham International 5 mCi). Posteriormente, al final de la incubación se cosechó la placa en un cosechador (Semiautomático Mini-Mash II) y la incorporación de timidina se determinó en un contador-β (Beckman LS 580).

3.3. Medición de activación de esplenocitos:

$$\frac{\text{C.P.M. inmune con antígeno.}}{\text{C.P.M. inmune sin antígeno.}} = \text{Índice de estimulación del inmune.}$$

$$\frac{\text{C.P.M. testigo con antígeno.}}{\text{C.P.M. testigo sin antígeno.}} = \text{Índice de estimulación del testigo.}$$

$$\frac{\text{Índice estimulación inmune.}}{\text{Índice estimulación testigo.}} = \text{Coeficiente de estimulación.}$$

VI. RESULTADOS.

A. Aislamiento y Caracterización de PME.a. Obtención de porinas (exclusión molecular).B. Estimulación de esplenocitos inmunes de diversas cepas murinas singénicas.C. Respuesta Humoral de diversas cepas murinas singénicas.A. Aislamiento y Caracterización de PME:

De acuerdo al método de Schnaitman (78), se obtuvieron PME de *S.typhi* 9,12,Vi:d. El comportamiento electroforético en geles de SDS-poliacrilamida de las PME se muestra en la fig 6. Las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares desde 14 kd hasta 70 kd, de donde las que tienen pesos moleculares de 38 kd a 41 kd corresponden a las proteínas formadoras de canales o porinas, así como dos proteínas de 17 kd y 28 kd.

a. Obtención de porinas por exclusión molecular:

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

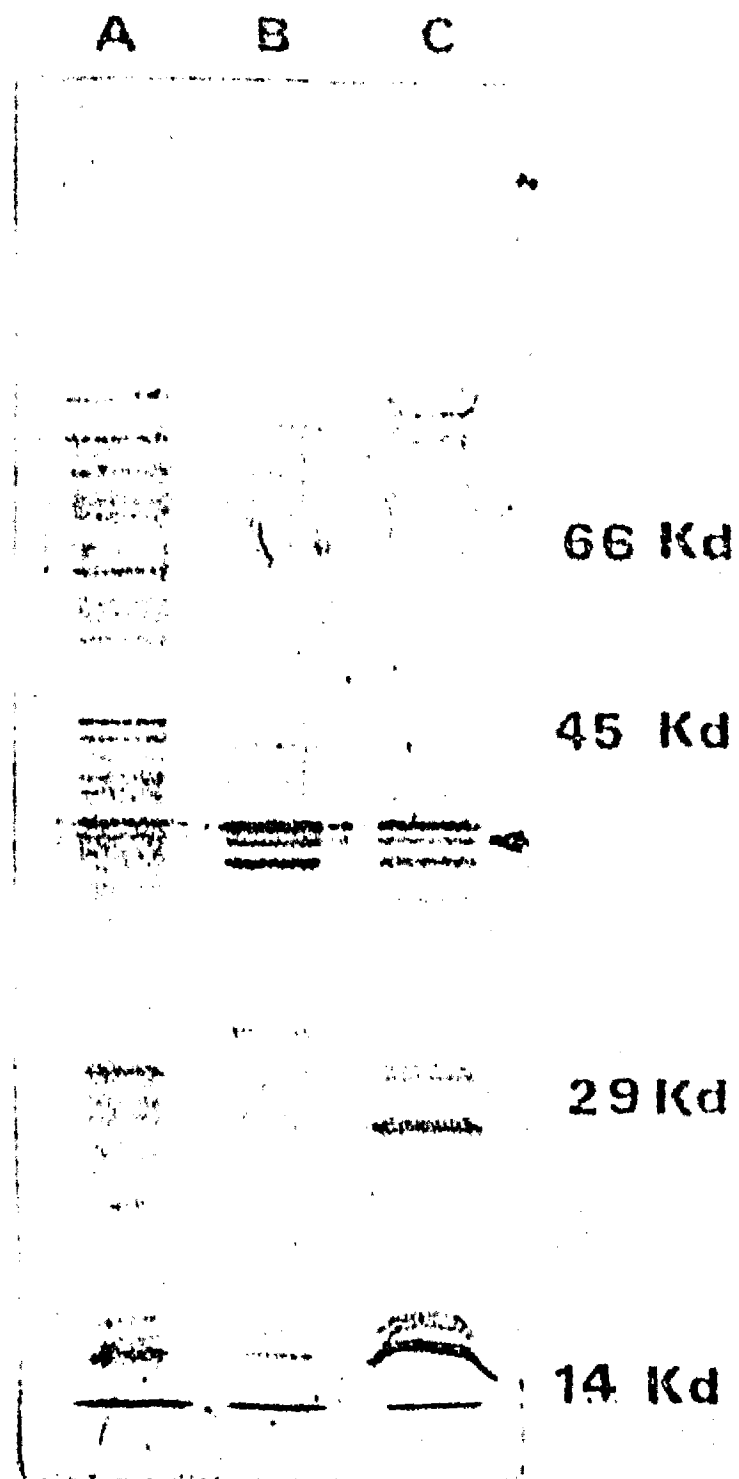


Figura 6. Análisis electroforético de diferentes cepas de Salmonella.

Carril A: PME de *E. coli*.
 Carril B: PME de *S. typhimurium*.
 Carril C: PME de *S. typhi*.

En las figs 7, 8 y 9 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos de la columna de Sephacryl S-200 de las porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*. En ellos se observa que la fracción que eluyó inmediatamente después del volumen vacío contenía las porinas en forma de trímeros (114 Kd a 123 Kd). Esto se demuestra por electroforesis Fig.10 pues solamente se observan dos bandas proteicas de 38 Kd a 41 Kd. Las porinas así purificadas estuvieron libres de LPS (cuantificado a través del contenido de KDO). Sin embargo, cuando se empleó una técnica más sensible, como es la determinación de ácido β -hidroximirístico por HPLC, como indicador indirecto de contaminación de LPS, se encontró que ésta era del 0.014%

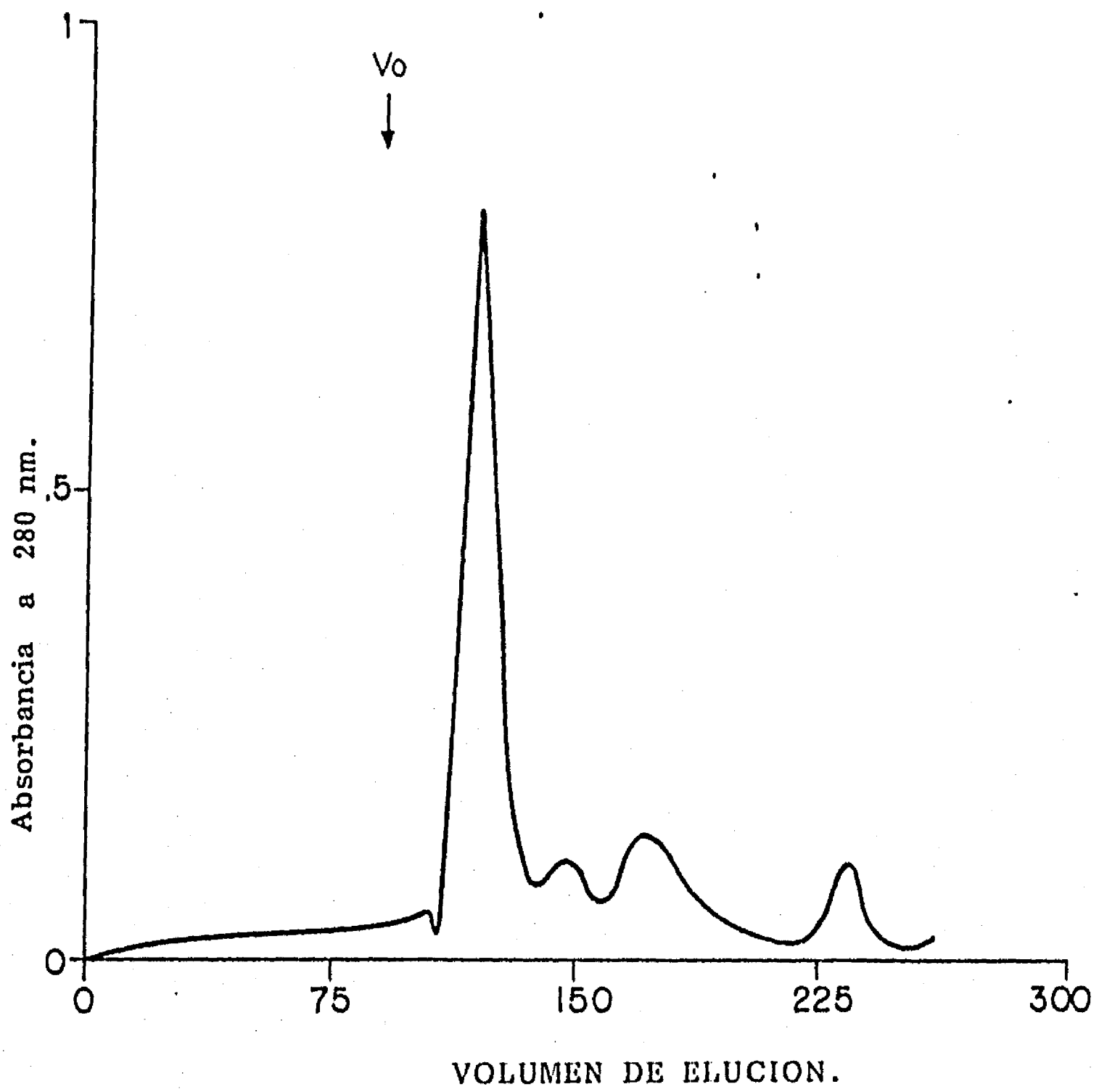


Figura 7. Elución de Porinas de *Salmonella typhi* en columna de de Sephacryl S-200.

Figura 8.

SEPARACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. typhimurium*
FILTRACION EN GEL, COLUMNA DE SEPHACRYL S-200

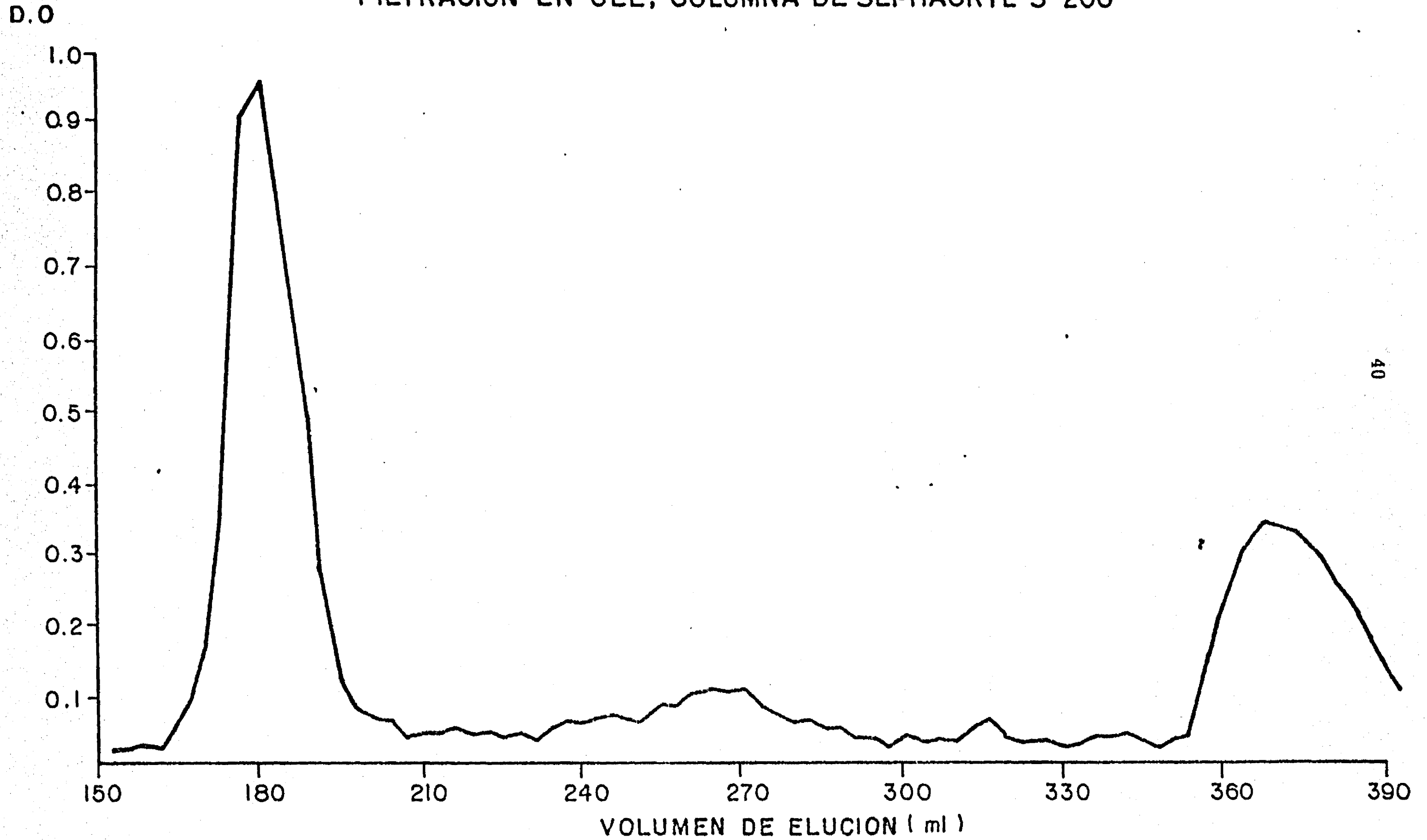
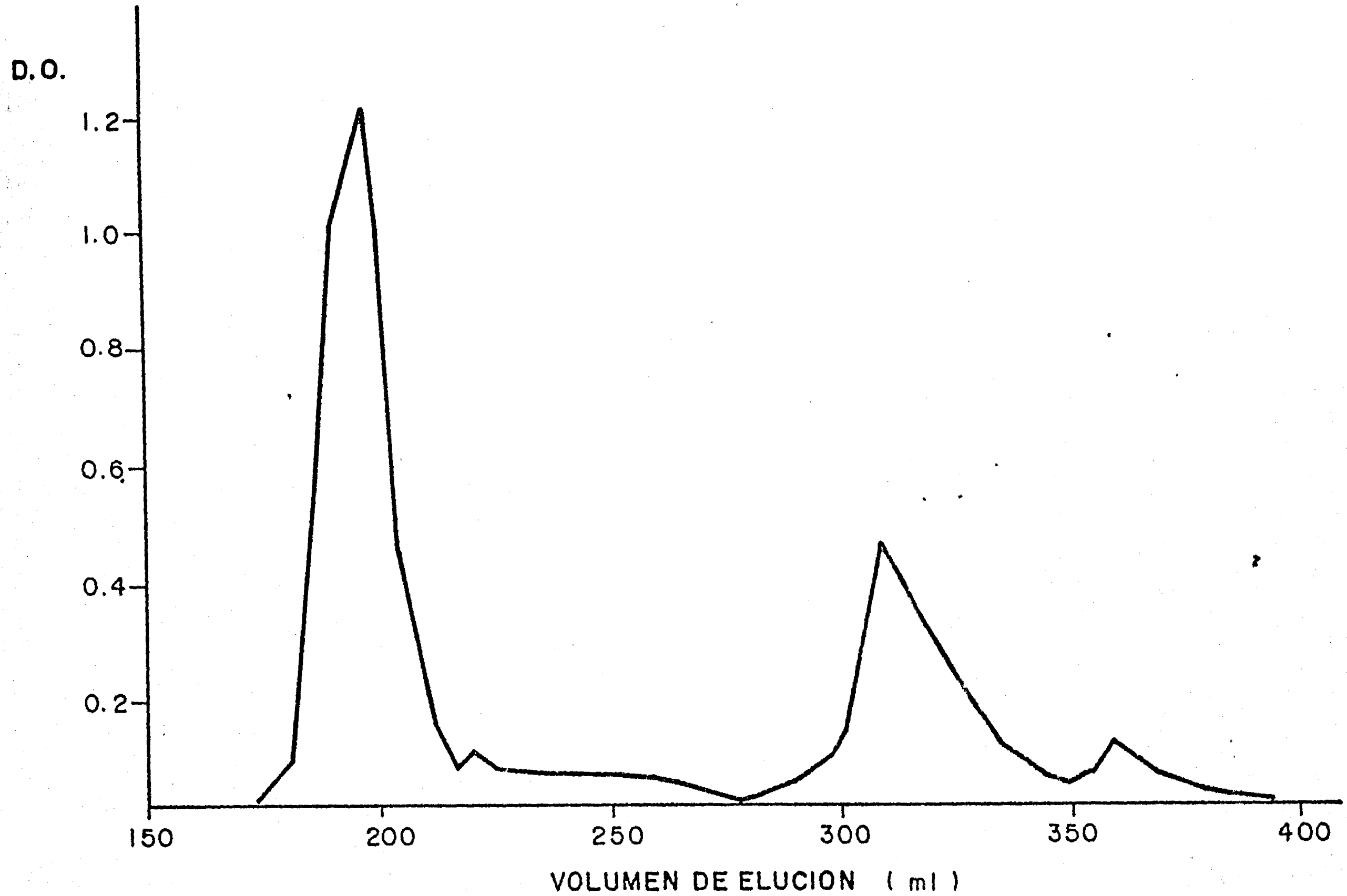


Figura 9.
SEPARACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *E. coli*
POR FILTRACION EN GEL, SEPHACRYL S-200



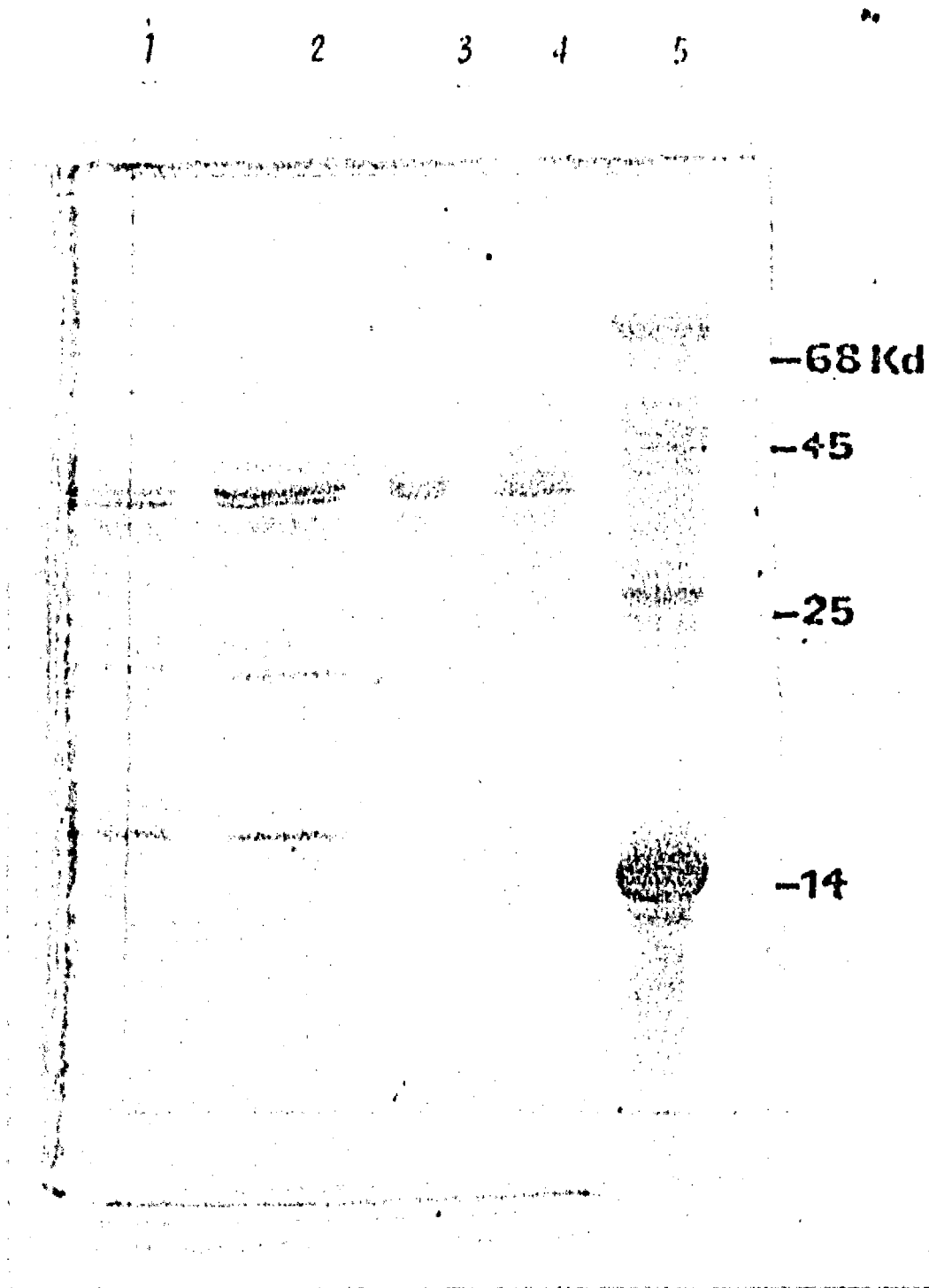


Figura 10. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Carriles 1 y 2 (30 μ g): PME de *S. typhi*.

Carriles 3 y 4 (30 μ g): Porinas de *S. typhi*.

Carril 5: Marcadores de P.M.

B. Estimulación de esplenocitos inmunes de diversas cepas murinas singénicas:

1. Respuesta inmune celular a porinas de diversas cepas bacterianas en diferentes cepas singénicas:

Con el objeto de determinar si la respuesta celular a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* en diversas cepas murinas singénicas, estaba controlada a nivel del haplotipo H-2, se inmunizaron los ratones de diferentes cepas con 30 ug de PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d vía i.p. los días 0 y 7. Al día 21 se extrajo el bazo y se midió la estimulación de estos esplenocitos a las porinas ya mencionadas; En la figura 11, se observa que las cepas que mejor responden a las porinas de *Salmonella typhi* fueron las de haplotipo H-2^k y H-2^a; Por otra parte, la cepa de respuesta intermedia fue de haplotipo H-2^b y la de menor respuesta la H-2^d.

