

11261

Universidad Nacional Autónoma de México

9
24



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PORINAS DE
Salmonella typhi CAPACES DE INDUCIR INMUNIDAD
PROTECTORA EN UN MODELO MURINO

T E S I S

Maestría en Ciencias Biomédicas

- Inmunología -

JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F., 1990



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 13.
- II. INTRODUCCION 14.
- III. OBJETIVOS 33.
- IV. MATERIAL Y METODOS 35.
 1. METODOS BACTERIOLOGICOS 35.
 - 1.1 Cepas bacterianas 35.
 - 1.2 Cultivo de bacterias 35.
 - 1.3 Determinación de dosis letal al 50% 35.
 2. METODOS BIOQUIMICOS 37.
 - 2.1 Aislamiento de proteínas de membrana externa 37.
 - 2.2 Purificación de porinas por cromatografía de exclusión molecular 38.
 3. METODOS ANALITICOS 38.
 - 3.1 Cuantificación de proteínas 38.
 - 3.2 Cuantificación de lipopolisacárido 39.
 - 3.3 Cuantificación de LPS por cromatografía líquida de alta resolución 39.
 - 3.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio 41.
 - 3.5 Inmuno-electrotransferencia 42.
 - 3.6 Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) 43.

4. METODOS INMUNOLOGICOS 44.

- 4.1 Modelo murino de protección activa con porinas de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d 44.
- 4.2 Obtención de anticuerpos monoclonales contra moléculas de superficie de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d 44.
- 4.3 Capacidad bacteriolítica de los anticuerpos monoclonales 47.
- 4.4 Ensayo de protección pasiva empleando anticuerpos monoclonales anti-porinas 48.

IV. RESULTADOS 49.

- A. Aislamiento y caracterización de proteínas de membrana externa de *Salmonella* 49.
- B. Purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d por cromatografía de exclusión molecular 49.
- C. Evaluación de la actividad protectora de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d 52.
- D. Obtención de anticuerpos monoclonales 58.
- E. Transferencia pasiva de inmunidad mediante la administración de anticuerpos monoclonales anti-porinas 62.

V. DISCUSION 64.

VI. BIBLIOGRAFIA 76.

PRINCIPALES ABREVIATURAS.

ABHM	Acido β -hidroxi mirístico.
ACF	Adyuvante completo de Freund.
AmC	Anticuerpo monoclonal.
APS	Persulfato de amonio.
BHI	Infusión cerebro-corazón.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CD	Complejo de diferenciación.
CTL	Linfocito T citotóxico.
DL₅₀	Dosis letal al 50%.
DME	Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DME-S	DME suplementado con suero fetal bovino.
DNAasa	Desoxirribonucleasa.
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético.
EFABM	Ester fenacilo del ácido β -hidroxi mirístico.
EFAG	Esteres fenacilos de ácidos grasos.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
Fc	Fragmento cristalizabile de las inmunoglobulinas.
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl) 1-piperazin-etano-sulfónico.
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
HT	Hipoxantina-timidina.
i. p.	Intraperitoneal.
ICAM	Molécula intercelular de adhesión.

Ig Inmunoglobulina .

IL Interleucina .

Kd Kilodaltons

KDO Acido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico .

LFA Antígeno funcional de leucocitos .

LPS Lipopolisacárido .

MAC Complejo de ataque a la membrana (C5-C9) .

MHC Complejo principal de histocompatibilidad .

NIH Cepa abierta de ratones .

PBS Amortiguador de fosfatos-salina .

pho E Omp inducible a concentraciones bajas de fosfatos .

PME u Omp Proteínas de membrana externa .

PNC Papel de nitrocelulosa .

RNAsa Ribonucleasa .

SDS Dodecil sulfato de sodio .

SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio .

SFB Suero fetal bovino .

TCR Receptor de células T .

TRENED N,N,N',N'-tetrametiletilén diamino .

TES Tris-EDTA-SDS .

Tris Tris-(hidroximetil)-aminometano .

UFC Unidades formadoras de colonias .

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Valores de DL₅₀ empleadas en los retos.

Tabla 2. Protección de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d al reto homólogo.

Tabla 3. Protección heteróloga contra *S. typhimurium* de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d.

Tabla 4. Cinética de protección de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d al reto homólogo y heterólogo.

Tabla 5. Actividad bacteriolítica de los anticuerpos monoclonales.

Tabla 6. Protección de ratones NIH mediante transferencia de anticuerpos monoclonales anti-porinas de clase IgM.

INDICE DE FIGURAS.

- Fig. 1. Modelo tridimensional de las porinas.
- Fig. 2. Envoltura de las bacterias gram-negativas.
- Fig. 3. Reconocimiento del antígeno por el linfocito T citotóxico.
- Fig. 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida de PME de *S. typhi* 9,12,V1:d, *S. typhi* Ty2 y *S. typhimurium*.
- Fig. 5. Perfil cromatografico de purificación de porinas de *S. typhi*.
- Fig. 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida de porinas de *S. typhi*.
- Figs. 7. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-porinas de *S. typhi*.
- Figs. 8. Especificidad de los anticuerpos monoclonales.
- Fig. 9. Estructura secundaria de porinas OmpF de *E. coli*.

Fig. 10. Modelo estructural del trimero de la porina *phoE*.

