

11262
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

RESPUESTA INMUNE CELULAR A PORINAS
DE *Salmonella typhi*
EN LA RESPUESTA INMUNE EN HUMANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
(especialidad en inmunología)
P R E S E N T A
FRANCISCO ANTONIO BLANCO FAVELA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



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.....	6.
II.	INTRODUCCION.....	8.
III.	MATERIAL Y METODOS.....	22.
1.	METODOS BACTERIOLOGICOS.....	22.
1.1	Cepas bacterianas.....	22.
1.2	Cultivo de bacterias.....	22.
2.	METODOS BIOQUIMICOS.....	23.
2.1	Aislamiento de proteínas de membrana externa.....	23.
2.2	Purificación de porinas por cromatografía de exclusión molecular.....	23.
2.3	Obtención de Lipopolisacárido.....	24.
3.	METODOS ANALITICOS.....	24.
3.1	Cuantificación del contenido proteínas.....	24.
3.2	Cuantificación del contenido de lipopolisacárido.....	25.
3.3	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.....	25.
3.4	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).....	25.
4.	METODOS INMUNOLOGICOS.....	26.
4.1	Obtención de células mononucleares de humanos.....	26.
4.2	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i> ...	26.
4.3	Obtención de subpoblaciones celulares...	28.
IV.	RESULTADOS.....	30.
A.	Aislamiento y caracterización de proteínas de membrana externa de <i>Salmonella</i>	30.
B.	Purificación de porinas de <i>Salmonella typhi</i> 9,12,d,Vi por cromatografía de exclusión molecular....	30.
C.	Evaluación de la respuesta inmune celular a porinas en personas sanas antes y después de la vacuna.....	32.
D.	Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con fiebre tifoidea.	33.
F.	Evaluación de la respuesta inmune humoral a porinas en personas sanas antes y después de la vacuna.....	33.
V.	DISCUSION.....	34.
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	40.

INDICE DE FIGURAS.

- Fig. 1.** Esquema de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas 15.
- Fig. 2.** Perfil electroforético en gel de poliacrilamida SDS PAGE para proteínas de membrana externa 29.
- Fig. 3.** Calibración de la columna de Sephacryl S-200 29.
- Fig. 4.** Patrón de elución de porinas de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi, d en cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200 29.
- Fig. 5.** Patrón de elución de porinas de *S. typhimurium* en cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200 29.
- Fig. 6.** Patrón de elución de porinas de *E. coli* en cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200 29.
- Fig. 7.** Perfil electroforético en gel de poliacrilamida SDS PAGE de porinas 29.
- Fig. 8.** Cinética de respuesta de CMN a mitógeno inespecífico (Con-A) 30.
- Fig. 9.** Respuesta inmune celular antígeno específica (PPD) en humano 30.
- Fig. 10.** Respuesta inmune celular a porinas de *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* en personas sanas antes de la vacuna 31.
- Fig. 11.** Respuesta inmune celular a porinas de *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en personas que recibieron la vacuna parenteral (L) 31.

Fig. 12. Respuesta inmune celular a porinas de *Salmonella typhi*, *S typhimurim* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en personas que recibieron la vacuna oral (Germanier).....**31.**

Fig. 13. Respuesta inmune celular a porinas de *Salmonella typhi*, *S typhimurim* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en una persona que recibió la vacuna oral (Germanier) 3 meses después de aplicada la vacuna**31.**

Fig. 14. Respuesta inmune celular a porinas de *Salmonella typhi*, *S typhimurim* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en pacientes con fiebre tifoidea.....**32.**

Fig. 15. Comparación de la respuesta inmune celular a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en los tres grupos estudiados...**32.**

Fig. 16. Respuesta Inmune humoral a PME de *S. typhi* en el grupo que recibió la vacuna parenteral.....**32.**

Fig. 17. Respuesta inmune humoral a PME de *S. typhi* en el grupo que recibió la vacuna oral.....**32.**

PRINCIPALES ~~AGREVIATURAS.~~

CMN	Células Mononucleares.
cpm	Cuentas por minuto como medición de radioactividad.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxiethyl) 1-piperazin-etano-sulfónico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
IM	Intramuscular.
KDO	Acido 2-ceto-3-desoxioctulónico.
LPS	Lipopolisacárido.
PME	Proteínas de membrana externa.
Porinas	Proteínas formadoras de poro.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
SFB	Suero fetal bovino.
TES	Tris-EDTA-SDS.
VO	Via oral.

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue investigar la capacidad de las porinas de *Salmonella typhi* de estimular la respuesta inmune humoral y celular en humanos, para ello, se utilizaron 10 personas sanas sin antecedentes de fiebre tifoidea, a los que como respuesta basal, se les determinó *in vitro* la respuesta proliferativa de células mononucleares y los niveles de anticuerpos séricos contra las porinas de *Salmonella typhi*. Posteriormente se dividió a las personas sanas en dos grupos: a uno de ellos se le aplicó la vacuna antitifoídica parenteral y al otro la oral, evaluándose nuevamente la respuesta inmune humoral y celular a las porinas. En las mediciones iniciales, las células mononucleares no proliferaron como respuesta a las porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli*, mientras que los niveles de anticuerpos séricos eran bajos. Después de la vacuna se encontró respuesta proliferativa en células mononucleares ante las porinas, acompañada de aumento en los niveles séricos de anticuerpos anti-porinas en los grupos que se les administró la vacuna oral de Germanier. El grupo que recibió la vacuna intramuscular L (inactivada con calor) no mostró niveles apreciables de anticuerpos y la respuesta celular fue nula.

INTRODUCCION

Salmonella typhi es una enterobacteria cuyo huésped exclusivo es el ser humano. Pertenecce a la tribu *Salmonellaeae* del género *Salmonella* y especie *typhi*. Son bacilos anaerobios Gram-negativos, móviles, fermentan glucosa y otros carbohidratos, producen abundante ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y ornitina y son lactosa negativos.(18,53) Según la clasificación de Kauffman-White, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9, 12; los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie posee el antígeno "VI". La fórmula: 9, 12, VI, d. denota a *S. typhi* en forma abreviada.(45)

La fiebre tifoidea se presenta regularmente en forma endémica, por lo que es un problema de salud pública importante en nuestro país. En 1987 se reportaron 11,078 casos con una tasa de 13.64 casos/100 000 habitantes(3,49).

La vía de entrada al organismo es la oral y según Woodward y col. mil millones de bacterias son suficientes para producir la enfermedad. Una vez en el intestino, *Salmonella typhi* puede colonizar o no la luz intestinal antes de penetrar la mucosa del intestino delgado (a diferencia de otras enterobacterias que necesitan colonizar para tener invasividad); además, *Salmonella typhi* en esta fase, no lesiona el epitelio intestinal. Aparentemente la selectividad de *S.typhi* por las células *M*(49,57) le permiten el paso a la lamina propia, sitio en donde la bacteria es fagocitada, preferentemente por el macrofago y llevada al sistema fagocítico mononuclear de donde posteriormente se disemina a todo el organismo; fenómeno denominado bacteremia, de manera tal que en

24 hrs las bacterias se encuentran localizadas intracelularmente y circulando por todo el organismo.

Los mecanismos patogénicos de esta enfermedad no están totalmente esclarecidos; a pesar de ser una de las enfermedades más estudiadas. 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 pútrida 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 tifoídica y tifosa", demostró que las lesiones de la placas de Peyer y ganglios 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(37,38).

Eberth, en 1880, describió la presencia del bacilo tifoídico en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de pacientes con fiebre tifoidea. Pfeiffer, en 1885, aisló por vez primera el bacilo a partir de heces.

En la actualidad se sabe que las manifestaciones clínicas se deben a la liberación de endotoxinas por la bacteria y factores solubles de comunicación celular producidos por el macrófago: Interleucina 1 y caquectina(7,58).

El cuadro clínico está caracterizado por: ataque al estado general, artralgias, mialgias, astenia, adinamia, hiporexia, cefalea, náuseas y fiebre de predominio vespertino, alcanzando picos de 40° C, en una primera fase. Si el paciente no recibe tratamiento adecuado en este momento y el cuadro se agrava, las mani-

festaciones pueden ser de septicemia, estado tífico o shock endotóxico, que puede llevar a la muerte.(49,75)

El diagnóstico de certeza de este padecimiento se establece mediante el aislamiento de la bacteria por hemocultivo, coprocultivo y mielocultivo. Dentro de los análisis serológicos se encuentran las reacciones febriles, o reacción de Widal descritas desde 1895,(37) que da el antecedente de contacto con la bacteria y sólo análisis subsecuentes, que registren aumento en el título, nos podrían establecer el diagnóstico; habiéndose encontrado además como fenómeno concomitante durante la fase aguda, disminución en la cuenta leucocitaria en sangre.(49)

En lo referente a protección contra la enfermedad, se han hecho múltiples intentos por encontrar la forma adecuada e inocua, siendo uno de los primeros intentos el realizado en 1885 por Pfeiffer y Kolle, quienes demostraron que el suero de pacientes convalescentes protegía a cobayos contra dosis letales del bacilo tifoídico. 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. Klixovich posteriormente empleó bacilos muertos con el mismo propósito. Lo anterior indujo a Wright en Inglaterra, y a Pfeiffer y Kolle en Alemania, a utilizar 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 en la mortalidad y morbilidad, así como una atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que sufrieron la enfermedad(30).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas aplicadas por

vía oral, elaboradas a base de bacterias muertas. El efecto de las mismas fue estudiado en el ejército francés; en donde, desafortunadamente, murieron algunos de los individuos vacunados (30).