La respuesta es independiente de la concentración de antígeno usado, pues con tres diferentes concentraciones de este, se observó siempre el mismo fenómeno figuras 11, 12 y 13.

ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS CON PORINAS

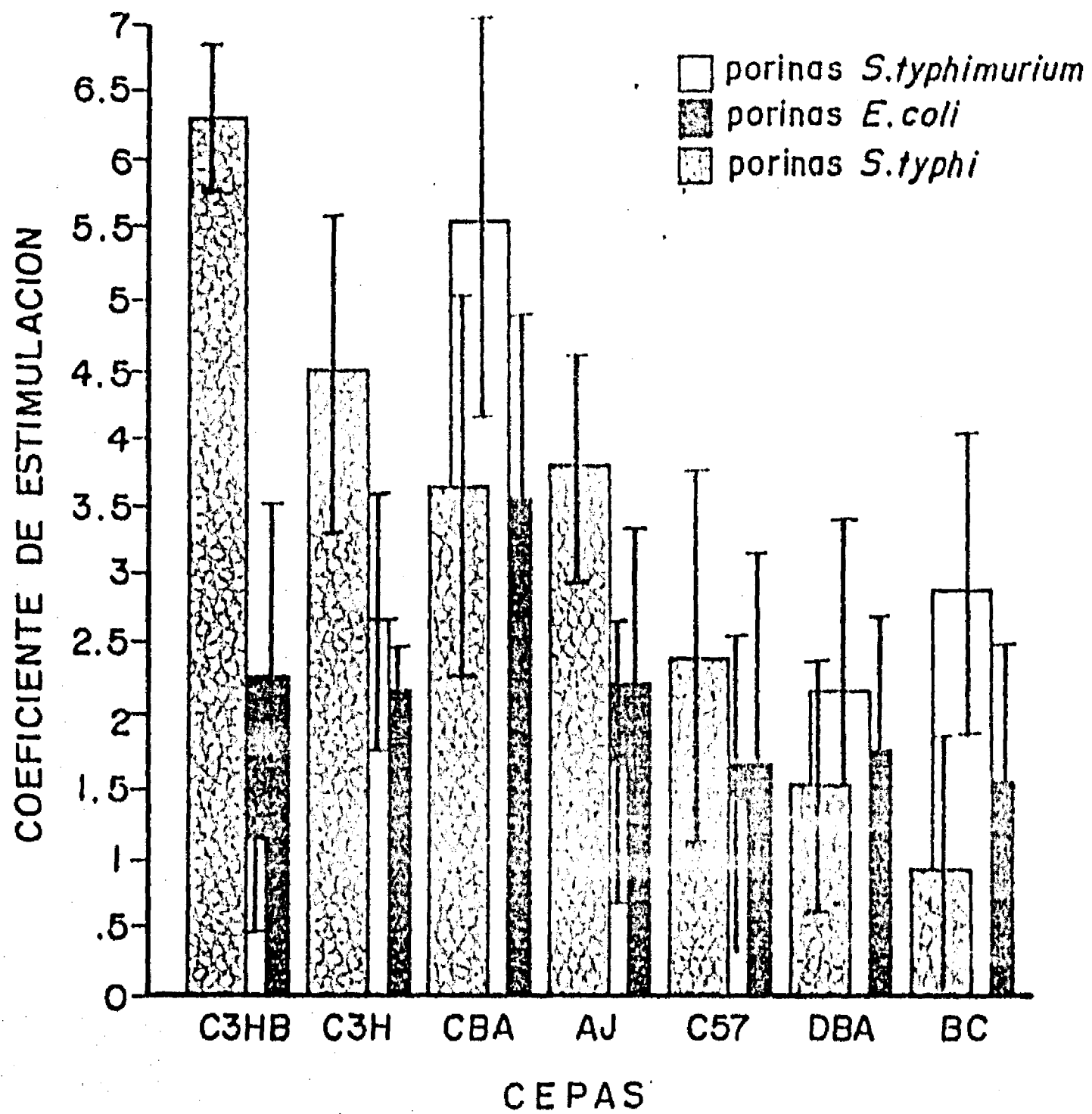


Figura 11. Respuesta inmune celular de diferentes cepas murinas a porinas de diversas cepas bacterianas. (concentración 12 ug).

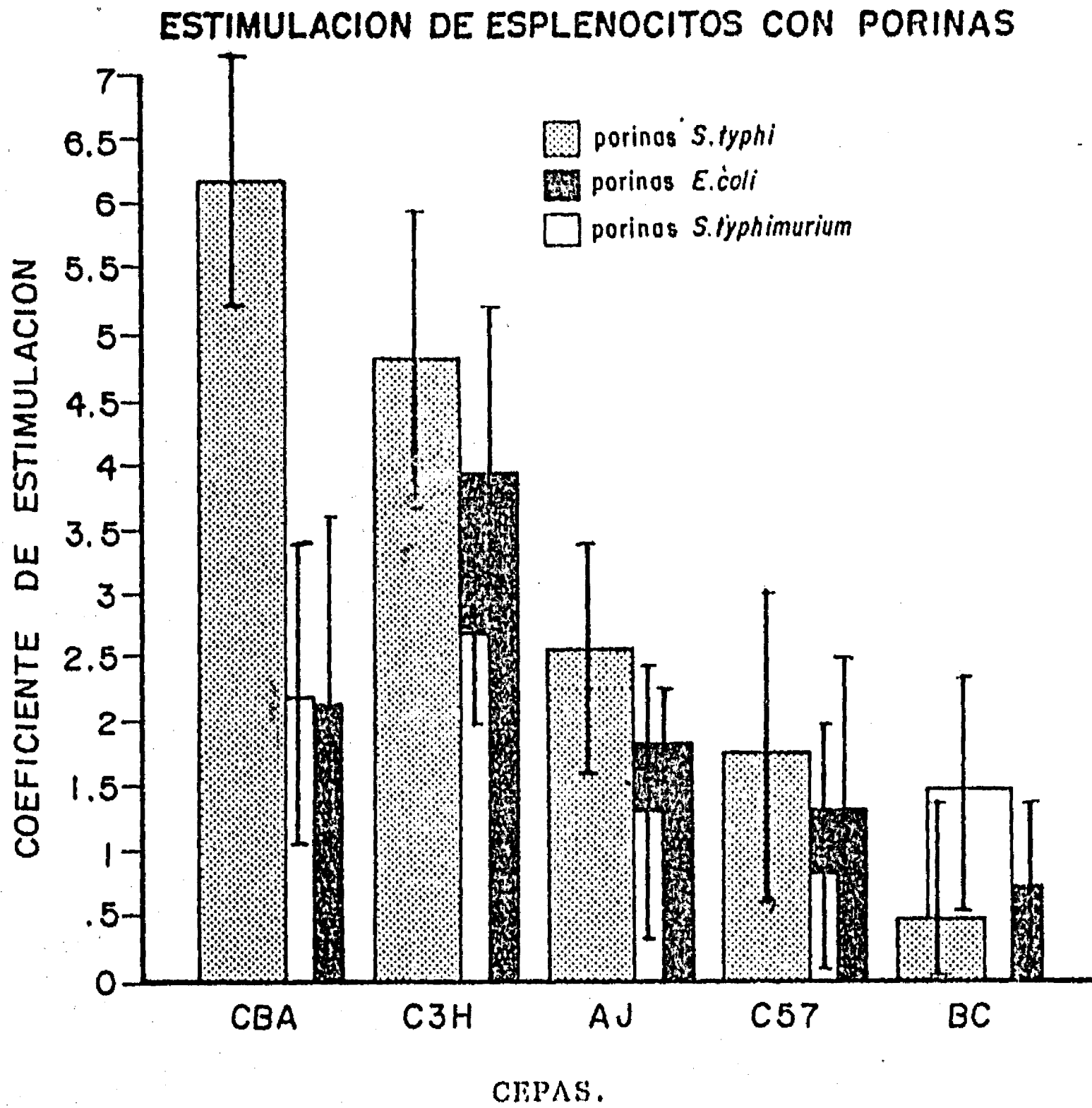


Figura 12. Respuesta inmune celular de diferentes cepas murinas a porinas de diversas cepas bacterianas. (concentración 6 ug).

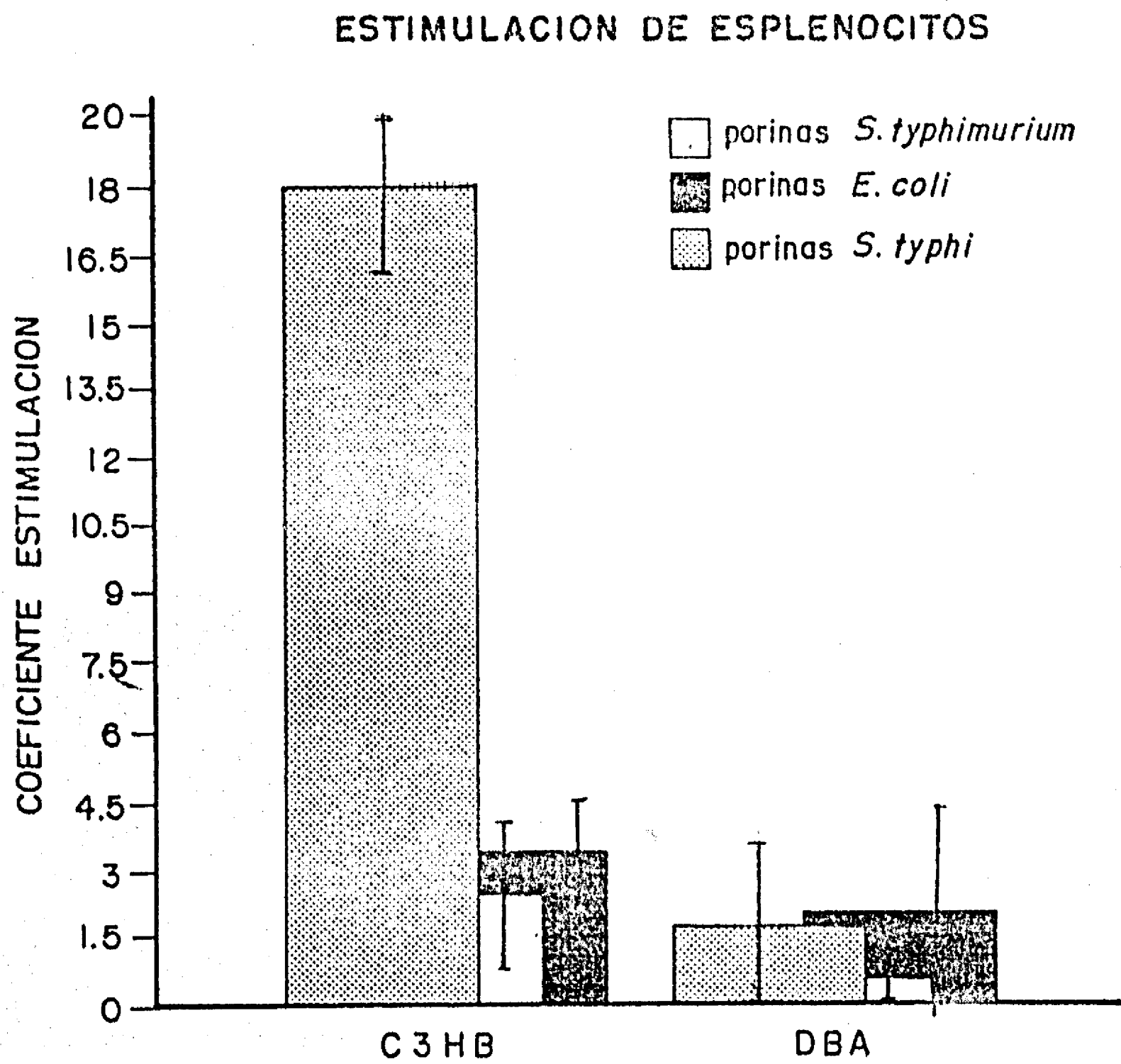


Figura 13. Respuesta inmune celular de diferentes cepas murinas a porinas. (concentración de 50 ug).