Fig. 11. Modelo de estimulación del sistema inmune murino por porinas de *S. typhi*.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de purificar las porinas de membrana externa de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d, para estudiar su participación en la inducción de protección contra el reto de las cepas homóloga y heteróloga, en el modelo murino.

Las porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d se aislaron mediante la solubilización de la membrana externa y fueron extraídas con una solución reguladora de fuerza iónica elevada, posteriormente se purificaron por cromatografía de exclusión molecular. Sus pesos moleculares fueron de 114 Kd en estado nativo y de 38 a 41 Kd en su forma monomérica. No hubo contaminación de las porinas por lipopolisacárido (LPS), cuando éste fue medido en forma indirecta por la dosificación del ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO).

La inmunización de ratones NIH con dosis de 5 µg de porinas indujo protección hasta del 80% al reto con 500 DL₅₀ de la cepa homóloga; cuando se retó con la cepa heteróloga de *S. typhimurium* no hubo protección.

Se obtuvieron siete hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que reconocieron las porinas por inmunoelectrotransferencia y que tuvieron actividad bacteriolítica *in vitro*. La inmunización pasiva, con líquido de ascitis que contenía estos anticuerpos monoclonales, protegió a ratones del reto de 2.5 y 5.0 DL₅₀.

Los resultados obtenidos demuestran que las porinas son inmunógenos protectores en el modelo murino.

INTRODUCCION

■ Fiebre tifoidea.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión intestinal de *Salmonella typhi*. Esta es una bacteria gram-negativa, móvil, de la tribu *Salmonellae* y de la familia *Enterobacteriaceae*. De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9 y 12; 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 (75).

■ Aspectos históricos.

Thomas Willis, en 1659, describió los diferentes 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 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 (54,56).

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 el mismo año, Pfeiffer y Kolle, demostraron que el suero de pacientes convalescientes protegía a cobayos contra dosis letales de bacilo tifoidico y 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 (54).

* Prevención mediante la vacunación.

La primera inmunización experimental con una suspensión de microorganismos vivos de *Salmonella typhi*, fué realizada en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y en ratones por Bauner y Pfeiffer en 1887. KliKovich 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 en la morbilidad, así como una atenuación de los síntomas en los individuos vacunados que sufrieron la enfermedad (39).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas aplicadas por vía oral, hechas a base de bacterias completas. El efecto de las mismas fué estudiado en el ejército francés, en donde, desafortunadamente, hubo muertos entre los individuos vacunados (39).

Las vacunas tifoidicas 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 (19,51,115,135,144).

El hecho de que las vacunas parenterales presenten efectos colaterales indeseables 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 Ty 21a) (37,117). Los resultados obtenidos con la vacuna hecha a base de bacterias estreptomycinina-dependiente fueron contradictorios, ya que en algunos casos no hubo protección (81).

Los estudios realizados con la vacuna de Germanier en Egipto demostraron que era capaz de proteger al 96% de la población vacunada, según los resultados obtenidos durante un periodo de seguimiento que duró 36 meses, cuando la vacuna se administró a niños en edad escolar con un esquema que incluía 3 dosis en una semana, previa neutralización de la acidez gástrica con 1.0 g de NaHCO_3 (38,138); sin embargo, cuando se aplicó en Chile, se encontró que con tres dosis administradas (cápsulas con capa entérica), con intervalos de 2 ó 21 días entre cada dosis, solo se inducía pro-

tección del 51 al 67%, respectivamente (40).

Cuando se hizo el seguimiento de la protección conferida por la vacuna de Germanier dada en dos formas diferentes en Santiago de Chile y Alejandria, Egipto, se vió que en el primer caso después de cuatro años, la protección fue del 69% mientras que en el segundo, durante tres años de seguimiento fue del 96%. Estas diferencias pueden atribuirse no solo a la diferente formulación y fondo genético sino al hecho de que en Santiago de Chile la incidencia de fiebre tifoidea es el doble (103/100,000 habitantes) que en Alejandria (46/100,000).

Lo anterior sugiere que probablemente la infección y los modos de transmisión de esta enfermedad difieren entre las dos ciudades (82).

* Vacunas experimentales.

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 fué escasa y de corta duración (53,74).

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 anti-

cuerpos contra el antígeno "H", pero no se obtenía protección aún con títulos altos de anticuerpos antiflagelos (134). 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 (3).

Se ha tratado de demostrar la relación del antígeno "Vi" (homopolímero lineal de ácido 2-N-acetil galacturónico) (130) 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 suero de estos mismos pacientes (28,29).

Cuando el antígeno Vi se administró por vía parenteral, no solamente indujo títulos elevados de anticuerpos sino que protegió contra la fiebre tifoidea, cuando se hicieron los estudios de campo en Nepal y en Sudáfrica (1,72). El inconveniente de esta vacuna, es que por su naturaleza polisacáridica, el antígeno protector es T-independiente por lo que no induce memoria. Debido a esto se ha sugerido conjugarlo químicamente a proteínas para conferirle características de antígeno T-dependiente (131).

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 (142). Estos resultados llevaron a investigar la capacidad protectora de estas fracciones en diferentes bacterias. Gran número de 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* (45). En 1970 Venneman y cols. demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhimurium* inducían protección en el ratón contra la bacteria virulenta (137). Resultados similares fueron obtenidos por Molinari y Larralde (99). En trabajos posteriores Molinari y Cabrera demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhi* inducían también protección en ratones (98).