Las vacunas tifoidicas elaboradas con bacterias muertas se emplearon por décadas sin conocerse su efecto protector real, pues se carecía de modelos experimentales (animales) para demostrar su eficacia, así mismo, no era posible 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, Guayana, 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 la protección era mayor cuando se aplicaban dos dosis (16,34,77,94,101). Sin embargo, ambas provocan reacciones colaterales indeseables (fiebre, cefalea y ataque al estado general).

El hecho de que las vacunas parenterales presenten efectos colaterales indeseables ha motivado la búsqueda de nuevos inmunógenos protectores. A la fecha se han estudiado dos vacunas de administración oral que se elaboran a base de bacterias vivas. Una de ellas a base de una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomycin para su crecimiento y otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (designada por Germanier como Ty 21a) (27,78). Los resultados obtenidos con la vacuna a base de bacterias estreptomycin-dependiente fueron contradictorios, ya que en algunos casos no hubo protección (54).

Los estudios realizados con la vacuna de Germanier en Egipto

demonstraron que era capaz de proteger al 95% de la población vacunada(28,96); 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 indujo protección del 51 al 67% (29).

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 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 (36,48).

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 chimpancés 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(93). Anderson en 1968, demostró que en ratones inmunizados con una mutante aflagelar de *S. typhi*, se obtenía el mismo grado de protección que en aquellos inmunizados con la cepa móvil(2).

Se ha intentado demostrar la relación del antígeno "VI" en los mecanismos de protección. Los primeros estudios datan de 1934, cuando Felix y Pitt informaron de la presencia del antígeno en cepas de *S. typhi* aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, así como la presencia de anticuerpos contra dicho antígeno en el

siero de estos mismos pacientes(24). La aparente falta de relación de los anticuerpos anti-VI con un estado inmune protector ha sido encontrada por varios investigadores(2,36,37,76,98); sin embargo, otros estudios revelan que el antígeno "VI" por sí solo es capaz de inducir protección (1,80). Por lo anterior, se ha acrecentado la importancia que tiene el antígeno "VI" en la virulencia de la cepa infectante, así como la conveniencia de conservarlo en las preparaciones de vacunas (80).

Youmans y Youmans en 1965, demostraron que la fracción ribosomal de *Mycobacterium tuberculosis* era efectiva para inducir inmunidad protectora en el ratón contra el reto del microorganismo homólogo(101). Estos resultados llevaron a investigar en diferentes bacterias la capacidad protectora de estas mismas fracciones. Diversos autores han demostrado los resultados de la protección conferida por antígenos ribosomales de microorganismos tales como *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*(31). En 1970 Venneman y cols. demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhimurium* inducían protección en el ratón contra la bacteria virulenta(95). Resultados similares fueron obtenidos por Molinari y Larralde(64). En trabajos posteriores Molinari y Cabrera demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhi* inducían también protección en ratones(65).

Con el fin de demostrar cuál de las fracciones era la responsable de la protección inducida por el antígeno ribosomal, se realizaron varios estudios con resultados muy diversos. En los primeros trabajos al respecto, Venneman y cols. propusieron como

antígeno protector al ARN ribosomal(95). Por otra parte, Johnson demostró que las proteínas ribosomales inducían protección en los ratones(43). Smith y Biglye sugirieron que tanto el ARN como las proteínas eran necesarias para obtener tal protección(91). Eisenstein y Johnson demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella* estaban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular(22,60). En trabajos subsecuentes, Johnson y cols. demostraron que las proteínas de la envoltura celular de *Salmonella typhimurium* responsables de la protección a los ratones contra la infección por esta bacteria(61). Estos experimentos ponen en duda el papel que juegan las fracciones ribosomales en la protección y apoyan lo sugerido por Mates y Yosipovisi, en el sentido de que los antígenos protectores de *Salmonella* se localizan en la superficie bacteriana(59).

En los últimos años, las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram-negativas han adquirido gran importancia. Así diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el papel que desempeñan en la relación hospedero-parasito. La importancia de ellas se pudo comprender gracias al advenimiento de métodos específicos que permitieron separar la membrana externa de la citoplasmática. Miura y Mizushima describieron el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* empleando esferoplastos preparados con lisosima y EDTA; éstos se lisaron por choque osmótico y posteriormente se separaron en un gradiente de sacarosa la membrana externa de la citoplasmática (62). El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME(72). Schnaitman describió una metodología que evita la preparación de esferoplastos y con-

siste 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(86).

La identificación de las PME se hizo por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Schnaltman fué el primero en informar que *Escherichia coli* contenía una proteína principal, que constituía el 70 % de las proteínas totales de la membrana (84); poco después, conjuntamente con otros investigadores demostraron por electroforesis que en realidad se trataba de cuatro proteínas(9,39,85). Schmitges y Henning describieron una proteína principal, que se podía separar electroforéticamente en dos bandas(83). Actualmente se sabe que el número de las PME es variable y depende de la información genética de la bacteria. Pudiendo variar su expresión por factores tales como las condiciones de cultivo, la temperatura, etc.(56).

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(19,73) y las clasificaron en proteínas principales y menores.

Las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100 000 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*), que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana(69);
- 2) Proteína modificable por el calor (*Omp A*), involucrada

en los procesos de conjugación y que actúa como receptor para fagos y colicinas(13,17,89).

3) Lipoproteína de Braun, unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana(10).

En la figura 1 se muestra la disposición de los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y el arreglo de las proteínas de la membrana externa.

Con respecto a las proteínas menores se ha demostrado que intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular que están relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad de fosfolipasa A(19,73,69).

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevó a investigar su eficacia como inmunógenos protectores. Frascch y cols. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B resultaron ser buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos. y los anticuerpos anti-PME presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento(25).

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*(11). Posteriormente, demostraron que las proteínas de dicha membrana eran las que conferían la protección específica en cobayos a los que previamente se había inducido infección gonocócica experimental(12).

Los hallazgos más importantes en cuanto a la capacidad inmunógena y protectora de las PME y porinas ante la infección por *Salmonella typhi* son:

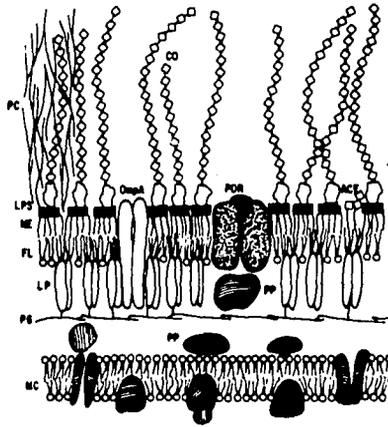


Figura 1: Esquema de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas.

ME: membrana externa; LPS: lipopolisacárido; FL: fosfolípidos; ACE: antígeno común enterobacteriano; POR: porina; OMPA: proteína modificable por el calor; PG: peptidoglicano; LP: lipoproteína; PP: proteína periplásmica; MC: membrana citoplasmática; PC: polisacárido capsular; CO: cadena O.

Kussi y cols. demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S. typhimurium* protegían al ratón de un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (50,51).

Isibasi y col. han demostrado que pacientes con fiebre tifoidea producen anticuerpos de clase IgM hacia una PME de 28 KDa durante la fase aguda de su padecimiento. En la convalecencia, la respuesta fué de IgG y se dirigió hacia las porinas (36 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*. (40,41,42) 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*. El suero de conejo anti-PME utilizado en el ensayo de protección pasiva reconoció por inmunotransferencia, todas las PME de ambas cepas de *S. typhi* empleadas en el reto, pero solamente a las porinas de *S. typhimurium*. (40,41,42)

Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *S. typhi* 9, 12,Vi:d confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,Vi:d, mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no produjeron ningún efecto (41). La administración de anticuerpos monoclonales anti-Idiotípicos de las porinas a ratones BALB/c normales generó una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer a las porinas por inmunoelectrotransferencia. (datos no publicados)

La vacunación 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. (datos no publicados)

La vacunación 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(40,41,42).