2. Respuesta inmune celular en híbridos (BALB/c x C57BL/6) F1 y (BALB/cJ x C3H/HeJ)F1 a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*.

Como se puede observar en la figura 11 y 14 el híbrido F1(BALB/c x C57BL/6) H-2^{d/b} e Ity^{s/s} presentó una respuesta intermedia con respecto a sus parentales. Para comprobar si el haplotipo H-2^k era dominante para la respuesta a las porinas se utilizó un híbrido (BALB/cJ x C3H/HeJ) F1 el cual es H-2^{d/k} e Ity^{s/r}, podemos observar en la figura 14 que la respuesta celular del híbrido a las porinas de *Salmonella typhi* fue muy alta, en comparación con la respuesta original de la cepa parental BALB/cJ.

3. Respuesta inmune celular a LPS en ratones C3H/HeJ y C3He/BFeJ:

Dado que estas dos cepas tienen el mismo haplotipo (H-2^k) y el mismo alelo Ity^r, se esperaba encontrar una respuesta idéntica contra las porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d en ambas cepas murinas; Sin embargo, en la figura 11 se observa que las dos cepas responden bien a porinas de *S. typhi*, pero la mejor respuesta fue la de la cepa C3He/BFeJ; esta diferencia se puede deber al locus Lps el cual se expresa en la cepa C3H/BFeJ (Lpsⁿ). Para ratificar este resultado se realizó el ensayo de proliferación celular *in vitro* en ambas cepas frente a LPS. Como se aprecia en la figura 15 la cepa que responde a LPS es la C3He/BFeJ como se había hipotetizado.

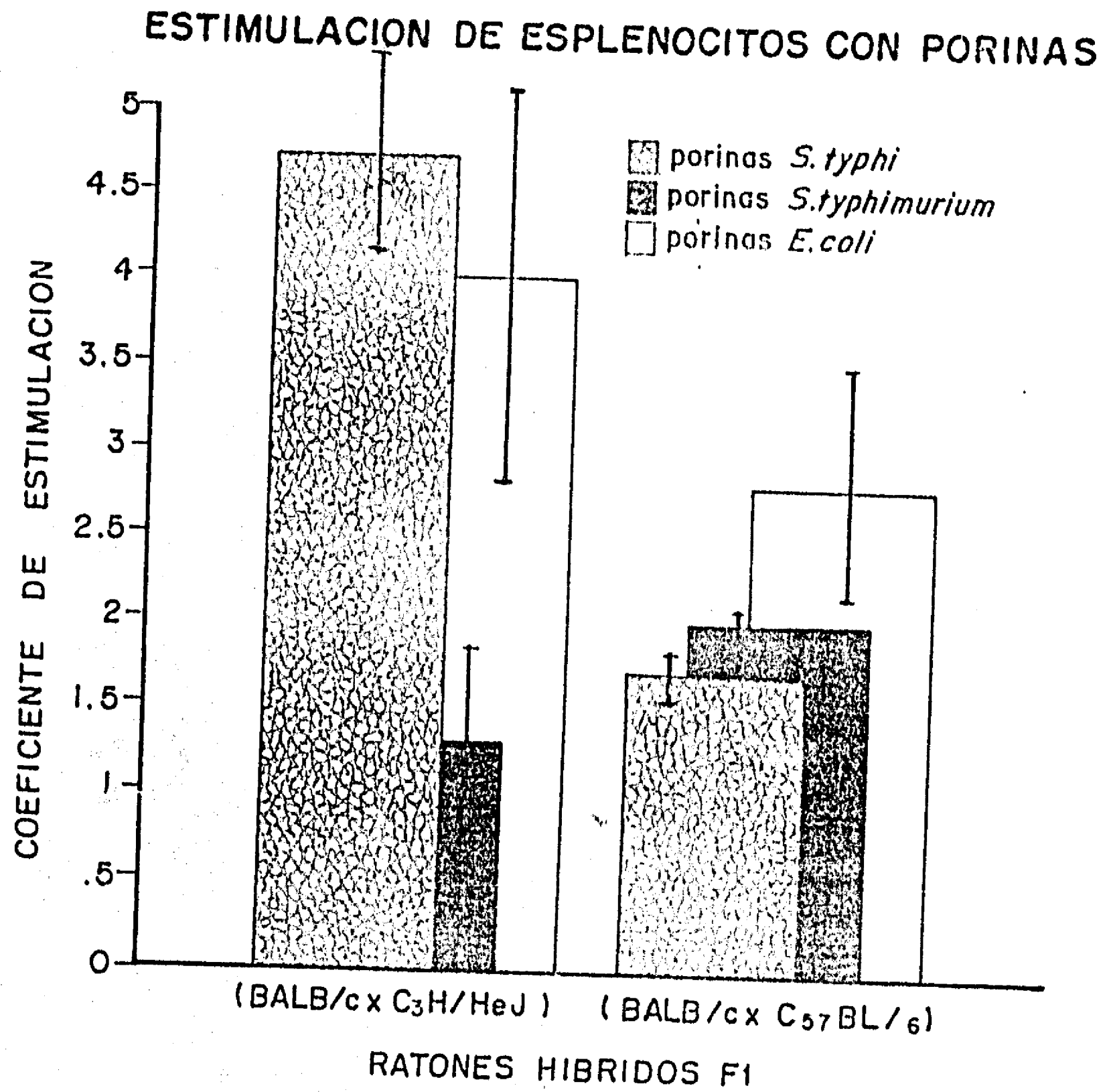


Figura 14. Respuesta inmune celular de ratones híbridos F1 a porinas de diversas cepas bacterianas. En la figura se observa el coeficiente de estimulación de los esplenocitos inmunes a las PME de *S. typhi*.

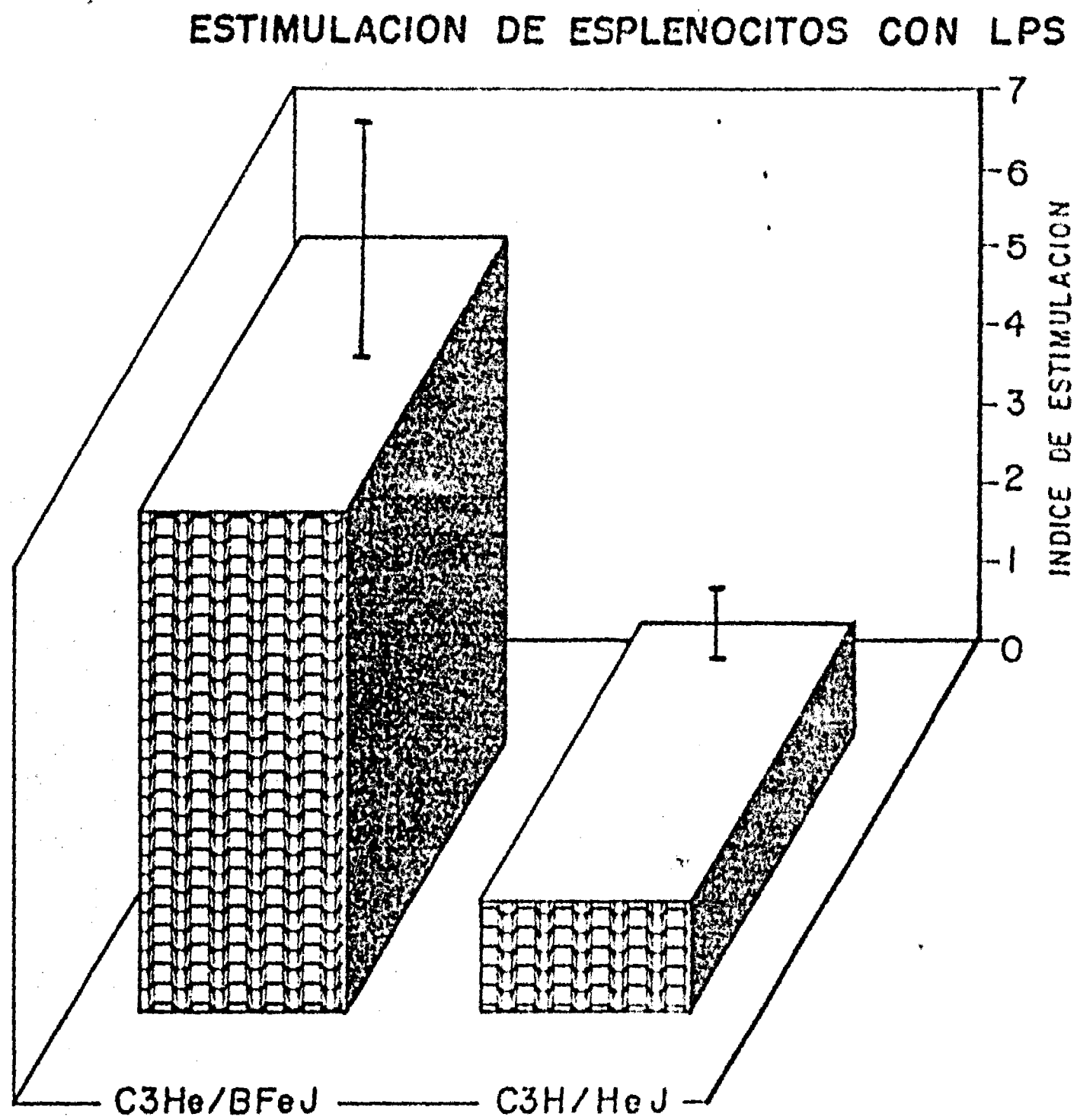


Figura 15. Respuesta inmune celular a LPS.

En la figura se observa el índice de estimulación de los esplenocitos inmunes a las PME de *S. typhi* contra LPS.