Con el fin de demostrar cuál de las fracciones ribosomales era la responsable de la protección, se realizaron varios estudios con resultados muy diversos. Venneman y cols. propusieron al ARN ribosomal como el antígeno protector (137), Johnson presentó evidencias de que las proteínas ribosomales eran las que protegían a los ratones (62). Smith y Biglye sugirieron que tanto el ARN como las proteínas, se requerían para obtener protección (127). Los trabajos realizados por Eisenstein y Johnson demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella* estaban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular (26,92). En trabajos posteriores, Johnson y cols. demostraron que las proteínas de la envoltura celular de *Salmonella typhimurium* eran las que protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria (93). 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 (65).

* Proteínas de la membrana externa.

Debido a la localización de las proteínas de membrana externa

(PME) en las bacterias gram-negativas tienen gran importancia en la relación hospedero-parasito. Esto se pudo entender gracias al advenimiento 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, éstos se lisaron por choque osmótico y posteriormente se separó en un gradiente de sacarosa la membrana externa de la citoplasmática (95). El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME (109). 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 (122).

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 (120); poco después, él y otros investigadores demostraron por electroforesis que en realidad eran cuatro (9,57,123). Schmitges y Henning describieron una proteína principal, que electroforéticamente se podía separar en dos bandas (119). Actualmente se sabe que el número de las PME es variable y depende de la información genética de la bacteria. Su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo, temperatura, etc. (88).

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 (21,110) y las clasificaron en proteínas principales y menores.

El modelo funcional de las porinas que se ha propuesto de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas y los resultados de microscopía electrónica es el de un trimero compuesto principalmente de estructuras β -plegadas, formando un poro de difusión hidrofílico con un diámetro promedio de 1.5-2.0 nm. Cada una de las porinas está fijada o estabilizada por una cadena triple de lipoproteína en forma de trenza. Consecuentemente, la lipoproteína juega un papel estabilizador del poro (figura 1) (21).

Las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100 000 copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo 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 (103) (figura 1);

2) Proteína modificable por el calor (Omp A), involucrada en los procesos de conjugación y que actúa como receptor para fagos y colicinas (15,20,124) y

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 (10).

En la figura 2 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

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 (21,103,110).

• **Proteínas de membrana externa como inmunógenos protectores.**

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevó a investigar su eficacia como inmunógenos protectores. Frascó 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 (33).

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* (12). 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 (11).

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 (76,77).

Estudios subsecuentes han demostrado que la inmunización con PME derivadas de otras bacterias gram-negativas, como *Haemophilus influenza* (48), *Shigella flexneri* (2) y *Pseudomonas aeruginosa* (41) también confieren protección contra la infección en animales experimentales. Inclusive, se ha elaborado una vacuna a base de PME de *N. gonorrhoeae* (6).

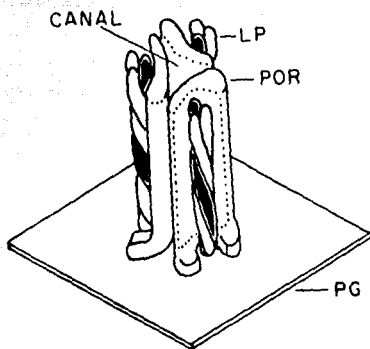


Figura 1. Modelo tridimensional que ilustra la unión de las porinas a la peptidoglicana. LP, lipoproteína; POR, porinas; y PG, peptidoglicana. Tomado de (21).

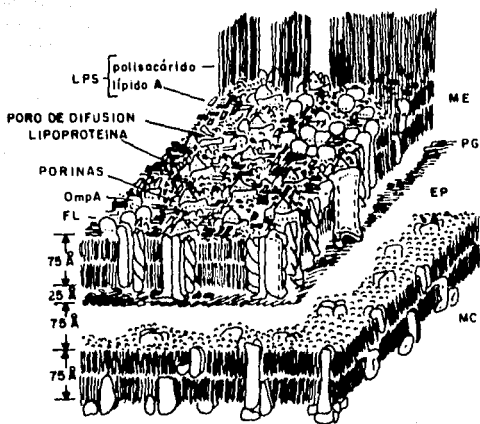


Figura 2. Representación esquemática de la posible arquitectura molecular de la envoltura de las bacterias gram-negativas. FL, fosfolípidos; ME, membrana externa; PG, peptidoglicano; EP, espacio periplásmico; MC, membrana citoplasmática; LPS, lipopolisacárido. Tomado de (21).

Los antígenos proteicos ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de mayor afinidad y favorecer una respuesta inmune celular (25,136). Esta, además de generar una inmunidad más prolongada, es crucial en la defensa contra patógenos intracelulares, como *S. typhi*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* entre otros (70).