Los esplenocitos de ratones NIH inmunizados con 30 µg de PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d, se activaron *in vitro* al cultivarse en presencia de péptidos de porinas de *S. typhi* obtenidos por rompimiento con bromuro de cianógeno. (datos no publicados)

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 diferentes fracciones antigénicas a péptidos de menor tamaño (14,82,102); después, por un proceso no bien definido expresan estos fragmentos en su membrana en conjunto con glicoproteínas de superficie codificadas por genes de clase II del sistema principal de histocompatibilidad (denominados HLA-DR, DQ y DP en el humano). Solo entonces los linfocitos T inductores son capaces de reconocer al antígeno e iniciar una respuesta contra él (14,102). Después del reconocimiento antigénico los linfocitos T4 son activados(97) y las clonas específicas contra los diferentes epitopes son expandidas; como consecuencia estas células secretan una serie de factores solubles de comunicación celular(82), entre los cuales se encuentra IL2 cuya función principal es actuar como factor de crecimiento de linfocitos T(90), como sistema autócrino

lo que permite la expansión de clones específicas contra el antígeno. Esta linfoquina además funciona como factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B (6) que bajo la influencia de ésta y otras linfoquinas dan lugar a la formación de células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Por otro lado, la IL2 es necesaria (4) para la diferenciación de linfocitos T citotóxicos y para (71) la expansión de células asesinas naturales (NK). Otra linfoquina secretada por los linfocitos T4 es el interferón gama (99). Este tiene una gran variedad de efectos biológicos sobre diversos tipos celulares: efecto antiviral(87), activación de macrófagos(87,88) y activación de diversos genes entre los cuales se encuentran los del sistema principal de histocompatibilidad.(15,79).

en infecciones intracelulares como es este caso la inmunidad celular juega un papel importante en la protección contra la infección(46,47,68,81)

En algunos estudios llevados a cabo con *Salmonella typhimurium* se pone de manifiesto la importancia de la inmunidad celular para el control de esta infección(50). 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. Por otro lado, 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.(74)

El principal problema para el estudio de la fiebre tifoidea es que *S. typhi* es patógena solo en humanos y chimpancés(26) y

dado que resulta costoso y poco práctico el trabajo con primates fué necesario idear un modelo humano para analizar la participación de las PME y porinas de *S. typhi* en la respuesta inmune hacia esta bacteria, para lo cual se formó el siguiente modelo experimental:

Se tomó como nuestra a 10 voluntarios sanos del personal del laboratorio donde se realizó este trabajo, las cuales fueron divididos en dos grupos aleatoriamente, se valoró la respuesta inmune celular y humoral a porinas de *S. typhi*, *typhimuriun* y *E. coli* a través de transformación blastoide de CMN y ELISA esta medición que se consideró como testigo negativo o bien como "respuesta" basal. Posteriormente se puso en contacto a las personas con la bacteria a través de la vacuna, así un grupo fué vacunado con la vacuna L y el otro con la vacuna Germanler. Diez días después de haber completado el esquema de vacunación se evaluó la respuesta inmune celular y humoral por las mismas técnicas ante estos antígenos.

Ademas se midió la respuesta inmune celular y humoral a las porinas de *S. typhi*, *typhimuriun* y *E. coli* por los mismos métodos a las personas que en forma natural estuvieron en contacto con la bacteria es decir, los enfermos con fiebre tifoidea.

OBJETIVO PRINCIPAL.

- Valorar la participación de las proteínas de membrana externa (porinas) en la respuesta inmune celular a *Salmonella typhi* en humanos.

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 en voluntarios antes de la vacunación, a las PME y porinas de las diferentes enterobacterias ya mencionadas a través de transformación linfoblástica y ELISA.

- Valoración de la respuesta inmune celular y humoral en voluntarios posterior a la vacunación, a las PME y porinas de las diferentes enterobacterias ya mencionadas a través de transformación linfoblástica y ELISA.

- Valoración de la respuesta inmune celular y humoral en pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea, a las PME y porinas de las diferentes enterobacterias ya mencionadas a través de transformación linfoblástica y ELISA.

MATERIAL Y METODOS.

1. METODOS BACTERIOLOGICOS.

1.1 Cepas bacterianas.

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Salmonella typhimurium*, donadas por el Instituto Nacional de Higiene, *Salmonella typhi* 9,12,VI,d aislada de un paciente con fiebre tifoidea, y *E. coli* donada por el Instituto Nacional de Higiene.

1.2 Cultivo de bacterias.

1.2.1 Las bacterias empleadas para la obtención de PME y porinas se crecieron durante 8 h a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon, en fase logarítmica de crecimiento, por centrifugación a 1650 xg durante 15 min a 4°C. El botón bacteriano se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, con servándose a -20°C hasta su uso.

2. METODOS BIOQUIMICOS.

2.1 Aislamiento de PME.

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman(86), para ello las bacterias cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación a 180 watts (Lab line Ultratrip Labsonic sys-

tem sonicator) en baño de hielo por períodos de 2 min 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 200 000 xg/45 min a 4°C (L8 80 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.), la envoltura celular 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 extrayéndose de ahí las PME por resuspensión en Tris-HCl pH 7.2, Tritón X-100 al 2%, EDTA 5 mM, e incubación durante 10 min a 37°C. y posterior ultracentrifugación a 200 000 xg/45 min./37°C (91). Las PME se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron.

2.2 Purificación de porinas por exclusión molecular.

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido(69). Las bacterias cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento, se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Labsonic system sonicator) en baño de hielo por períodos de dos minutos hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Las bacterias enteras se eliminan 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 con SDS al 2% y se incubó 30 min a 32°C, posteriormente se ultracentrifugó y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contenía peptidoglicana, de donde se extrajeron

las proteínas unidas a ella solubilizándola con Tris 50 mM pH 7.7, SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y β -mercaptoetanol 0.05%; después de un período de incubación de 2 h a 37°C, se ultracentrifugó a 100 000 xg/30 min a 25°C y 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 10 ml/h. Se recupera la fracción que eluye inmediatamente después del volumen vacío, detectada por absorbancia a 280 nm.

3. METODOS ANALITICOS.

3.1. Determinación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas tanto en las preparaciones de PME (obtenidas por Schnaltman) como en las de porinas purificadas (Nikaido); se realizó de acuerdo al método de Lowry(55) con albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

3.2. Determinación de LPS.

La cantidad de LPS contenido en las preparaciones de PME y porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto 3 manooctulónico (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis(44), empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.).

3.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (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 (52). 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 introductor 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 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 tñieron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45:10:45), y se decoloraron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fué transparente.

3.4 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida: ELISA.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-PME en los sueros de las personas estudiadas, se empleó el método de ELISA (23). Placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), fueron recubiertas con 50 μ g/ml de PME en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio pH 9.6), durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó dos veces con PBS-Tween al 0.1% (PBS-T), se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-gelatina al 2%) permaneciendo las placas dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de la muestra problema e incubó la placa durante 3.0 h a 37°C; después de cuatro lavados con PBS-T se añadió 100 μ l de el conjugado (inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de humano conjugadas a peroxidasa (Sigma Co.) e incubó la placa 1.5 h a 37°C; después de 4 lavados con PBS-T se agregaron 100 μ l de solución de sustrato

(o-fenilendiamina, H_2O_2 al 3% en amortiguador de citratos pH 5.0) y a los 20 min, la reacción se detuvo con 1 gota de ac. sulfúrico 2.5 M. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (mini-reader II Dynatec).

4. METODOS INMUNOLOGICOS.

4.1 Preparación de células mononucleares.

En tubos de 50 ml se mezclaron 25 ml de sol. salina isotónica con 15 ml de sangre venosa heparinizada de las personas de la muestra antes y después de la vacuna; con una jeringa y una aguja larga se depositaron 10 ml de Ficoll/Hypaque, Ficoll/diatrizoato de sodio (Hystopaque, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), debajo de la mezcla de sangre y sol. salina. Después de aplicar el Ficoll/Hypaque debe verse una interfase nítida entre la sangre y el Ficoll/Hypaque. Se centrifugaron los tubos en una centrifuga de inicio lento (para evitar disrupción de la interfase) a 1000 rpm (ó 400g) durante 45 min, al terminar, aspirar el plasma sobrenadante (hasta aproximadamente 2 cm arriba del botón celular) y desecharlo. Se aspiró la interfase cuidadosamente, tomando hasta aproximadamente 3/4 partes del Ficoll/Hypaque (evitando aspirar los eritrocitos y PMN que se encuentran debajo de éste). Se depositaron las células en un tubo nuevo y estéril de 50 ml, y se llenó con solución salina, se centrifugó a 600g (aproximadamente 1500 rpm) en centrifuga refrigerada, se repitió este procedimiento dos veces, la tercera vez con solución salina, centrifugando a 360g durante 15 min para deshacerse de las plaquetas. Al terminar el tercer lavado, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640

(GIBCO, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino al 10 % inactivado a 56°C (SHN), al 10%, penicilina G (200 U/ml), gentamicina (10µg/ml), y L-glutamina (0.3 mg/ml). Se colocaron las células en placas de 96 pozos de tal manera que quedan 300 000 células en 100 µl, se agregó el antígeno a una concentración de 40 µg/ml en un volumen de 20 µl y se ajustó el volumen a 200 µl/pozo. Las placas permanecieron en una incubadora de CO₂ a 37°C por 7 días y 18 h antes de cosecharla se les agregó 1 µc/pozo de timidina tritlada. Posteriormente se cosecharon las células con un cosechador de células (Mini Machs II), se retienen los restos celulares, específicamente el DNA en un papel filtro de fibra de vidrio, que pasa a un contador de centelleo líquido β (Bekman inst) reportándose los resultados en cuentas por minuto(67).