4. Respuesta Celular a LPS en híbridos F1 (BALB/cj x C3H/HeJ):

En la figura 16 se observa que el híbrido F1 (BALB/cj x C3H/HeJ) el cual es $Lps^{n/d}$ responde muy bien a LPS, corroborando con esto que la capacidad de respuesta a LPS es dominante, puesto que proviene de un Lps^d (C3H/HeJ) y un Lps^n (BALB/c).

C. Respuesta inmune humoral a Porinas, PME y LPS en diversas cepas murinas singénicas:

El título de anticuerpos en los sueros de las cepas murinas singénicas se determinó por el método de ELISA contra los siguientes antígenos : Porinas de *S.typhi*, *S.typhimurium* y *E.coli*; PME de *S.typhi* y *S.typhimurium*; y LPS de *S.typhi*; Se realizaron diluciones dobles a partir de 1:25 hasta 1:1600 tanto para los sueros positivos como para los controles.

1. Respuesta inmune humoral a porinas de diversas cepas bacterianas:

En la figura 17 se observa la respuesta humoral en los sueros de los ratones singénicos utilizando una dilución 1:50 contra las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,VI:d. Esta respuesta medida por la técnica de Elisa nos indica que la respuesta a las porinas fue mejor en las cepas (C3He/BFeJ,CBA/J) las cuales son de haplotipo $H-2^k$ y en la cepa $H-2^a$ (A/J), siendo intermedia en la cepa $H-2^b$ (C57BL/6J) y menor en la $H-2^d$ (BALB/cj).

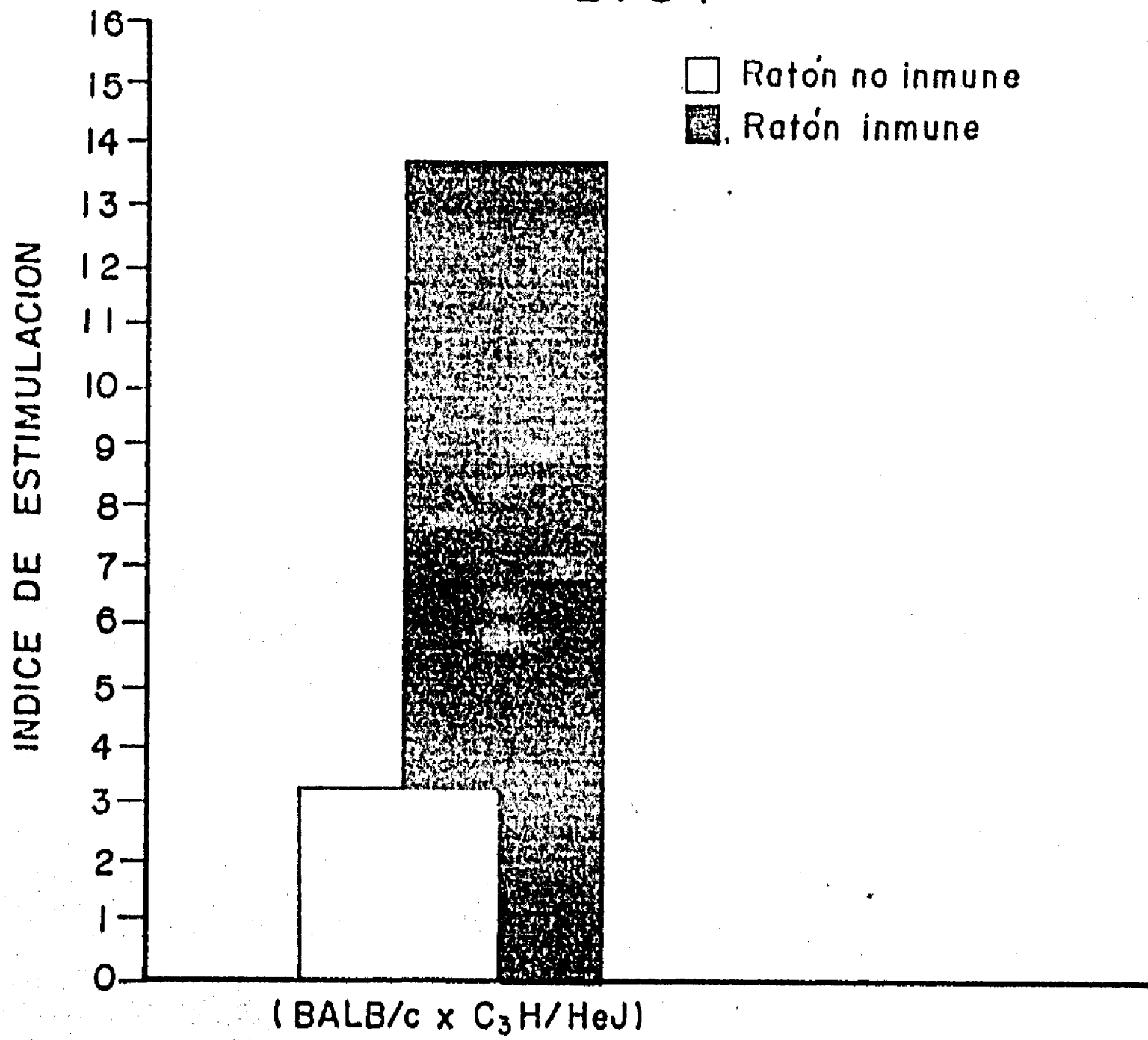
ESTIMULACION DE ESPLENOCITOS CON
LPS .

Figura 16. Respuesta inmune celular de ratones híbridos F1 a LPS. En la figura se observa el índice de estimulación de los esplenocitos inmunes a PME de *S. typhi* contra LPS. Se incluye al ratón control no inmune.

ELISA EN DIFERENTES CEPAS SINGENICAS

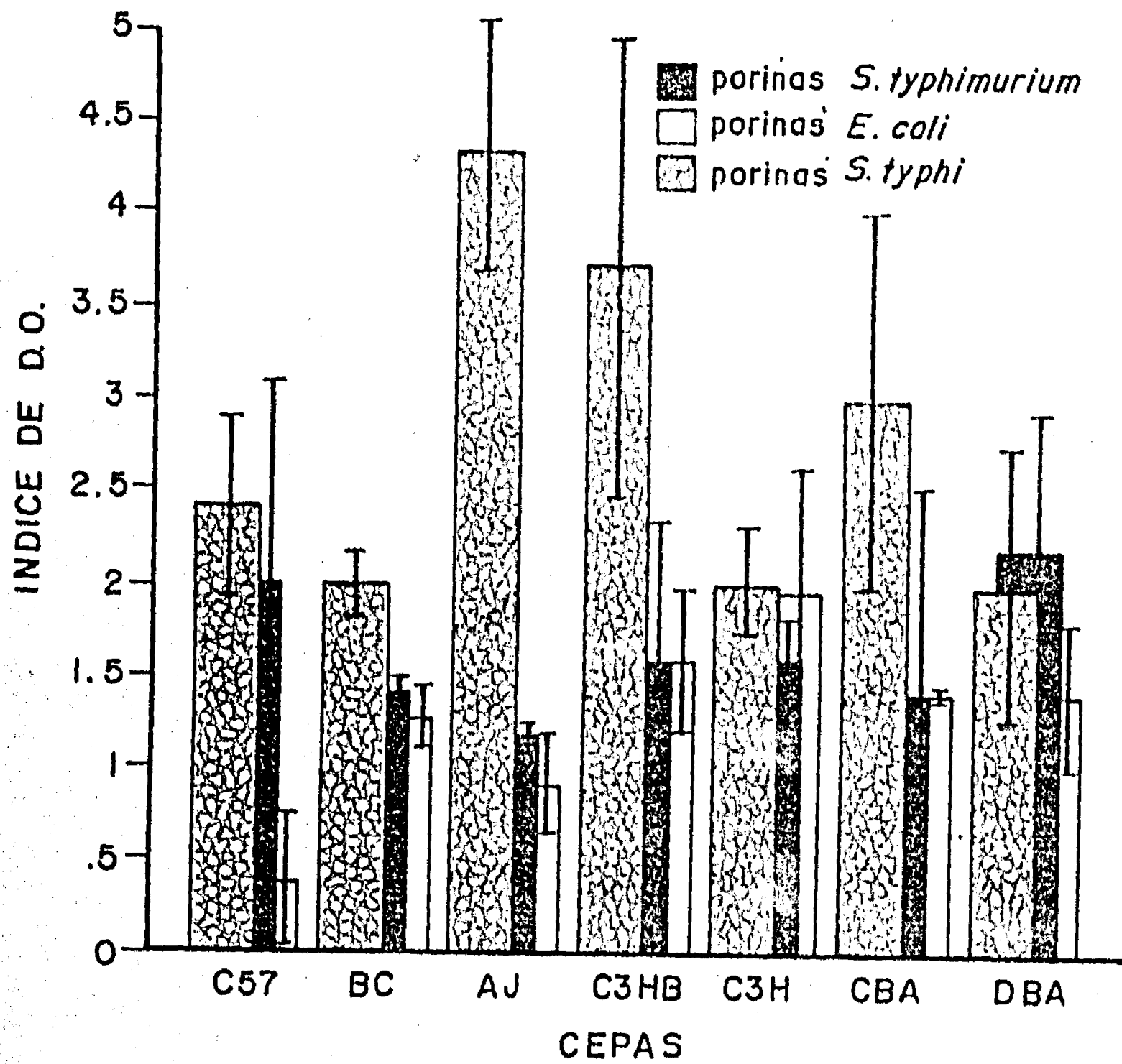


Figura 17. Respuesta inmune humoral de diferentes cepas murinas a porinas de diversas cepas bacterianas. En la figura se observa el índice de D.O. de los sueros inmunes a PME de *S. typhi*.

2. Respuesta inmune humoral a porinas en híbridos F1
(BALB/cj x C57BL/6j) y F1 (BALB/cj x C3H/HeJ):

En la Figura 18 se muestran los índices de D.O. de los sueros inmunes anti-PME de *S. typhi* de los híbridos F1 (BALB/c x C57BL/6) y F1 (BALB/c x C3H/HeJ). Los híbridos F1 (H-2^d/k) presentaron una respuesta inmune humoral a las porinas prácticamente igual que los F1 (H-2^d/b).

3. Respuesta humoral a LPS en diversas cepas singénicas murinas:

En la Figura 19 se muestran el coeficiente de D.O. de los sueros inmunes contra LPS de *S. typhi*, se observa una respuesta normal al LPS en todas las cepas excepto en la C3H/HeJ (Lps^d).

4. Respuesta inmune humoral a LPS en híbridos F1
(BALB/c x C57BL/6) y F1 (BALB/c x C3H/HeJ).

En la Figura 20. Se muestran los índices de D.O. de los sueros anti-LPS de *S. typhi* en los híbridos, observándose una mayor respuesta en F1 (BALB/cj x C3H/HeJ) (Lpsⁿ/d) que en los híbridos F1 (BALB/cj x C57BL/6j) (Lpsⁿ/n).