En el estudio de la fiebre tifoidea, un problema radica en que *Salmonella typhi* es patógena sólo en el humano y en chimpancés (35). Lo que impide o hace costosa la realización *in vivo* de estudios de protección. El modelo experimental aceptado para el estudio comparativo de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad, es el ratón infectado por *Salmonella typhimurium* (105). La desventaja de dicho modelo es que la cepa infectante difiere de la patógena natural del humano; sin embargo para determinar la eficacia protectora de las vacunas anti-tifoideas, se emplea el modelo murino, usando inyecciones intraperitoneales de *S. typhi* suspendida en mucina (128). Con el modelo murino, se ha analizado el papel que juegan las PME de *S. typhi* en la inducción de protección activa contra el reto de *S. typhi* (56), así como la capacidad que tiene el suero de conejo hiperinmune contra PME de conferir protección pasiva al ratón. Los resultados obtenidos por Isibasi y cols., indicaron que eran las PME las que conferían protección específica a los ratones tanto al reto con la cepa homóloga de *S. typhi* como a la heteróloga de *S. typhimurium* (56); sin embargo, como estas proteínas estaban contaminadas con 6% de endotoxina cabía la duda en cuanto a su papel real como antígenos protectores *per se*. Para poder eliminar este problema se decidió obtener las proteínas en forma pura

por varios métodos. Uno de los seleccionados por este grupo de investigación consistió en extraer a las porinas mediante inmunoadsorbentes específicos elaborados a base de anticuerpos policlonales y monoclonales (113).

* Mecanismos de Virulencia.

Ha pasado más de un siglo desde que *Salmonella typhi* fue aislada y reconocida como el agente causal de la fiebre tifoidea en humanos y sin embargo, los mecanismos de virulencia de esta bacteria no han sido entendidos completamente.

El antígeno Vi de *S. typhi* ha sido objeto de muchas investigaciones desde los años 30 en que se observó su importancia en la patogénesis e inmunidad de la fiebre tifoidea: invariablemente *S. typhi* aislada de sangre de pacientes con fiebre tifoidea contiene este antígeno (30). El antígeno Vi parece no actuar como un prerrequisito de invasión a las células epiteliales, sino más bien como un factor protector de los antígenos O contra la acción de los anticuerpos o el complemento, evitando de esta manera la fagocitosis y la acción bactericida del suero (86). La demostración de que el antígeno Vi no está involucrado en la invasividad de *S. typhi*, se ha realizado en un modelo empleando monocapas celulares como las que se encuentran en el epitelio del carcinoma de cérvix humano (células HeLa) (141).

Jones et al realizaron experimentos de invasividad de *Salmonella typhimurium* a células HeLa y encontraron que cuando se usaban mutantes de esta especie, sin motilidad, no se establecía el contacto entre los dos tipos de células y por lo tanto no se producía la invasión; sin embargo, cuando las células HeLa

se centrifugaron con las cepas mutantes no móviles, se producía la invasión (66). Cuando estos experimentos se repitieron para *S. typhi* empleando el modelo de monocapas celulares de riñón de perro (MDCK), no se obtuvo el mismo resultado, lo que sugirió que esta bacteria requiere de motilidad intrínseca para invadir células epiteliales, y que ésta no puede ser sustituida por fuerzas mecánicas, como en el caso de *S. typhimurium* (66).

Por otra parte, se ha demostrado que el antígeno O aumenta la virulencia de las bacterias, cuando la infección ocurre por una ruta en la cual éstas son expuestas a macrófagos capaces de matar a las salmonelas (69). Este efecto parece ser mediado por la activación de la vía alterna del complemento. Los antígenos O que evitan esta activación, por una concentración relativamente baja de los componentes del complemento en los tejidos, escapan de la fagocitosis y muerte.

En el modelo murino, empleando a *S. typhimurium*, se ha encontrado que ésta es totalmente resistente a la acción del complemento, en virtud de que el antígeno O previene la integración del complejo lítico MAC en la superficie de la membrana externa, e inclusive como el sistema del complemento del ratón es deficiente en el componente C9, es incapaz de lisar a las bacterias sensibles a éste (89).

En cuanto a los mecanismos por los cuales la bacteria evade su destrucción en el interior de los fagocitos, se han propuesto tres probables (70): a) inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma; b) interferencia con los metabolitos reactivos del oxígeno o con las enzimas lisosomales y; c) transición en el interior del citoplasma.

* Mecanismos específicos de defensa.

La respuesta inmune se inicia con la fagocitosis de la bacteria por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APC) digieren las fracciones proteínicas a péptidos (16) y lo expresan en su membrana en unión a glicoproteínas codificadas por el sistema principal de histocompatibilidad (MHC). Esta primera fase, llamada de procesamiento y presentación del antígeno, es indispensable, pues los linfocitos T cooperadores (T_H), responsables de dirigir la respuesta inmune, son incapaces de distinguir al antígeno nativo.

Los T_H ($CD4^+$) reconocen al antígeno asociado a moléculas de histocompatibilidad de clase II (125). La activación de estas células no solo depende de la unión del complejo receptor (TCR)- $CD2$ - $CD3$ al antígeno asociado a moléculas de histocompatibilidad, ya que existen otras moléculas en la superficie de los linfocitos T que intervienen en la regulación de la adhesión con la APC.

Una vez activados los T_H proliferan y producen diversas linfoquinas que conducen la fase efectora de la respuesta inmune (126). En el ratón se han demostrado dos subpoblaciones funcionales de linfocitos cooperadores con distinta capacidad de producción de diferentes interleucinas (IL): los T_{H1} se relacionan con la hipersensibilidad de tipo retardado, ya que elaboran principalmente IL-2, interferón gamma ($IFN-\gamma$) y factor de necrosis tumoral ($TNF-\beta$); en cambio, los T_{H2} , producen fundamentalmente IL-4, 5 y 6, las cuales son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B (101).