4.2 Obtención de macrófagos

Se depositaron 4×10^7 células mononucleares de sangre periférica resuspendidas en RPMI 1640, en un volumen de 4 ml en cajas de Petri, se agregaron 10 ml de medio con suero al 10%, colocándose en incubadora de CO₂ a 37°C durante una hora. Después del período de incubación, se resuspendieron las células cuidadosamente y se aspiró la suspensión de células no adherentes, se agregó PBS pH 7.4 (aproximadamente 5 ml), a temperatura ambiente libre de Ca²⁺ y Mg²⁺. Enseguida se añadió entre 5 y 8 ml de solución EDTA/PBS/glucosa, fría e incubo a 4°C, por 2 horas en el refrigerador. Con ayuda de un gendarme de hule, se talló toda la superficie aspirándose en seguida las células, y depositandolas en un tubo de 50 ml, se lavaron las cajas dos veces más con solución de Hanks'. Esta suspensión con el resto de las células desprendidas anteriormente, se lavaron dos veces más con Hanks, y se resuspen-

dieron en medio con suero al 10%(92).

4.3 Eritrocitos de carnero tratados con neuraminidasa.

10 ml de sangre de carnero estéril diluida 1:1 con solución de Alsever(66), se colocaron en un tubo de 50 ml, lavándose 3 veces con Hanks. Se agregó 50 μ l de neuraminidasa (GIBCO) de Vibro cholerae y se llevaron a 40 ml con Hanks. Se incubó a 37°C durante una hora (con agitación). Y se lavó 3 veces con Hanks, se resuspendió en un volúmen final de 48 ml de RPMI 1640 sin suero.

4.4 Purificación de linfocitos T.

Después de incubar las células mononucleares por 60 min en cajas de Petri de vidrio, las células no adherentes fueron aspiradas, lavadas dos veces con solución salina fisiológica, con el fin de eliminar los macrófagos residuales se trataron con éster metílico de L-leucina (LME, Sigma), de acuerdo al método descrito por Thiele y cols.(5). Los linfocitos T se purificaron mediante formación de rosetas con eritrocitos de carnero tratados con neuraminidasa (ECN), pasados por gradientes de Ficoll/Hipaque.

RESULTADOS.

A. Aislamiento y Caracterización de PME.

Se obtuvieron PME de *S. typhi* 9,12,d,VI (aislada de un paciente con diagnóstico clínico de fiebre tifoidea). De acuerdo al método de Schnaitman(86), (figura 2) Las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares que varían desde 14 hasta 70 Kd, de donde las que tienen pesos moleculares de 30 Kd a 41 Kd corresponden a las proteínas formadoras de canales o porinas(69).

Por exclusión molecular.

La obtención de porinas mediante la técnica de Nikaido(69) se fundamenta en el hecho de que estas proteínas unidas por enlaces iónicos a la peptidoglicana, pueden separarse de ésta, mediante su solubilización en un amortiguador que contenga SDS y 0.5 M de NaCl (fuerza iónica alta). Las proteínas así obtenidas se purifican mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-200.

La figura 3 muestra la calibración de la columna de Sephacryl S-200 con azul dextran, albúmina, y lisosima.

En las figs 4, 5 y 6 se muestran los perfiles cromatográficos de las porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*, obtenidos de la columna de Sephacryl S-200. Se observa que la fracción que eluyó inmediatamente después del volumen vacío contiene las porinas en forma de trímeros (114 a 123 Kd). Esto se demuestra por electroforesis en condiciones de reducción (fig 7), 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 mas sensible, como es la determina-

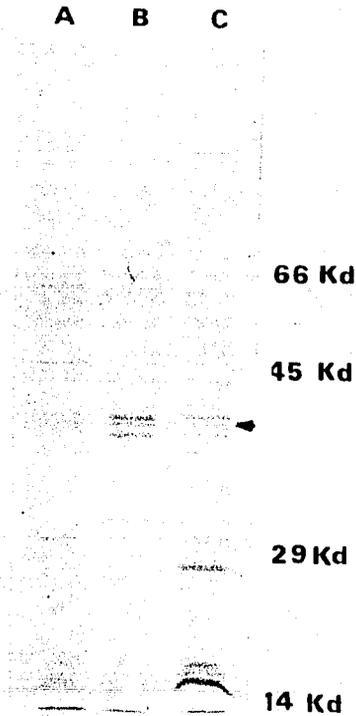


Figura 2: Perfil electroforético en gel de poliacrilamida SDS PAGE para proteínas de membrana externa:

Las proteínas de membrana externa (PME) se obtuvieron por el método de Schnaitman. En el carril A se presenta el patrón de corrimiento electroforético para las PME de *Salmonella typhi* 9,12,Vi,d; en el carril B las PME de *Salmonella typhimurium* y en el carril C las PME de *E. coli*. Se utilizaron como marcadores de pesos moleculares: albúmina sérica bovina (66.2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa) y lisozima (14.4 KDa).

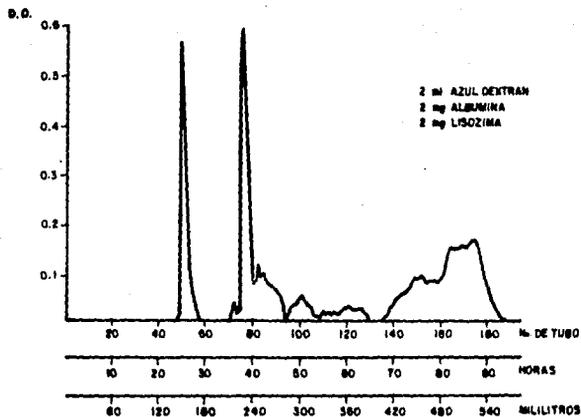


Figura 3: Calibración de la columna de Sephacryl S-200:
 Se muestra el patron de elucion para azul dextran, albumina y lisozima. En las abscisas la escala es expresada en número de tubo, horas y mililitros y en las ordenadas la densidad optica.

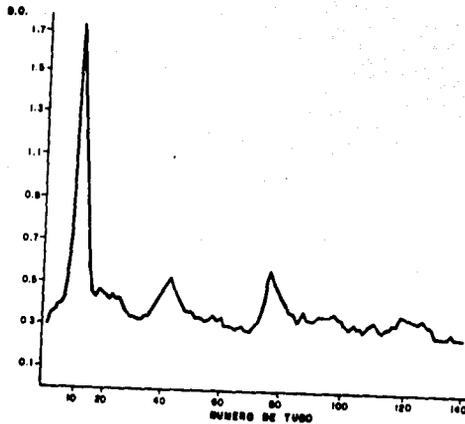


Figura 4: Patrón de elución de porinas de *S. typhi* 9,12,Vi,d. en cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200:

Posterior a la extracción de membranas con SDS se pasó por la columna de Sephacryl S-200 y se obtuvo este patrón de elución, el cual se caracterizó por electroforesis.

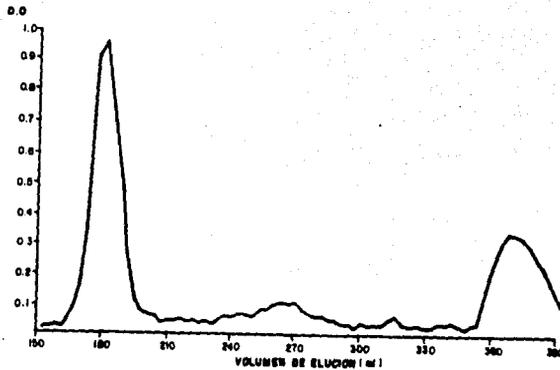


Figura 5: Patrón de elución de porinas de *S. typhimurium* en cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200:

Posterior a la extracción de membranas con SDS se paso por la columna de Sephacryl S-200 y se obtuvo este patrón de elución, el cual se caracterizo por electroforesis.

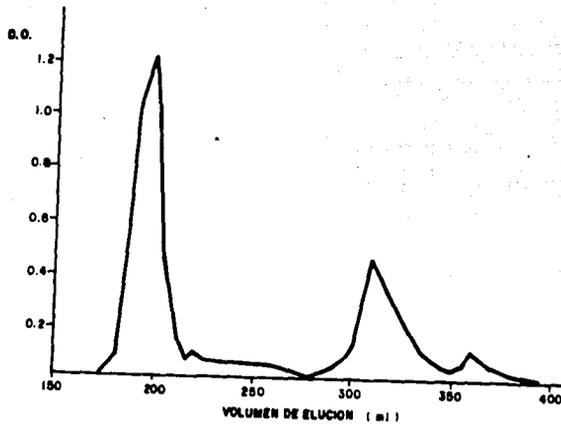


Figura 6: Patrón de elución de porinas de *E. coli* en cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200:

Posterior a la extracción de membranas con SDS se pasó por la columna de Sephacryl S-200 y se obtuvo este patrón de elución, el cual se caracterizó por electroforesis.