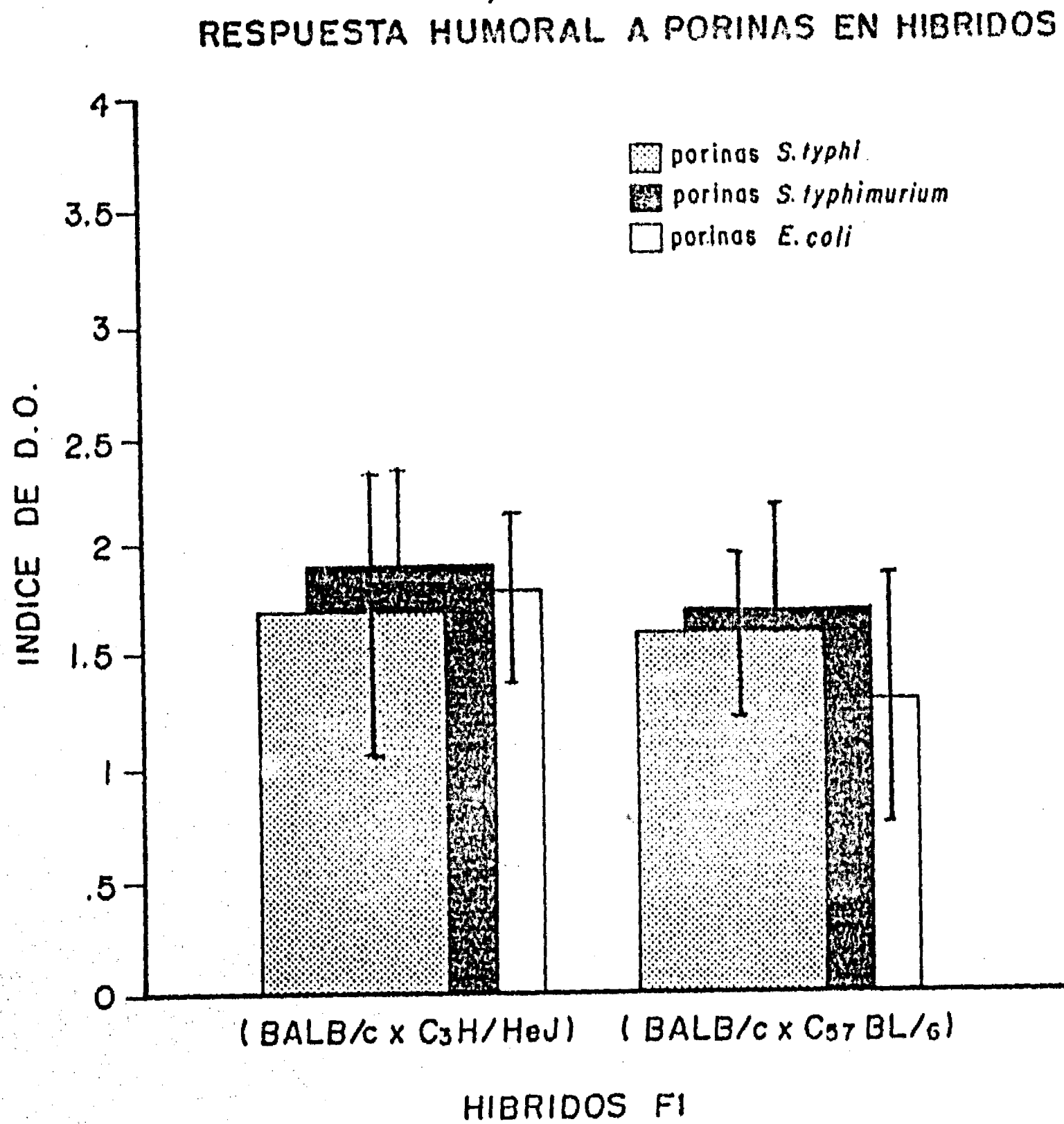


Figura 18. Respuesta inmune humoral de híbridos F1 a porinas de diferentes cepas bacterianas. Se demuestra el índice de D.O del suero de los ratones inmunizados con PME de *S. typhi*.

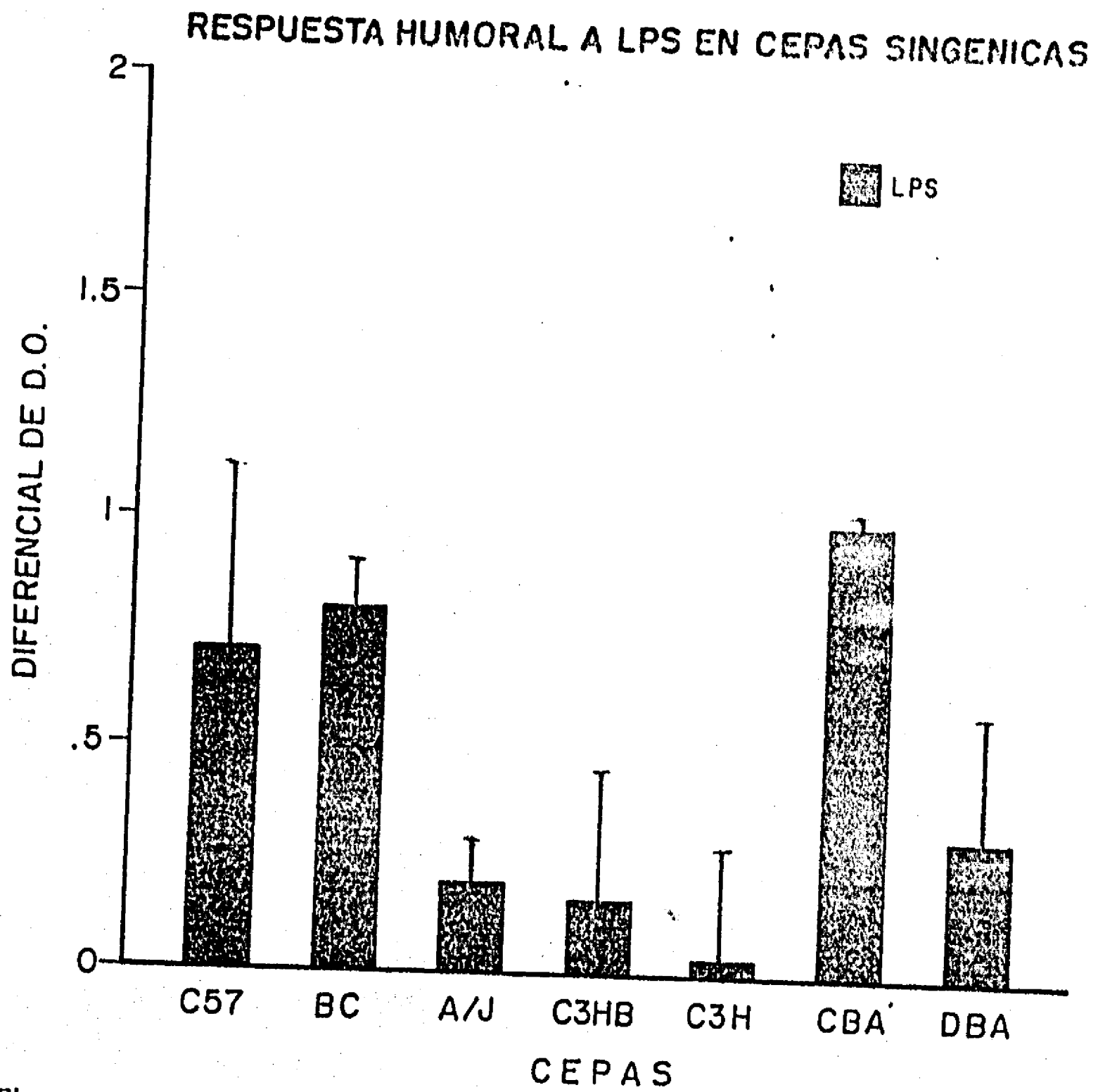


Figura 19. Respuesta inmune humoral a LPS de diferentes cepas murinas.

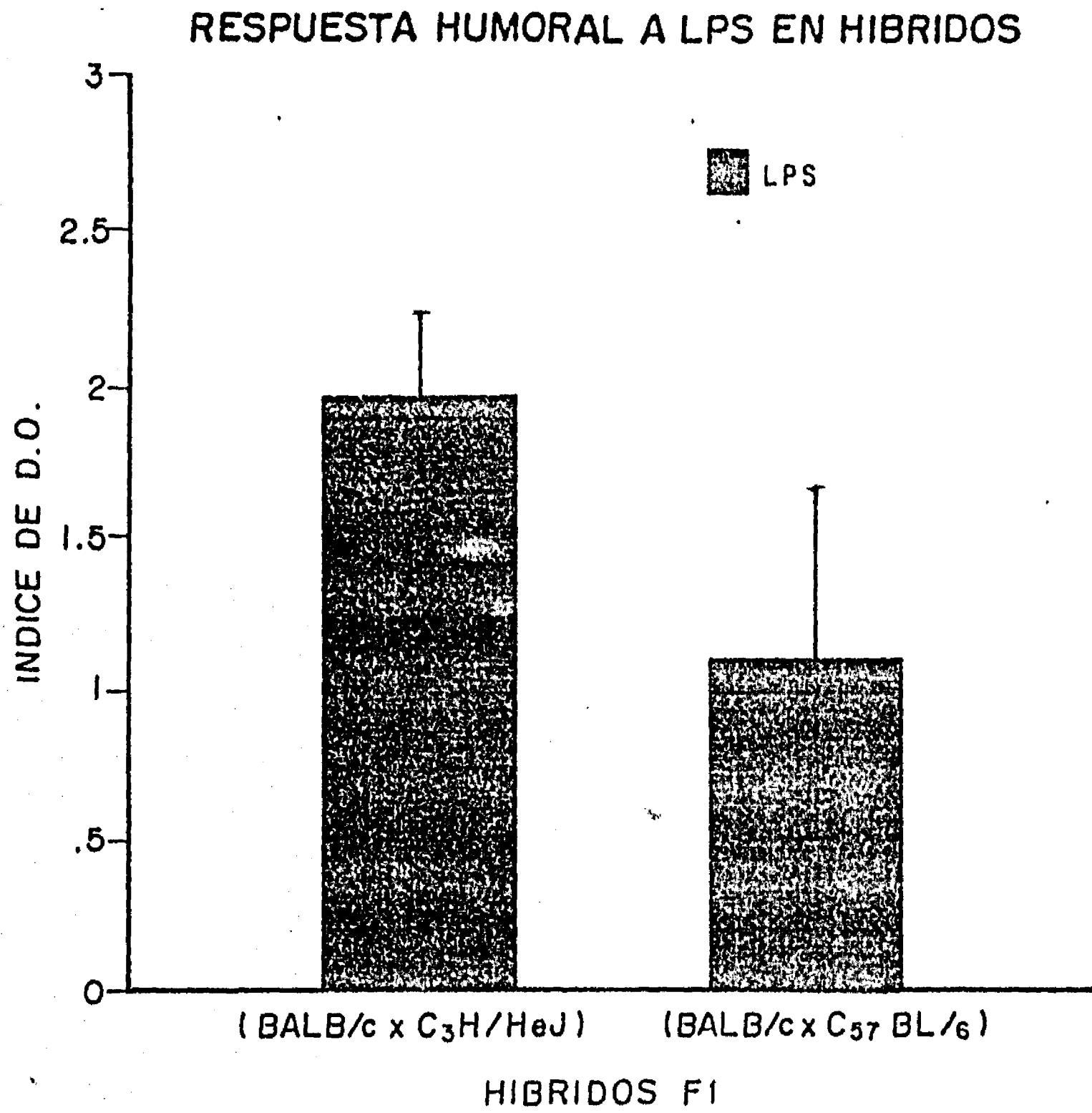


Figura 20. Respuesta inmune humoral a LPS en híbridos F1.