Aún cuando los linfocitos B reconocen al antígeno en su forma nativa, para iniciar su activación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos, necesitan la participación de los mediadores solubles producidos por los linfocitos cooperadores. Por su parte, los linfocitos B son capaces de procesar y presentar antígenos, lo cual aumenta la eficiencia del sistema inmune, sobre todo en respuestas secundarias (79). Los linfocitos T también son capaces de procesar y presentar antígenos, pero lo hacen de manera muy ineficiente debido a que su receptor tiene baja afinidad por los péptidos antigénicos (80).

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) ($CD8^+$) participan en la fase efectora celular. A diferencia de los T_H , reconocen antígenos en el contexto de moléculas de clase I de histocompatibilidad. Los CTL al activarse secretan linfocinas, como la IL-2 y el IFN- γ , aunque en menor proporción que los T_H . Los CTL tienen la propiedad de lisar células infectadas por virus o bacterias, así como células tumorales (5); además, se les ha descrito función supresora, la cual es difícil de interpretar bajo la luz de los conocimientos actuales (94).

Para que la citotoxicidad se lleve a cabo es necesario que en primer término entren en contacto la célula infectada con los CTL (42). La formación del conjugado es promovida en un medio rico en iones Mg^{2+} , y se lleva a través del reconocimiento de receptores en la superficie de ambas células como CD8, MHC I, LFA-3 (antígeno funcional de leucocitos), CD2, CD3, TCR y LFA-1 (4,139) (Figura 3).

En la lisis específica por CTL la unión del complejo antígeno-MHC en la célula blanco, con las cadenas α y β del TCR

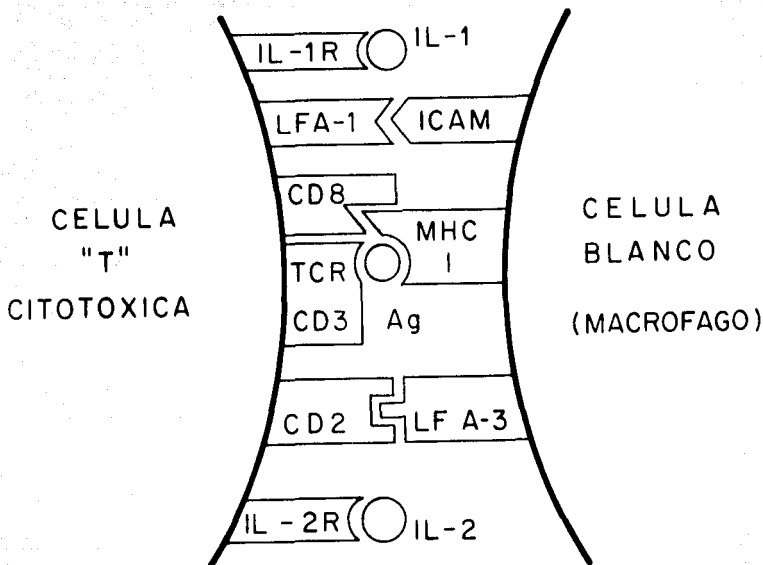


Figura 3. Reconocimiento del antígeno por el linfocito T citotóxico (CTL). La célula citotóxica es activada por mediadores solubles como la interleucina 1 (IL-1) proveniente de un macrófago activado y la interleucina 2 (IL-2) proveniente de un linfocito T cooperador. Una vez activada, esta célula reconoce al antígeno a través de su receptor (TCR) en asociación con moléculas clase I codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC I). La interacción de estas proteínas en conjunto con las interacciones entre las moléculas de adhesión (LFA-1 con ICAM y CD2 con LFA-3) establece las señales a través del complejo CD3 para que se lleve a cabo el mecanismo de lisis. El CD8 es un marcador de linfocitos T citotóxicos que es en parte responsable del reconocimiento del MHC I. (Esquema modificado de: Arthur Weiss, 1989. T Lymphocyte activation. En: Fundamental Immunology, Second Edition, Paul, W.E. edit. Raven Press. N.Y. U.S.A. pg. 360).

activa la maquinaria lítica de las células citotóxicas (en un medio rico en iones Ca^{2+}), con la exocitosis de compuestos solubles provenientes de los gránulos citoplasmáticos como la perforina (46), enzimas hidrolíticas y proteoglicanos entre otros (112). Recientemente, también se ha descrito la participación de una lipasa que es codificada por los CTL cuando éstos son estimulados con IL-4 (47).

Estos compuestos parece que llevan a cabo el "golpe letal" por un ataque directo a la membrana de la célula blanco, de modo que se forman poros de 10 a 20 nm que permiten el paso libre del medio por una diferencia de presión osmótica, ocasionando la lisis y muerte de la célula (31). Se ha encontrado, sin embargo, que también puede llevarse a cabo la citotoxicidad en ausencia de los compuestos solubles secretados por el CTL (133). Se cree que el mecanismo que se lleva a cabo es una autólisis generada por un intercambio de señales a nivel de los receptores de ambas membranas (43).