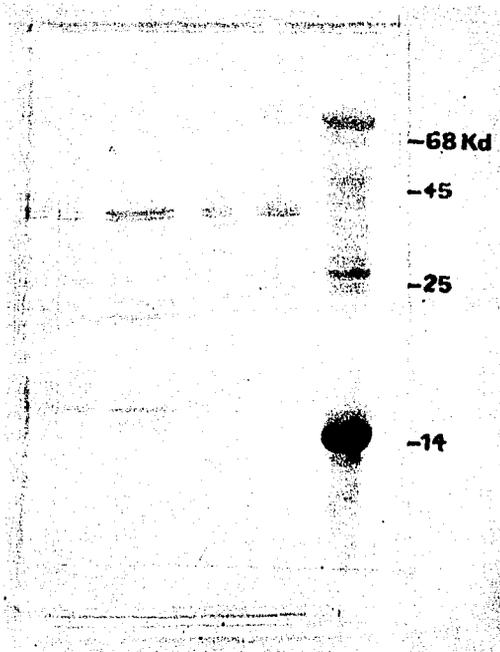


Figura 7: Perfil electroforético en gel de poliacrilamida SDS PAGE de porinas:

Las porinas se obtuvieron por el método de NIKaldo. En el carril A se presenta el patrón electroforético para las PME de *Salmonella typhi* 9,12,Vi,d; en el carril B el patrón de corrimiento electroforético para las PME de *Salmonella typhimurium*; en el carril C el patrón de corrimiento electroforético de porinas de *Salmonella typhi* y en el carril D el patrón de corrimiento electroforético de porinas de *Salmonella typhimurium*. Se utilizaron como marcadores de pesos moleculares: albúmina sérica bovina (66.2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa) y lisozima (14.4 KDa).

ción de ácido β -hidroximiriístico por HPLC, como indicador indirecto de contaminación de LPS, se encontró que ésta era del 0.014 %.

B. Respuesta inmune celular.

Con el fin de estandarizar las condiciones óptimas de los cultivos celulares en el laboratorio, se midió la cinética de respuesta de las células mononucleares a mitógenos inespecíficos; concanavalina A (con-A), Figura 8 observamos que la mejor respuesta está dada en concentración de 300 000 células/ pozo con 15 μ g de con-A, encontrándose además en la curva el fenómeno de dosis respuesta.

A fin de validar el sistema que pensábamos utilizar, se hicieron cultivos celulares antígeno específicos con PPD como antígeno, ya que en nuestra población la respuesta a PPD es un evento normal. Se practicaron pruebas de PPD a personas que no se pensaba incluir en la muestra. Las que resultaron positivas, se les extrajo sangre para hacer cultivos celulares, encontrándose la mejor respuesta a una concentración de 37 μ g/ml de PPD, como se puede apreciar en la figura 9, en la cual también vemos el fenómeno de dosis respuesta.

En la figura 10 se observa el comportamiento de las células mononucleares de las personas sanas (antes de la vacunación) ante las porinas de las diferentes cepas bacterianas ya mencionadas, por dos métodos: el primero que consistió en colocar las CMN en presencia del antígeno, (porinas y PME), y evaluar la respuesta de transformación blastoide. El segundo método, consistió en poner en el pozo las células presentadoras de Ag con el antígeno y las células efectoras, (linfocitos T.) Encontramos ausencia de

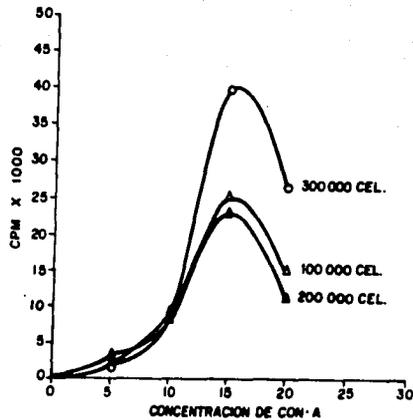


Figura 8: Cinética de respuesta de células mononucleares a mitógeno inespecífico (con-A).

Este experimento fue con la finalidad de estandarizar los cultivos celulares para encontrar las condiciones óptimas de respuesta a través de transformación blastoide. En las ordenadas se expresan CPM X 1000 y en las abscisas concentraciones crecientes del mitógeno (con-A).

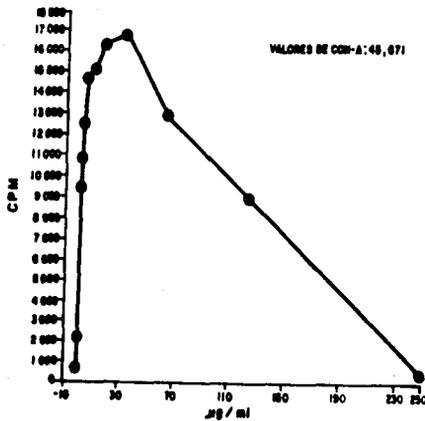


Figura 9: Respuesta inmune celular antígeno específica (PPD) en humano.

Este experimento fue con el fin de encontrar las concentraciones adecuadas del antígeno en cultivos celulares y con el fin de validar el sistema a utilizar. En las ordenadas se mide la respuesta a través de CPM y en las abscisas las concentraciones del antígeno (PPD).

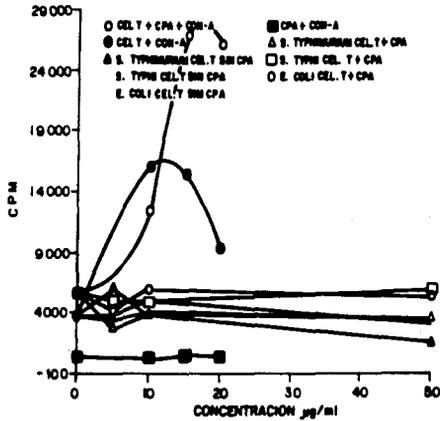


Figura 10: Respuesta inmune celular a porinas de *S.typhi*, *S.typhimurium* y *E.coli* en personas sanas antes de la vacuna.

Las subpoblaciones celulares se obtuvieron por formación de rosetas con eritrocitos de carnero con el fin de observar la respuesta a las porinas por los linfocitos T; se utilizaron células presentadoras de antígeno más las porinas y poblaciones puras de linfocitos T en placas de 96 pozos y se les agregó timidina 24 hrs antes de cosechar.

respuesta a las porinas por los dos métodos. Sin embargo, en los dos casos la respuesta a mitógenos inespecíficos (Con-A) como testigo de viabilidad fué bueno.

En la figura 11 se muestra la respuesta celular de las personas antes y después de la vacuna L (Intramuscular). Se puede observar que las porinas de las diferentes cepas bacterianas no son reconocidas por las células T en ninguno de los dos momentos y en ninguno de todos los casos. Con esto se demuestra que en la protección conferida por este tipo de vacuna no participan las PME o las porinas; probablemente al inactivarlas por calor o acetona las proteínas de membrana externa sufren desnaturalización y por esta razón la vacuna protege por corto tiempo, ya que al no tener participación moléculas protéicas, suponemos que la protección conferida es predominantemente a través de la inmunidad humoral.

Al comparar con el grupo en que se aplicó la vacuna oral, (figura 12) se encontró que 10 días después de la vacunación las CMN reconocen a las porinas y reaccionan contra ellas a concentraciones similares a las obtenidas con el PPD, (cpm de 8000), de tal manera que en la protección que se confiere con la vacuna oral, los componentes proteicos de la membrana celular, específicamente las porinas, juegan un papel relevante en la respuesta inmune celular.

En este mismo grupo encontramos que la respuesta a las porinas no es específica de *S. typhi*, sino que se reconocen epítopes compartidos en las porinas de *S. typhimurium*, estableciéndose respuestas similares o aún mayores en algunos casos que a los antígenos de *Salmonella typhi*.

En una cinética de tiempo (figura 13), encontramos que la

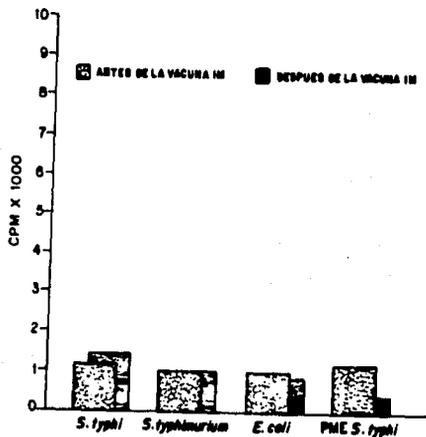


Figura 11: Respuesta inmune celular a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en personas que recibieron la vacuna parenteral (L).

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica por gradiente de ficoll/Hypaque, se colocaron 300 000 células por pozo con 40 μ g de antígeno (porinas y PME). Aquí se compara la respuesta a las porinas y PME antes de la vacuna (L) y después de aplicar ésta. En las ordenadas se expresan CPM X 1000 y en las abscisas los diferentes antígenos.

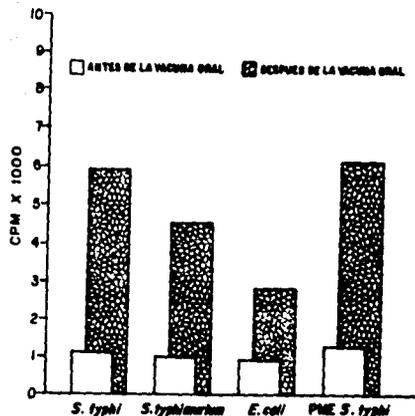


Figura 12: Respuesta inmune celular a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en personas que recibieron la vacuna oral (Germanier).

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica por gradiente de Ficoll/Hypaque, se colocaron 300 000 células por pozo con 40 µg de antígeno (porinas y PME). Se compara la respuesta a las porinas y PME antes de la vacuna oral (Germanier) y después de aplicar esta. En las ordenadas se expresan CPM X 1000 y en las abscisas los diferentes antígenos.