V.

DISCUSION

La Fiebre Tifoidea sigue siendo uno de los principales problemas en Salud Pública aún en países desarrollados; a pesar de todo, aún se conoce poco acerca de los factores microbianos que determinan la patogenicidad; esto se debe a que *Salmonella typhi* el agente causal de la fiebre tifoidea, solo es patógena en humanos y chimpances (23).

La infección por *S. typhimurium* en el ratón es hasta ahora el mejor modelo experimental para el estudio de la fiebre tifoidea; esto se debe a que presenta un cuadro clínico muy similar al que ocurre en humanos.

Las porinas, proteínas de membrana externa (PME) localizadas en la superficie de las bacterias gram-negativas; han sido consideradas como inmunógenos importantes para la inducción de una respuesta inmune protectora y específica.

Trabajos previos, han demostrado que las porinas confieren protección al reto con la bacteria homóloga ; los hallazgos más importantes en cuanto a la capacidad inmunogénica de las porinas y las PME ante la infección por *Salmonella typhi* son:

Kussi y cols. demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S.typhimurium* protegían al ratón a un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (46,47).

Isibasi y cols. (38) han demostrado que pacientes con fiebre tifoidea producen anticuerpos de clase Ig M hacia una PME de 28 KDa durante la fase aguda de su padecimiento. En la convalecencia, la respuesta fué de Ig G y se dirigió hacia las porinas (38 a 41 KDa).

Además, que la vacunación de ratones NIH con 10 µg a 30 µg de PME de *S. typhi*, indujo protección del 100% al reto con 500 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,Vi:d y *S. typhi* Ty2; y del 30% al reto con la misma dosis de *S. typhimurium*. La administración pasiva de suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d, confirió protección del 100% al reto con 100 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,Vi:d y *S. typhi* Ty2; y del 80% al reto con *S. typhimurium*.

La inmunización de ratones NIH con 30 µg de PME de *S. typhi*, indujo respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos, en presencia de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* o *E. coli*. La inmunización de ratones C57Bl/6 con PME de *S. typhi* indujo una respuesta proliferativa *in vitro* específica de linfocitos T.

La inmunización de ratones NIH con 10 µg de porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d indujo protección de 100% contra el reto de 500 DL₅₀ con la misma bacteria.

En este trabajo, se demuestra la respuesta que se evoca a través del contacto del sistema inmunológico del ratón con extractos purificados de proteínas de membrana externa de *Enterobacteriaceae*; Las cuales se han reportado que inducen una respuesta inmune tanto celular como humoral. En el ratón esta respuesta se halla localizada a nivel del H-2 (locus I) y en los no H-2 (Ii, Lps, Xid).

Otros autores han reportado que el control a la infección por *S. typhimurium* en la etapa inicial se encuentra a nivel del macrófago, proporcionado por el gene *Ity* el cual se encuentra en el cromosoma 1.

Nosotros encontramos que en cepas singénicas la respuesta a la porinas esta controlada por el H-2 siendo los mejores respondedores aquellos que tenían haplotipo H-2^k, *Ity*^r y *Lps*ⁿ; observandose que la cepa C3HeB/FeJ era la que mejor respuesta presentaba; una respuesta intermedia se observo en las cepas de haplotipo H-2^b en contraste los menos respondedores fueron los H-2^d, *Ity*^s y *Lps*ⁿ observada en la cepa BALB/cJ.

Esta respuesta esta relacionada con la resistencia innata a la infección por *Salmonella typhimurium* en cepas murinas (Plant y Glynn 1976; Hormaeche 1979; O'Brien 1979, 1986; Robson y Vas 1972). Por otro lado, otros autores han demostrado una homología entre las porinas de diferentes cepas bacterianas ; esto podría explicar la respuesta inmune humoral y celular a las porinas de *E. coli* y *S. typhimurium* cuando los ratones se inmunizan con las PME de *S. typhi* 9,12,VI:d.

Un dato de interes es que algunas cepas de ratones como la H-2^d responde mejor a las porinas de *E. coli* pero no a las de *S. typhi*; esto sugiere que las pocas diferencias en la secuencia de aminoácidos de ambas porinas son importantes en asociación con moléculas que codifican para genes H-2.

Además, los genes no H-2 también influyen en la respuesta inmune a porinas; las cepas BALB/c y DBA/2 las cuales difieren solamente en el locus Ity, responden de una manera diferente. Los Ity^F son mejores respondedores que los Ity^S, se piensa que esta respuesta es contra las porinas.

Un hecho inesperado es la diferente respuesta observada entre los ratones Lpsⁿ y Lps^d (C3He/BrEJ y C3H/HeJ respectivamente). Los primeros son mejores respondedores a las porinas; esto pudiera deberse a que las porinas están contaminadas con menos de 0.05% de LPS (determinado por HPLC). Nosotros no sabemos si esta contaminación aumenta una respuesta policlonal proliferativa sobre los ratones Lpsⁿ o si existe una interferencia provocada por el LPS en la presentación de antígeno en los ratones Lps^d como a sido ya demostrado por otros autores.

En conclusión, este estudio sugiere que los genes H-2 y no H-2 son un factor importante en la infección por *S. typhimurium*. la respuesta inmune celular y humoral a un antígeno protector disponible para la elaboración de una vacuna contra fiebre tifoidea podrían ser las porinas.

Pretendemos que esta cepa pueda utilizarse como modelo experimental para la inducción de inmunidad específica y protectora en estudios posteriores.

Sin embargo, es importante realizar los experimentos con retrocruzas para poder cuantificar el efecto aislado de los grupos de genes de los H-2 o en relación con los no-H-2 ; para que finalmente pueda

estudiarse en detalle lo que parece ser evidente en este trabajo que es la interacción de los diferentes grupos de genes en la respuesta inmune.

VI.

BIBLIOGRAFIA.

1. Acharya, I.L.; Lowe, C.L.; Thapa, R.; Gurubacharya, V.L.; Shresta, M.B.; Bact, D.; Cadoz, M.; Shultz, D.; Armand, J.; Bryla, D.A.; Trollfos, B.; Cramton, T.; Schneerson, R. and Robbins, R.B. 1987. "Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminar report. N.Engl.J.Med. 317: 1101-1104.
2. Anderson, E.G. 1968. "Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever." Symposio Series in Immunobiological Standarization. 15: 79-86.
3. Benacerraf, B. 1981. "Role of MHC gene products in immune regulation. science, 212:1229-1238.
4. Benacerraf, Unanue. 1986. Immunologia. "Complejo Principal de Histocompatibilidad." Ed. Medical Panamericana. Ed. 2^{da}.
5. Benacerraf, B. 1986. Overview: "Ic genes". Cellular Immunology. Edited by D.M. Weir. 2:72.1-72.3.
6. Benjamin, W.H.JR.; Turnbough, C.L.; Posey, B.S. and Briles, D.E. 1986. "*Salmonella typhimurium* virulence genes necessary to exploit the I_{ty}^{S/S} genotype of the mouse." Infection and Immunity. Vol:51 N°3. p.872-878.
7. Bragg, P.D. and Hov, C. 1972. "Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*". Biochem. Biophys. Acta. 274:478-488.
8. Braun, V. 1975. "Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*". Biochem. Biophys. Acta. 415:335-377.

9. Buchanan, T.M. and Arko, R.J. 1977. "Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs". *J. Infect. Dis.* 135:879-887.
10. Buchanan, T.M.; Pearce, W.A.; Schoolnick, G.K. and Arko, R.J. 1977. "Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili". *J. Infection. Dis.* 136(supl):132-137.
11. Carpenter, C.B. and David, J. 1987. "Histocompatibility antigens and immune response genes." *Scientific American, Inc.* p.1-7.
12. Carter, P.B and Collins, F.M. 1974. "The route of enteric infection in normal mice". *The J. Exp. Med.* 139:1189-1203.
13. Coutinho, A. 1976. "Genetic control of B-cell responses". II. Identification of the spleen B-cell defect in C3H/HeJ mice". *Scand. J. Immunol.* 5:120-140.
14. Coutinho, A.; E. Gronowicz and B.M. Sultzer. 1975. "Genetic control of B-cell responses. I. Selective Unresponsiveness to Lipopolysaccharide". *Scand. J. Immunol.* 4:139-143.
15. Cvjetanovic, B. and Vemun, K. 1965. "The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines". *Bull WHO.* 32:29-36.
16. Chai, T. and Fould, J. 1974. "Demonstration of missing outer membrane protein in tolG mutant in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 85:465-474.
17. Datta, D.B.; Arden, B. and Henning, U. 1977. "Major protein of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors". *J. Bacteriol.* 128:821-829.

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

19. Pauli, Raimund Di. 1972. "Genetics of the immune response." I. Differences in the specificity of antibody to Lipopolysaccharides among different strains of mice". The Journal of Immunology. 109, Nº2, August

20. Di Rienzo, J.M.; Nakamura, K. and Inouye, M. 1978. "The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions". Annu. Rev. Biochem. 47: 481-532.

21. DuPont, H.L.; Dawkins, A.T. and Snyder, M.J. 1970. "Typhoid fever: Pathogenesis and Immunological Control". N. Engl. J. Med. 283: 686-691.

22. Eisenstein, T.K.; Deakins, L.W.; Killar, L.; Saluk, P.H., and Sultz, B.M. 1982. "Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3He/BFeJ mice and other strains in the C3H lineage". Infection and Immunity. Vol: 36, Nº2. May. p. 696-703.

23. Eisenstein, T.K.; Killar, L.M. and Sultz, B.M. 1984. "Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: Mouse-Strain differences in vaccine- and serum-mediated protection." The Journal of Infectious Diseases. 150 Nº3. Sept. p. 425-435.

24. Engval, E. and Perlman, P. 1971. "Enzyme-Linked Immunosorbent assay." (Elisa). Immunochem. 8: 874-879.

25. Flavell, R.A.; Allen, H.; Burkly, L.C.; Sherman, D.H.; Waneck, G.L. and Widors, G. 1986. "Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex." *Science*. 233:437-443.
26. Frasch, C.E. and Robbins, J.D. 1978. "Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model". *J. Exp. Med.* 147:629-644.
27. Germanier, R. 1984. "Typhoid fever. In Bacterial vaccines." Ed. Germanier, R. Academic Press. pp.137-165.
28. Germanier, R. 1986. "The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results." *Sclavo International Conference on Bacterial vaccines and local immunity. Siena, Italy.* pp.10-12.
29. Germanier, R. 1977. "Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea". *Bol. of Sanit. Panam.* 82:300-311.
30. Germanier, R. and Furer, E. 1975. "Isolation and characterization of *Salmonella typhical* E mutant Ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine". *J. Infection. Dis.* 131:553-558.
31. Glode, M.L.; Scher, I.; Osborne, B. and Rosenstreich, D.L. 1976. "Cellular mechanism of endotoxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice." *The J. of Immunol.* 116:Nº2.p.454-461.
32. Hejfec, L.B. et al. 1966. "A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull WHO.* 30:321-339.
33. Hormaeche, C.E. and Harrington, K.A. 1985. "Natural resistance to *Salmonellae* in mice: Control by genes within the major histocompatibility complex." *The Journal of Infectious diseases.* 152:Nº5.1050-1056.