Por otra parte, recientemente se ha demostrado la presencia del complejo CD3-TCR-CD8 y posiblemente de otras moléculas (CD2 y LFA-1) en las membranas de los gránulos citoplasmáticos que contienen a la perforina y otras enzimas líticas (114). Estos resultados sugieren que los compuestos citotóxicos no son exocitados al medio externo, sino que son transmitidos a través del contacto íntimo entre la membrana de los gránulos citoplasmáticos con la membrana de la célula blanco, con lo que se aseguraría la unidireccionalidad de los compuestos letales hacia la célula infectada.

Independientemente del mecanismo que se efectúe, el CTL escapa de la lisis celular y entonces puede participar en una nueva

interacción lítica (145).

Una vez que el macrófago presenta el antígeno a las células T, se dan todos los mecanismos de citotoxicidad mencionados, por una parte, y por otra, se desarrollan clonas de memoria que confieren inmunidad celular para infecciones posteriores. Por todo lo anterior, para el desarrollo de vacunas contra las bacterias intracelulares, tales como *S. typhi*, deben buscarse antígenos que puedan establecer inmunidad celular prolongada y que carezcan de los riesgos de una reacción alterna, como cuando se inmuniza con bacterias muertas o inactivadas.

OBJETIVOS.**Objetivo General.**

Aislar y caracterizar las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d, con el fin de demostrar el papel que juegan en la inducción de protección en un modelo murino contra el reto a la cepa homóloga.

Objetivos Particulares.

Aislar y caracterizar PME de las siguientes cepas: *Salmonella typhi* 9,12,V1:d (aislada de paciente con fiebre tifoidea), *Salmonella typhi* Ty2 (cepa de la vacuna parenteral) y *Salmonella typhimurium*.

Aislar y caracterizar porinas de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d, mediante métodos bioquímicos.

Evaluar la capacidad de las porinas de *Salmonella typhi* para inducir protección en el modelo experimental murino de salmonelosis empleando como cepas de reto a la homóloga y a *Salmonella typhimurium*.

Producir y caracterizar inmunoquímicamente a los anticuerpos monoclonales dirigidos contra porinas de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d.

Evaluar la capacidad de inducir protección pasiva de los anticuerpos monoclonales anti-porinas de *Salmonella typhi* en el modelo experimental murino de salmonelosis empleando como cepas

de reto a la homóloga y a *Salmonella typhimurium*.

MATERIAL Y METODOS.

1. METODOS BACTERIOLOGICOS.

1.1 Cepas bacterianas.

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Salmonella typhimurium* y *Salmonella typhi* Ty2 donadas por el Instituto Nacional de Higiene y *Salmonella typhi* 9,12,V1:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea.

1.2 Cultivo de bacterias.

1.2.1 Bacterias empleadas para la obtención de PME.

Se crecieron durante 8 h a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A (58) suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon, en fase de crecimiento logarítmica, 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.

1.2.2 Cepas bacterianas utilizadas en la determinación de la dosis letal media (DL₅₀).

Se crecieron durante 18 h a 37°C en agar BHI seguido de una resiembra en el mismo medio, las bacterias se cosecharon a las 8 h de cultivo (fase de crecimiento logarítmico).

1.3 Determinación de la dosis letal media.

Los cultivos bacterianos cosechados en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una concentración de 10⁹ bacterias/ml (0.6 de D.O. a 540 nm); a partir de esta suspensión empleando para

ello un factor de dilución constante se prepararon las siguientes concentraciones:

<i>S. typhi</i> 9,12,V1:d	<i>S. typhimurium</i>
8 000 000 bact/ml	200 000 bact/ml
1 600 000	40 000
320 000	8 000
64 000	1 600
12 800	320
2 560	64

0.5 ml de las bacterias resuspendidas en mucina (mucina gástrica de cerdo al 5% en solución salina estéril) se inocularon, por vía intraperitoneal, a grupos de 10 ratones NIH de 18 a 20 g de peso. Como grupo testigo se emplearon ratones inyectados con 0.5 ml de mucina.

Para *S. typhi* 9,12,V1:d se registró la sobrevivencia tres días después de la administración del inóculo bacteriano, mientras que para *S. typhimurium* se hizo al décimo día; y la DL₅₀ se determinó de acuerdo al método de Reed y Muench (116), según la siguiente fórmula:

$$\text{Log DL}_{50} = \text{log dil } <50\% - (\text{D.P.}) \times \text{log factor de dilución.}$$

en donde:

Log dil <50% = logaritmo de la dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

50% - <50%

D.P. = distancia proporcional = -----

>50% - <50%

50% = dilución de la concentración que mata al 50% de la población.

<50% = dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

>50% = dilución inmediata superior a la dilución que mata al 50% de la población.

2. METODOS BIOQUIMICOS.

2.1 Aislamiento de PME.

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman (122), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación a 180 watts (Lab line Ultratrip Labsonic system sonicator) por periodos 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 x g durante 15 min, del sobrenadante se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a 200 000 x g/45 min a 4°C (L8 80 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.), la cual 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 (200 000 x g/45 min a 4°C) 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 200 000 x g/45 min./37°C (122). 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 (102). 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 Labsonic 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 x g/15 min, la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 x g/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, 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 que contiene SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y β -mercaptoetanol al 0.05%; después de un periodo de incubación de 2 h a 37°C, se ultracentrifugó a 100 000 x g/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 40 ml/h. Se recuperó la fracción que eluye inmediatamente después del volumen de exclusión (V_0), detectada por absorbancia a 280 nm.