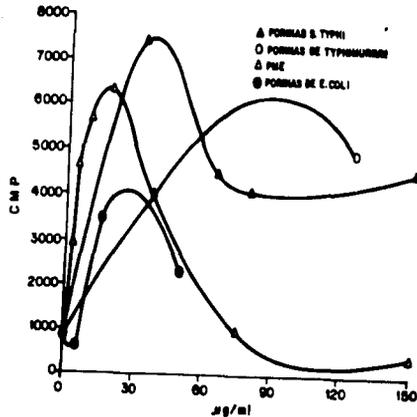


Figura 13: Respuesta inmune celular a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en una persona que recibió la vacuna oral (Germanier) tres meses después de aplicada la vacuna.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica por gradiente de Ficoll/Hypaque, se colocaron 300 000 células por pozo con 40 µg de antígeno (porinas y PME). Se presenta la respuesta a las porinas y PME tres meses después de haber recibido la vacuna oral (Germanier). En las ordenadas se expresan CPM y en las abscisas concentración crecientes de antígenos.

respuesta inmune celular se mantiene con las mismas características que la respuesta inicial, dos y tres meses después respondiendo con la misma intensidad a la misma concentración de antígenos y con la misma magnitud de respuesta cruzada a las porinas de *S. typhimurium*.

La respuesta inmune celular en pacientes con fiebre tifoidea figura 14, fué similar a la de las personas a quienes se les administró la vacuna de Germanler, con respuesta de hasta 23,000 cpm y que se utilizaron como testigos positivos del modelo empleado previamente. En la enfermedad aparentemente no hay reacción cruzada con porinas de otras enterobacterias. Presumiendo que en el modelo natural (enfermedad) la respuesta inmune celular está dada contra un epítotope específico de la porina de *S. typhi* que no es compartido aparentemente por las porinas de otras especies.

La figura 15 muestra la comparación de los 3 grupos estudiados, observando las diferencias entre ellos.

C. Respuesta inmune humoral

En La figura 16 muestra la respuesta de anticuerpos séricos de personas antes y después de la vacunación oral esta medición se utilizó como un método de corroboración del sistema empleado, los resultados son similares a los encontrados en la valoración de la respuesta inmune celular.

La figura 17 muestra la respuesta de anticuerpos séricos de personas antes y después de la vacunación intramuscular, encontramos que los resultados son similares a los vistos en la valoración de la respuesta inmune celular.

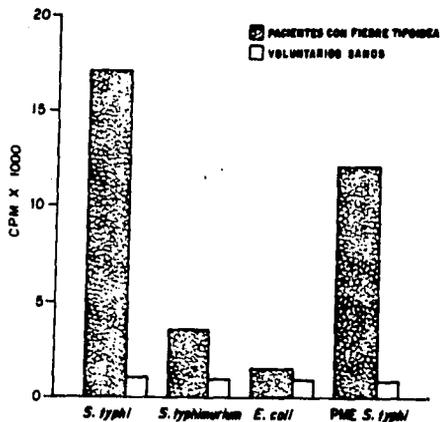


Figura 14: Respuesta inmune celular a porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en pacientes con fiebre tifoidea.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica por gradiente de Ficoll/Hypaque, se colocaron 300 000 células por pozo con 40 µg de antígeno (porinas y PME). Se compara la respuesta de enfermos con la obtenida de los sanos antes de recibir la vacuna. Esta respuesta fue utilizada como testigo positivo.

En las ordenadas se expresan CPM x 1000 y en las abscisas los diferentes antígenos utilizados.

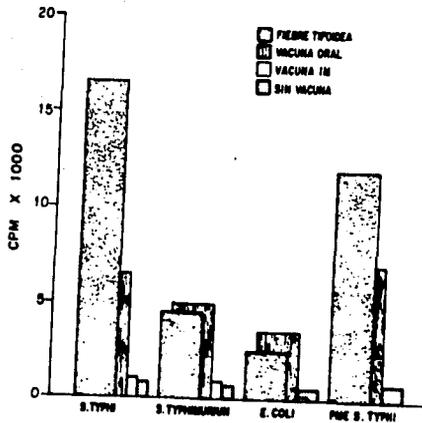


Figura 15: Comparación de la respuesta inmune celular a porcinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* y PME de *S. typhi* en los tres grupos estudiados.

Se compara la respuesta inmune celular de enfermos con fiebre tifoidea con la respuesta obtenida en los grupos que recibieron la vacuna oral y parenteral y los mismos grupos antes de recibir la vacuna.

En las ordenadas se expresan CPM x 1000 y en las abscisas los diferentes antígenos utilizados.

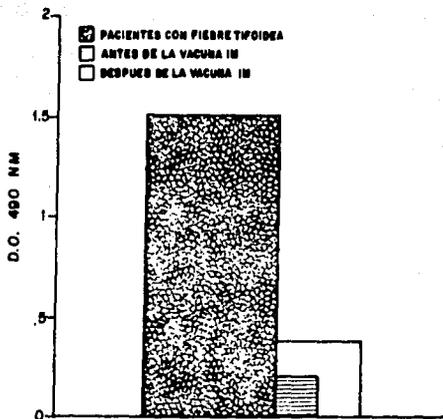


Figura 16 Respuesta inmune humoral a PME de *S. typhi* en el grupo que recibió la vacuna parenteral.

Se valoró la respuesta inmune humoral a PME de *S. typhi* a través de la técnica de ELISA utilizando sueros de personas antes y después de la vacuna parenteral y como testigo positivo los sueros de enfermos con fiebre tifoidea.

En las ordenadas se expresan D.O. 490 nm y en las abscisas los diferentes grupos en estudio.

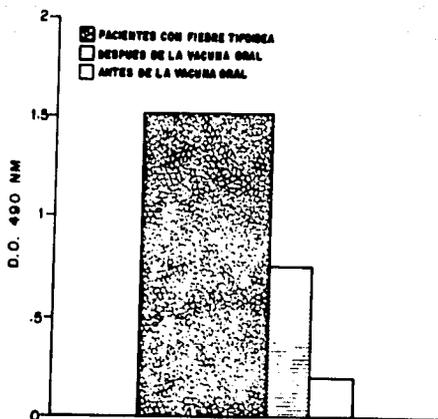


Figura 17 Respuesta inmune humoral a PME de *S. typhi* en el grupo que recibió la vacuna oral (Germanier).

Se valoró la respuesta inmune humoral a PME de *S. typhi*, a través de la técnica de ELISA utilizando sueros de personas antes y después de la vacuna oral (Germanier) y como testigo positivo los sueros de enfermos con fiebre tifoidea.

En las ordenadas se expresan D.O. 490 mn y en las abscisas los diferentes grupos en estudio.

DISCUSION.

El concepto de vacuna no ha variado desde que fué propuesto en el siglo pasado por Louis Pasteur. Este se refiere a la inducción de protección con microorganismos muertos, inactivados o algún producto del mismo. Una vacuna ideal debe inducir inmunidad protectora prolongada, ser específica y no provocar efectos colaterales adversos. Entre las vacunas que cumplen estos requisitos se encuentran las vacunas contra la viruela, la difteria, el tétanos, el sarampión, la rubeola, tosferina y la poliomielitis. Existen otras vacunas como la de la rabia y la de la fiebre tifoidea que confieren protección de corta duración y producen efectos colaterales adversos, por esta y otras razones el desarrollo de nuevas vacunas continúa siendo un campo importante dentro de la investigación científica.

Dentro de los conceptos modernos en la elaboración de vacunas se incluyen tres tipos diferentes: a) las vacunas sintéticas, elaboradas con los determinantes antigénicos involucrados en la inducción de inmunidad; b) vacunas recombinantes, elaboradas mediante la expresión en bacterias o virus del gene que codifica para la proteína responsable de la inmunidad y c) vacunas anti-idiotípicas, basadas en el concepto teórico de la red de idiotipos propuesto originalmente por Jerne, en las cuales el anticuerpo que representa la imagen interna del antígeno, se emplea para inducir el estado de inmunidad protectora(8,35).

El primer paso en la elaboración de nuevas vacunas, consiste en identificar los antígenos responsables de la inmunidad protectora. Las moléculas protéicas localizadas en la superficie celu-

lar, son las que presentan mayores ventajas para ser empleadas como inmunógenos protectores; ésto es, porque habitualmente inducen anticuerpos de alta afinidad y favorecen una respuesta inmune celular, la que genera una inmunidad protectora prolongada, que es crucial en la defensa contra los patógenos intracelulares tales como *S. typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, etc (30,32).

Los hallazgos más importantes en cuanto a la capacidad inmunógena y protectora de de las PME y porinas ante la infección por *Salmonella typhi* son:

Los pacientes con fiebre tifoidea produjeron anticuerpos de clase IgM hacia una PME de 28 KDa durante la fase aguda de su padecimiento. En la convalecencia, la respuesta fuè de IgG y se dirigió hacia las porinas (36 a 41 KDa). 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*. El suero de conejo anti-PME utilizado en el ensayo de protección pasiva reconoció por inmunotransferencia, todas las PME de ambas cepas de *S. typhi* empleadas en el reto, pero solamente a las porinas de *S. typhimurium*.

Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *S. typhi* 9, 12,Vi:d confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,Vi:d, mientras que anticuerpos monoclonales

anti-LPS no produjeron ningún efecto. La administración de anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos de las porinas a ratones BALB/c normales generó una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer a las porinas por inmunoelectrotransferencia.

La vacunación de ratones NIH con 30 μ g 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 vacunación de ratones NIH con 10 μ g de porinas de *S. typhi* 9,12,VI:d indujo protección de 100% contra el reto de 500 DL₅₀ con la misma bacteria.

Los esplenocitos de ratones NIH inmunizados con 30 μ g de PME de *S. typhi* 9,12,VI:d, se activaron *in vitro* al cultivarse en presencia de péptidos de porinas de *S. typhi* obtenidos por rompimiento con bromuro de cianógeno.

Los hallazgos más importantes en esta investigación son los siguientes:

El patrón electroforético de PME y porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* obtenido para la activación celular fue semejante al descrito por Kamio y Nikaido(69). Las similitudes encontradas entre estas proteínas, sugiere que existe una alta homología no solo entre las porinas de ambas especies de *Salmonella*, sino probablemente también, con las de otras bacterias Gram-negativas(20,21,33,69). Además la comparación de las secuencias nucleotídicas entre los genes que codifican para porinas de diferentes bacterias Gram-negativas, muestra que existen homologías entre ellas, hasta del 60% (63,100). Por todos

estos datos, se ha llegado a la conclusión de que los genes que codifican para las porinas, provienen de un gene ancestral común, que se ha conservado durante la evolución(63).

Considerando la estructura secundaria de las porinas se ha propuesto que deben cruzar varias veces la membrana externa para poder anclarse en ella de acuerdo a este modelo de proteína transmembranal, las secuencias de aminoácidos expuestas al medio ambiente deberán ser los receptores para fagos y colicinas(70), y probablemente también de las regiones menos conservadas entre las porinas de diferentes especies bacterianas. Esto hace, que a pesar de la alta homología entre las porinas de diferentes bacterias Gram-negativas, existan determinantes antigénicos privados (propios de cepa) en la superficie bacteriana.

En esta investigación se comprueba la participación de los linfocitos T en la respuesta inmune hacia la *Salmonella typhi*, específicamente hacia las porinas *S. typhi* después de haber sido instruidos *in vivo* (fiebre tifoidea), evento que de alguna manera se suponía por la existencia de IgG dirigida contra porinas en sueros de pacientes convalescientes. Sin embargo, es importante establecer que la inmunidad celular juega un papel importante en el control de la enfermedad(74). Si pensamos en el estado de convalecencia como estado de protección, la inmunidad celular en este caso, está participando en ella a través del reconocimiento de antígenos proteicos, que para esta investigación son las porinas de *S. typhi*.

Otro aspecto importante de esta investigación es el reconocimiento de las porinas (antígenos proteicos) por células mononucleares en personas sanas, vacunadas con *Salmonella* viva. Lo

que demuestra que las porinas son importantes inmunógenos y que participan activamente en la protección puesto que esta vacuna confiere una protección entre un 55 a 90 % y la cual es aparentemente de largo plazo. (28,29,96)

El polo opuesto lo encontramos con las personas vacunadas con la bacteria muerta e inactivada por calor, en donde no se dá el reconocimiento por la células T a las porinas. Es probable que en el proceso de inactivación de la bacteria las proteínas se desnaturalicen con lo que pierden capacidad inmunogénica, mientras que el resto de sus antígenos, generalmente polisacáridicos (antígeno VI, y antígeno O) son más resistentes al proceso de inactivación, por lo que persisten como inmunógenos y se monta una respuesta inmune contra ellos. Estos antígenos generalmente no generan memoria por lo que confieren protección a corto plazo, como realmente sucede y con la necesidad de varias inmunizaciones para obtener la protección adecuada, sufriendo los efectos de la endotoxina en cada inmunización.

Así, este trabajo ratifica la participación de la inmunidad mediada por células a las porinas en la respuesta inmune a la *Salmonella typhi* en humanos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acharya, I.L., Lowe, C.L., Thapa, R., Gurubacharya, V.L., Shrestha, M.B., Bact, D., Cadoz, M., Schulz, D., Armand, J., Bryla, D.A., Trollfors, 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 preliminary report. N.Engl.J.Med. 317:1101-1104.
- 2.- Anderson, E.S. 1968. Proposal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposium Series in Immunobiological Standardization. 15:79-86.
- 3.- Anuario estadístico. 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S. 1988.
- 4.- Baker, P.A., Gillis, S., Ferm, M.M. and Smith, K.A. 1984. The effect of T-cell growth factor on the generation of cytolytic T cells. J. Immunol. 121: 2168.
- 5.- Baker, P.E., Gillis, S. y Smith, K.A. 1979. Monoclonal cytolytic T-cell lines. J. Exp. Med. 149: 273.
- 6.- Bich-thuy, L., Lame, H.C., Fauci, A.S. 1985. Human B-cell proliferation in response to recombinant interleukin 2 is not due to T-cell. Immunol. 121: 353.
- 7.- Blink, M., Sherwin, S.A., Roseblum, M. and Gutterman, J. 1987. Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patient. Cancer Res. 47: 2986.
- 8.- Bona, C. and Moran, T. 1975. Idiotypic vaccines. Ann.Int.Pasteur, Immunologie. 136-C:299-312.
- 9.- Bragg, P.D. and Nov, C. 1972. Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. Biochem.Biophys.Acta. 274:478-488.
- 10.- Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Biochem.Biophys.Acta. 415:335-377.
- 11.- 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.Infect.Dis. 136(supl):132-137.
- 12.- 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.

- 13.- **Chal,T. and Fould,J.** 1974. Demonstration of missing outer membrane protein in tolG mutante in *Escherichia coli*. J.Mol.Biol. 85:465-474.
- 14.- **Chesnut,R.W., Colon,S.M. and Grey,H.M.** 1982. Requirements for the processing of antigens by antigens presenting B cells. Functional comparison of the cell. Tumor and Macrophages. J. Immunol. 129: 2382.
- 15.- **Collins,T., Korman,A.J., Wake,C.T.** 1984. Imune interferon activates multiple class II mayor histocompatibility complex gene and associated invariant chain gene human endothelial cells and dermal fibroblasts. Proc. Natl. Acad. 80.-9ci. USA. 81: 4917.
- 16.- **Cvjetanovic,B. and Vemun,K.** 1968. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull WHO. 32:29-36.
- 17.- **Datta,D.B., Arden,B. and Henning,U.** 1977. Mayor protein of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J.Bacteriol. 128:821-829.
- 18.- **Davies,V.D., Dulbeco,R., Eisen,H.L., Gingberg,H.S. y Wood,W.B.** 1983. Tratado de microbiologia. Salvad Editores, Barcelona España.
- 19.- **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.
- 20.- **Douglas,J.T., Roseberg,E.Y., Nikaldo,H., Verstrete,D.R. and Winter,A.J.** 1984. Porins of *Brucella* species. Infect.Immun. 44:15-21.
- 21.- **Douglas,J.T., Lee,M.D. and Nikaldo,H.** 1981. Protein I of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane is a porin. FEMS Microbial.Lett. 12:305-309.
- 22.- **Eisenstein,T.K.** 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect.Immun. 12:364-377.
- 23.- **Engvall,E. and Perlmann,P.** 1971. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Immunochem. 8:874-879.
- 24.- **Felix,A., Krikorian,K.S. and Reitler,R.** 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J.Hyg. 35:421-427.
- 25.- **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.
- 26.- **Gaines,S.A., Sprinz,A. and Tully,J.** 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological lesions. *J.Infect.Dis.* 118:293-306.
- 27.- **Germanier,R. and Furer,E.** 1975. Isolation and characterization of *Salmonella typhi* gal E mutant Ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. *J.Infect.Dis.* 131:553-558.
- 28.- **Germanier,R.** 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. *Bol.of Sanit.Panam.* 82:300-311.
- 29.- **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.
- 30.- **Germanier,R.** 1984. Typhoid fever. En *Bacterial Vaccines.* Ed. Germanier R. Academic Press. pp. 137-165.
- 31.- **Gregory,R.L.** 1986. Microbial Ribosomal Vaccines. *Rev.Inf.Dis.* 8:208-217.
- 32.- **Hahn,H. and Kaufmann,S.H.E.** 1981. The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Inf. Dis.* 3: 1221-1251.
- 33.- **Hancock,R.E.W., Decad,O.M. and Nikaldo,H.** 1979. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Biochim.Biophys. Acta.* 559:323-331.
- 34.- **Hejfec,L.B.** 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull WHO.* 30:321-339.
- 35.- **Hiernave,J.R.** 1988. Idiotypic vaccines and infectious diseases. *Infect.Immun.* 56:1407-1413.
- 36.- **Hornick,R.B., Dupont,H.L., Dawkins,A.T., Snyder,M.J. and Woodward,T.E.** 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. *Symposia Series in Immunobiological Standardization.* 15:143-150.
- 37.- **Hornick,R.B., Grelisman,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.
- 38.- **Huckstep,R.L.** 1985. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed. E. y S. Livingston, L.T.D., London. pp. 4-9.
- 39.- **Inouye,M. and Yee,M.L.** 1973. Homogeneity of envelope proteins