34. Hornick, R.B.; DuPont, H.L.; Dawkins, A.T.; Snyder, M.J. and Woodard, T.E. 1968. "Evaluation of typhoid fever vaccines in man." Symposia Series in Immunobiological Standardization. 15:143-150.
35. Hornick, R.B.; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; DuPont, H.L.; Dawkins, A.T. and Snyder, M.J. 1970. "Typhoid fever: Pathogenesis and Immunological control." N.Engl.J.Med. 283:686-691.
36. Huckstep, R.L. 1983. "Typhoid fever and other *Salmonella* infections." Ed. E. y S. Livingston, L.T.D., London. pp.4-9.
37. Inouye, M. and Yee, M.L. 1973. "Homogeneity of envelope proteins of *Escherichia coli* separated by gel electrophoresis." J.Bacteriol. 113:304-312.
38. Isibasi, A.; Calva, E.; Ortiz, V.; Fernández, M.; Hernández, A. y Kumate, J. 1985. "Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa." Simposio avances en el uso de vacunas. 1885-1985. p.109-115. México.D.f.
39. Jool. 1982. "Present status and perspectives of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b diseases mediated by monoclonal antibody directed against a *Haemophilus* outer membrane protein." Lancet. 1:366-368.
40. Karkhanis, T.D.; Zelther, J.Y.; Jacson, J.J and Carlo, D.J. 1978. "A new improved microassay to determine 2-keto 3--deoxy octonate in lipopolysaccharide in gram-negative bacteria." Anal.Biochem. 85:598-601.
41. Killar, L.M. and Eisenstein, T.K. 1986. "Delayed-type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*." Infection and Immunity. Vol:52 Nº2. p.504-508.

42. Killar, L.M. and Eisenstein, T.K. 1984. "Differences in delayed-typed hypersensitivity responses in various mouse strains in the C3H lineage infected with *Salmonella typhimurium*, strain SL3235." The Journal of Immunology. 133: N°3, Sept. p.1190-1196.
43. Kiyono, H.; Babb, J.L.; Michalek, S.M, and McGhee, J.R. 1980. "Cellular basis for elevated IgA responses in C3H/HeJ mice." The Journal of Immunology. Vol:125, p.732-737.
44. Kumate, J. 1980. "Tifoidea". En Kumate, J. y Gutierrez G. Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
45. Kumate, J. 1979. "Inmunidad, inmunización y vacunas." Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp.227-247.
46. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H.; Vallonen, M. and Mäkelä, P.H. 1979. "Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice." Infect.Immun.25:857-862.
47. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H. and Mäkelä, P.H. 1982. "Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparation in experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide." Infect.Immun.34: 328-332.
48. Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4." Nature.227:680-685.
49. Levine, M.M.; DuPont, H.L.; Hornick, R.B.; Snyder, M.S; Woodward, W.; Gilman, H.R. and Libonatti, J.P. 1976. "Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhioral* vaccine : Potential deletereous effects of lyophization". J.Infect.Dis.133:424-429.

50. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193: p. 261-275.

51. Mäkelä, P. Helena, Marianne H.; Harry Saxén.; Matti Valtonen and Ville Valtonen. 1988. "Salmonella, Complement and mouse macrophages". *Immunology Letters*, 19: 217-222.

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

53. Murphy, D.B. 1986. "Overview": The murine MHC. Genetic and Molecular Immunology. Fourth Edition. Weir, D.M. p. 100.1-100.19.

54. Nauclel, C.; Ronco, E.; Guenet, J.L. and Pla, M. 1988. "Role of H-2 and non-H-2 genes in control of bacterial clearance from the spleen in *Salmonella typhimurium*-infected mice." *Infection and Immunity*, 56, No. 9. p. 2407-2411.

55. Nikaldo, H. 1983. "Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes : Porins and phage lambda receptor protein." *Methods in Enzymology*, 97: 85-100.

56. Nikaldo, H. and Vaara, M. 1985. "Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability." *Microbial Rev.* 49: 1-32.

57. O'Brien, A.D. 1986. "Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*." *Current topics in Microbiology and Immunology*, Vol: 124, 37-48.

ESTA TESIS DE
SALUD PÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

58. O'Brien, Alison D and Metcalf Eleanor S. 1982. "Control of early *Salmonella typhimurium* growth in innately Salmonella-resistant mice does not require functional T Lymphocytes". The J. of Immunol. 129: N°4, p.1349-1351.

59. O'Brien, A.D.; Metcalf, E.S. and Rosenstreich, D.L. 1982. "Defect in macrophage effector function confers *Salmonella typhimurium* susceptibility on C3H/HeJ mice." Cellular Immunol. 67:325-333.

60. O'Brien, A.D. and Rosenstreich, D.L. 1983. "Genetic control of the susceptibility of C3HeB/FeJ mice to *Salmonella typhimurium* is regulated by a locus distinct from known Salmonella response genes." 131, N°6, 2613-2615.

61. O'Brien, A.D.; Rosenstreich, D.L.; Scher, I.; Campbell, G.H.; MacDermott, R.P and Formal, S.B. 1980. "Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice : Role of the LPS gene." The Journal of Immunology. 124, N°1, 20-24.

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

63. O'Brien, A.D.; Rosenstreich, D.L. and Taylor, B.A. 1980. "Control of natural resistance to *Salmonella typhimurium* and *Leishmania donovani* in mice by closely linked but distinct genetic loci." Nature. 287:440-442.

64. O'Brien, A.D.; Taylor, B.A. and Rosenstreich, D.L. 1984. "Genetic control of natural resistance to *Salmonella typhimurium* in mice during the late phase of infection." The Journal of Immunology. 133, 3313-3318.
65. Osborn, M.J.; Gander, J.E.; Parisi, E. and Carson, J. 1972. "Mechanism and assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane." J. Biol. Chem. 247: 3962-3927.
66. Osborn, M.J. and Wu, H.C. 1980. "Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria". Annu. Rev. Microbiol. 34: 369-422.
67. Paul, W.E.; 1989. "Fundamental Immunology". Edition, edited by William, E. Paul. Raven Press, Ltd., New York.
68. Pittman, M. and Bohner, H.J. 1966. "Laboratory assays of different types of field trial typhoid vaccines and relationship to efficacy in man". J. Bacteriol. 91: 1713-1723.
69. Plant, J. and Glynn, A.A. 1974. "Natural resistance to *Salmonella* infection, delayed hypersensitivity and *Ir* genes in different strain of mice". Nature, 248: 345-347.
70. Plant, J. and Glynn, A.A. 1979. "Localizing *Salmonella* resistance gene on mouse chromosome 1." Clin. Exp. Immunol. 37: 1-6.
71. Polish Typhoid Committee 1965. "Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland." Bull WHO. 32: p.15-27.
72. Reitman, M. 1967. "Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*". J. Infect. Dis. 117: 101-107.

73. Robbins, J.D. and Robbins, J.B. 1984. "Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi:antigen) of *Salmonella typhi*. J.Infect.Dis. 150:436-449.

74. Rosenstreich, D.L. and Glode, M. 1975. "Difference in B cell mitogen responsiveness between closely related strains of mice." 115, N°3. p.777-780.

75. Schafer, R.; Nacy, C.A. and Eisenstein, T.K. 1988. "Induction of activated macrophages in C3H/HeJ mice by avirulent *Salmonella*. The J.of Immunol. 140:N°5.1638-1644.

76. Schmitges, C.J. and Henning, V. 1976. "The major proteins the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane heterogeneity of protein." I.Eur.J.Biochem. 63:47-52.

77. Schnaitman, C.A. 1970. "Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis." J.Bacteriology. 104:882-887.

78. Schnaitman, C.A. 1971. "Effect of Ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 108:553-563.

79. Skidmore, B.J.; Chiller, J.M.; Morrison, D.C. and Weigle, W..O. 1975. "Immunology properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): Correlation between the mitogenic, adjuvant and immunogenic activities." 114:N°2. Part.2. 770-775.

80. Skidmore, Barry J.; Morrison, David C.; Chiller, Jacques M. and Weigle William O. 1975. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS)." II. The Unresponsiveness of C3H/HeJ mouse spleen cells to LPS-induced mitogenesis is dependent on the method used to extract LPS". The Journal of Experimental Medicine. Vol:142, p.1488-1508.

81. Smith, A.W. 1976. Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio. "El ratón." Organización Panamericana de la Salud.

82. Smith, L.; Steinmetz, M. and Hood, L. 1986. "The major histocompatibility complex of the mouse." Genetic and Molecular Immunology. Fourth edition. p.87.1-87.10.

83. Swanson, R.N. and O'Brien. 1983. "Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium* : its gene expressed *in vivo* by 24 hours after infection." The Journal of Immunology. 131, N°6. p. 3014-3020.

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

85. Tully, J.G.; Gaines, S. and Tigertt, W.D. 1963. "Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever." IV Role of antigen in protection. J. Infect. Dis.

86. Verghese, M.W.; Prince Marilyn and Snyderman Ralph. 1980. "Genetic control of peripheral leukocyte response to endotoxin in mice". The Journal of Immunology". 124:N°2.

87. Wahdan, M.H.; Serie, C.; Cerisier, Y.; Sallam, S. and Germanier, R. 1982. "Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a as oral vaccine against typhoid: Three years results". *J. Infect. Dis.* 145:292-293.

88. Watson, J.; Kelly, K. and Lorgen, M. 1978. The genetic mapping of a locus in mice that controls immune and nonimmune responses to bacterial lipopolysaccharides." *Infection, Immunity and Genetics*. p.25-38.

89. Watson, J.; Kelly, K.; Lorgen, M. and Taylor, B.A. 1978. "The genetic mapping of a defective LPS response genetic in C3H/HeJ mice". *The Journal of Immunology*. 20:N^o2, p.422-424.

90. Watson, J. and Riblet, R. 1975. "Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice." 114:N^o5, p.1462-1467.

91. Wentworth, P.A. and Ziegler, H.K. 1989. "Modulation of macrophage Ia expression by lipopolysaccharide : Stem cell requirements accessory lymphocyte involvement and I-A inducing factor production." *Infection and Immunity*. 57:N^o7, p.2028-2036.

92. Younger, J.S. and Salvin, S.B. 1973. "Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity." *J. Immunology*. 111.

93. Zabriskie, J.B. and Gibofsky, A. 1986. "Genetic control of the susceptibility to infection with pathogenic bacteria." *Current topics in Microbiology and Immunology*. Vol:124 p.1-20.

94. Ziegler, E.K. and Unanue, E.R. 1982. "Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, p.175.