3. METODOS ANALITICOS.

3.1. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas tanto en las preparaciones de PHE (obtenidas por Schnaltman) como en las de

porinas purificadas; se realizó de acuerdo al método de Lowry (87) que consiste en hacer reaccionar a la proteína con el cobre en medio alcalino formando un complejo colorido, cuya intensidad de incrementa al agregarse el reactivo de Folin-Ciocalteau. Como proteína de referencia se empleó albúmina sérica bovina (Sigma Co.).

3.2. Cuantificación de lipopolisacárido.

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 (68), empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.). El método consiste en el tratamiento de la muestra problema con ácido sulfúrico 0.2 N a 100°C durante 30 minutos para liberar el LPS, posteriormente se hace reaccionar con ácido peryódico, arsenito de sodio y ácido tiobarbitúrico. El compuesto colorido (rojo) que se forma se mantiene a temperatura ambiente y en solución agregando dimetilsulfoxido. La intensidad del color se determina a 546 nm.

3.3 Cuantificación de LPS por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta determinación se realiza en forma indirecta, cuantificando el ester fenacilo del ácido β -hidroxil mirístico (EFABM), presente en las preparaciones de proteínas.

3.3.1 Obtención de ácidos grasos en suspensiones de porinas.

A las porinas liofilizadas se les agregó 1 ml de NaOH 4N, colocando la solución en una ampolleta, la cual se selló y se ca-

lentó a 100°C por 5 horas. La hidrólisis se acidificó con 2 ml de HCl 4N y los ácidos grasos libres se extrajeron con cloroformo, posteriormente se adicionó Na_2SO_4 anhidro, el extracto se filtró y el cloroformo fue evaporado en un baño maría a 70°C.

3.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF) para ácidos grasos.

Los ácidos grasos libres obtenidos anteriormente fueron analizados por CCF, empleando como estándares los ácidos láurico, mirístico, β -hidroxil mirístico y palmítico (obtenidos de Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, República Federal Alemana), utilizando placas de silicagel y un sistema de disolventes orgánicos constituido por Cloroformo/Eter etílico/Ácido acético (15:35:1), revelando las placas en una cámara de yodo (adsorción inespecífica del yodo sobre las moléculas orgánicas).

3.3.3 Determinación de LPS por el ácido β -hidroxil mirístico (ABHM).

3.3.3.1 Obtención de ésteres fenacilos de ácidos grasos (EFAG).

La preparación de los ésteres se realizó por el método de Wood y Lee (140), a 1 mg del ácido graso se le adicionó 250 μl de una solución de 2-bromoacetofenona (10 mg/ml en acetona) y 250 μl de trietilamina (10 mg/ml en acetona), calentando la solución por 15 minutos a ebullición en baño maría, dejando enfriar la solución para adicionarle posteriormente 750 μl de ácido acético (2 mg/ml en acetona), calentando 5 minutos y finalmente se evaporó el disolvente por calentamiento.

3.3.3.2 Cromatografía en capa fina de los ésteres fenacilos de los ácidos grasos.

Se derivaron los ácidos grasos libres obtenidos de las pori-

nas, conforme al método de Wood y Lee (140) y fueron analizados por CCF, utilizando como estándares los EFAG de los ácidos láurico, mirístico, β -hidroxil mirístico y palmitico, en placas de silicagel fluorescentes y un sistema de disolventes orgánicos de Hexano/Eter etílico (90:10).

Después de realizada la CCF del EFABM en las condiciones antes mencionadas, se eluyeron las manchas que correspondían al EFABM, se le adicionó acetona, se filtró (papel Whatman 40) y posteriormente se evaporó el disolvente. El extracto se disolvió en acetonitrilo y se trazó su espectro de absorción en la región ultravioleta, conjuntamente con el ABHM y 2-bromoacetofenona.

3.3.3.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los EFAG obtenidos de las porinas y los estándares de ácidos grasos, se analizaron por HPLC, en las siguientes condiciones:

Columna: ODS C_{18}

Eluyente: Acetonitrilo/Agua (90:10) (Merck Co. grado HPLC)

Velocidad de Flujo: 1 ml/min (presión 55-60 atm)

Volumen de muestra: 20 μ l

Rango: 0.1 AUFS

Longitud de Onda: 242 nm (Beckman 165 Variable Wavelength Detector)

Velocidad de la Carta: 0.25 cm/min (Beckman 427 Integrator)

3.4 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 gradiente discontinuo de pH (7.8). El gel

superior contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. 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 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, β -mercaptocetanol 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 tixeron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-acido acético-agua (45:10:45) y el exceso de colorante se eliminó empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85).