- of *Escherichia coli* separated by gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 113:304-312.
- 40.- **Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Telez-Girón, J., Paniagua, J. y Kumate, J.** 1988. Papel de las proteínas de membrana externa de *salmonella typhi* en la inducción de protección contra la fiebre tifoidea, en un modelo murino. *Gaceta Médica de México*; 124: 92-97.
- 41.- **Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C. y Kumate, J.** 1988. The role of outer membrane protein from gram-negative bacteria as vaccine with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *salmonella typhi* porins. Cell function and disease. ED. L. Todd; J. Jaz and L. Parker. Plenum, New York.
- 42.- **Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. y Kumate, J.** 1988. Protection against *salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane protein isolate from *Salmonella typhi* 9,12,D.VI. *Infect. Immun.* 56: 2953-2959.
- 43.- **Johnson, W.** 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 5:947-952.
- 44.- **Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J. and Carlo, D.J.** 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3 deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85:595-601.
- 45.- **Kauffman, F.** 1975. Clasificación de bacterias. 1st. edition, Munksgaard, dinamarca.
- 46.- **Kaufmann, S.H.E.** 1982. Possible role of helper and cytotoxic T lymphocytes in antibacterial defense: conclusions based on a murine model of listeriosis. *Rev. Inf. Dis.* 9:5650-5659.
- 47.- **Kishimoto, T.** 1985. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Ann. Rev. Immunol.* 3:133-157.
- 48.- **Kumate, J.** 1979. Inmunidad, inmunización y vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp. 227-247.
- 49.- **Kumate, J. y Gutiérrez G.** 1980. F. tifoidea. Manual de infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.
- 50.- **Kussi, N., Nurminen, M., Saxén, H. and Makela, P.H.** 1982. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.

- 51.- Kussl,N., Nurmlen,M., Saxén,H., Valtonen,M. and Makela,P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. Infect.Immun. 25:857-862.
- 52.- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- 53.- Lemmette. 1982. Manual de Microbiologia Clínica. Editorial panamericana; 3º: 251-279.
- 54.- 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 typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. J.Infect.Dis. 20.-133:424-429.
- 55.- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. J.Biol.Chem. 193:265-275.
- 56.- Lugtenberg,B. and Van Alphen,L. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. Biochem.Biophys.Acta. 737:81-115.
- 57.- Makela,P.H., Hovi M., Saxén,H., Valtomen,M. and Valtonen,V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. Immunology Letters. 19: 217.
- 58.- Malkovsky,P.M., Strober,W. and Dalgleish,A.G. 1988. The Interleukins in acquired disease (review). Clin. Exp. Immunol. 74: 151.
- 59.- Mates,A. and Yosipovici,H. 1976. Localization of the protective antigens in *Salmonella typhimurium*. Microbios. 16:81-90.
- 60.- Misfeldt,M.L. and Johnson,W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect.Immun. 17:98-104.
- 61.- Misfeldt,M.L. and Johnson,W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. Infect.Immun. 24:808-816.
- 62.- Miura,T. and Mizushima,S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of *Escherichia coli* K-12. Biochim.Biophys.Acta. 150:159-161.
- 63.- Mizuno,T., Choo,M.Y. and Inouye,M. 1983. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated ompC gene. J.Biol.Chem. 258:6932-6940.

- 64.- **Molinari, J.L. and Larralde, C.** 1974. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. Rev.Lat.Amer.Microbiol. 16:189-197.
- 65.- **Molinari, J.L. y Cabrera, R.** 1974. Inmunidad inducida con una preparaci3n ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. Rev.Lat. Amer.Microbiol. 16:199-204.
- 66.- **Moreno, J. y Lipsky, P.E.** 1986. Differential ability of fixed antigen-presenting cells to stimulated nominal antigen-reactive and alloreactive T4 lymphocytes. J. Immunol. 136: 3579.
- 67.- **Moreno, J. y Lipsky, P.E.** 1986. Funtional heterogeneity of human antigen-presenting cells: presentation of soluble antigen but not cell-Ia by monocytes. J. Clin. Immunol. 6: 9.
- 68.- **Mosmann, T.R. and Hoffman, R.L.** 1987. Two types of mouse helper T-cell clone Implications for Immunoregulation. Immunol.Today. 8:223-227.
- 69.- **Nikaldo, H. and Vaara, M.** 1985. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol.Rev. 49:1-32.
- 70.- **Noyami, T., Mizuno, T. and Mizushima, S.** 1985. Construction of a series of ompF-ompC chimeric genes by *in vivo* homologous recombination in *Escherichia coli* and characterization of the translation products. J.Bacteriol. 164:797-801.
- 71.- **Ortaldo, J.R. and Heberman, R.B.** 1984. Heterogeneity of natural killer cells. Annu. Rev. Immunol. 2: 359.
- 72.- **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: 3962-3972.
- 73.- **Osborn, M.J. and Wu, H.C.** 1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Annu.Rev.Microbiol. 34:369-422.
- 74.- **Paul, C., Shalata, K. Warren, R.** 1985. Adoptive of murine host protection to salmonellosis with T-cell growth factor-dependent, Salmonella specific T-cell lines. Infect.Immunol.48: 40.
- 75.- **Perez, M.A. y Cabrera, R.** 1974; Medidas preventivas enpleadas en la infecci3n tifoidicas. Rev. Salud publica de Mexico. XV: 185,194
- 76.- **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.
- 77.- **Polish Typhoid Committee.** 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull WHO. 32:15-27.

- 78.- **Reitman, M.** 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J.Infect.Dis. 117:101-107.
- 79.- **Revel, M. and Chebath, J.** 1986. Interferon activated genes. TIBS. 11: 166.
- 80.- **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.
- 81.- **Sayers, T., Macher, I., Chung, J. and Kugler.** 1987. The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide and chemically synthesized nonosaccharide precursor. J. Immunology. 138: 2935
- 82.- **Scala, J. and Oppenheim, J.J.** 1983. Antigen presentation by human monocytes: evidence for stimulant processing and requirement for interleukin 1. J. Immunol. 131: 1160.
- 83.- **Schmitges, C.J. and Henning, U.** 1976. The major proteins the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. Heterogeneity of protein I. Eur.J.Biochem. 63:47-52.
- 84.- **Schnaltman, C.A.** 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by polyacrylamida electrophoresis. J.Bacteriol. 104:882-889.
- 85.- **Schnaltman, C.A.** 1974. Outer membrane proteins of *Escherichia coli* O 111 outer membrane consist of four distinct polypeptide species. J.Bacteriol. 118:442-453.
- 86.- **Schnaltman, 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.
- 87.- **Schreiber, R.D., Hicks, L.J., Celada, A.** 1985. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. J. Immunol. 134: 1609.
- 88.- **Schultz, R.M. and Kleinschmid, W.J.** 1983. Functional identity between murine recombinant gamma-interferon and macrophages activation factor. Nature. 305: 239.
- 89.- **Schweizer, M. and Henning, U.** 1977. Action of major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. J.Bacteriol. 129:1651-1652.
- 90.- **Smith, K.A.** 1984. Interleukin 2 annu. rev. Immunol. 2: 283.
- 91.- **Smith, R.A. and Biegly, N.J.** 1972. Ribonucleic acid protein

fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infect.Immun.* 6:373-383.

- 92.- Thiele,D.L., Kurosaka,M. y Lipsky,P.E. 1983. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell response in human peripheral blood: delimitation by its sensitivity to the lysosomotropic agent L-leucine methyl-ester. *J. Immunol.* 131: 2282.
- 93.- Tully,J.G. Gaines,S. and Tigertt,W.D. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. *J.Infect.Dis.* 112:118-124.
- 94.- Typhoid Panel,U.K. Department of technical cooperation. 1964. A controlled field trial of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Guiana. 30:631-634.
- 95.- Venneman,M.R., Brigley,N.J. and Berry,L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 1:574-582.
- 96.- Wahdan,M.H., Serle,C., Cerisier., Sallam,S. and Germanier,R. 1982. Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a a oral vaccine against typhoid: Three years results. *J.Infect.Dis.* 145:292-293.
- 97.- Waldman,T.A. 1986. The structure, function and expression of Interlukin-2 reseptor on normal and malignant lymphocytes. *Science.* 232: 727.
- 98.- Warren,J.W. and Hornick,R.B. 1979. Immunization against typhoid fever. *Ann.Rev.Med.* 30:457-472.
- 99.- Younger,J.S. and Salvin,S.B. 1973. Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensibility. *J. Immunol.* 111: 1914.
- 100.- Yu,F. 1986. DNA and aminoacid sequences of outer membrane proteins and lipoproteins in bacterial outer membrane as model systems. Ed. Inouye,M. John Wiley and Sons. pp. 419-432.
- 101.- Yugoslav Typhoid Commission. 1964. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-died and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. *Bull WHO.* 30:623-630.
- 102.- Ziegler,E.K. and Unamue,E.R. 1982. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and choloquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 175.