3.5 Inmunoelectrotransferencia.

La electrotransferencia de PHE y porinas de los geles de poli-acrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se llevó a cabo durante 18h a 100 mA en un equipo Transphor (LKB Instruments). Se empleó como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 20% en Tris 20 mM, pH 8.3 (132). Transcurrido este tiempo y para comprobar que la transferencia se llevó a cabo, una parte del PNC se tixó con tinta china y la otra se colocó 1 h a 37°C en solución de bloqueo [gelatina al 0.25%, Tween 20 al 0.1%, en PBS (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M pH 7.2)]. Después de 4 lavados con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS), el PNC se incubó 3 h a temperatura ambiente con el suero problema; posteriormente se lavó 4 veces con PBS-T y se incubó 1.5 h a temperatura ambiente con la

dilución óptima de antisuero de cabra conjugado a peroxidasa [anti-Ig(s) de conejo ó anti-Ig(s) de ratón (Cappel Lab.)]. Una vez pasado el tiempo de incubación, se lavó dos veces con PBS-T y 2 veces con PBS para finalmente colocarlo durante 20 min en solución de sustrato (4-cloro-1-naftol 2 mM, H₂O₂ al 0.08% en PBS).

3.6 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida: ELISA.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-PME, anti-LPS o anti-porinas en los sueros de conejo y de ratón y en los sobrenadantes de hibridomas, se empleó el método de ELISA (27). Para ello, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), con 50 µg/ml de PME o porinas y con 20 µg/ml de LPS 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) y se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-gelatina al 2%) y se dejaron dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100 µl de la muestra problema y se incubó la placa durante 3.0 h a 37°C; después de cuatro lavados con PBS-T se agregaron 100 µl de conjugado (inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo o ratón conjugadas a peroxidasa (Sigma Co.) 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 y H₂O₂ (30%) al 0.04% en amortiguador de citratos pH 5.0) y a los 20 min, la reacción se detuvo agregando 1 gota de ácido sulfúrico 2.5 M. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II Dynatec).

4. METODOS INMUNOLOGICOS.

4.1 Modelo murino de protección activa con porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d.

La capacidad de las porinas de inducir inmunidad activa, se evaluó, en el modelo experimental murino (128). Para ello, grupos de 10 ratones NIH de 13 a 15 g de peso, se inmunizaron y retaron por vía i.p., de acuerdo al siguiente esquema:

Día	Inmunización porinas (µg)	*Reto DL ₅₀
0	2.5, 5, 10, 30	
15	2.5, 5, 10, 30	
25		20,500

* Las cepas de reto fueron: a) *S. typhi* 9,12,V1:d *S. typhimurium* resuspendidas en mucina al 5% en solución salina estéril.

** Como grupos testigos se emplearon ratones inmunizados con: a) Tris 50 mM-EDTA 5 mM, pH 7.4 y b) Mucina al 5% en solución salina estéril.

† La sobrevivencia se registro durante 10 días después del reto.

4.2 Obtención de anticuerpos monoclonales contra moléculas de superficie de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d.

4.2.1 Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal.

Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c, en condiciones estériles. Los macrófagos así obtenidos se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle, suplementado con 15% de suero fetal bovino (Sigma Co), glu-

tamina 2 mM, glicina 0.3 μ M, 2-mercaptoetanol 50 μ M, estreptomina 100 μ g/ml y penicilina 100 U.I./ml (DME-s). 50 μ l de la suspensión de macrófagos, se colocaron en las placas de cultivo de 96 pozos (Nunc Co.) y se mantuvieron en una incubadora a 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO₂ hasta su uso.

4.2.2 Línea celular de mieloma.

Se emplearon células de la línea de mieloma de ratón SP2/0 (deficiente en HGPRT). Las células SP2 en DME-s, se mantuvieron en incubadora a 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO₂. Las células se cosecharon en fase de crecimiento logarítmica para emplearlas en la fusión.

4.2.3 Células esplénicas inmunes.

Esquema de inmunización: ratones BALB/c fueron inmunizados, por vía intraperitoneal (ip), el día 0, con 70 μ g de porinas de *S. typhi* 9,12,V:1:d en ACF y los días 30, 60 y 90 con 50 μ g de porinas en Tris (50 mM)-EDTA (5 mM).

Obtención de células de bazo: cuatro días después de la última inmunización, en condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y se depositó en una caja de petri conteniendo 5 ml de solución de Hanks (34). Dentro de una campana de flujo laminar, con el objeto de liberar las células plasmáticas, se disgregó el bazo. La suspensión así obtenida, se dejó sedimentar durante 5 min con el fin de eliminar los restos tisulares. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 1200 rpm/5 min. El sedimento se resuspendió en 5ml de DME y el número de células viables se contó en una cámara de Neubauer, mezclando dos gotas de la suspensión de células con dos gotas de azul tripan al 0.2%.

4.2.4 Fusión.

La fusión se efectuó, de acuerdo al método descrito por Kölller y Milstein (36,73). Para esto, en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml, se colocaron y centrifugaron (1200 rpm/5 min) 6.6×10^6 células de bazo/ml y 3.3×10^6 células SP2/ml; la pastilla celular resultante se resuspendió en 0.1 ml de DME y se le agregó lentamente 1 ml de polietilenglicol 4000 (Aldrich Co.). Después de dejar reposar la mezcla 1 min a 37°C, se agregaron 8 ml de DME, gota a gota, y se dejó reposar 5 min a 37°C. Posteriormente se adicionaron 30 ml de DME y después de 5 min se centrifugó a 800 rpm/5 min. La pastilla se resuspendió suavemente en 5 ml de medio DME-s y se agregaron 50 µl de esta suspensión en cada uno de los 96 pozos de una placa de cultivo (Nunc Co.), la cual había sido recubierta con macrófagos. Veinticuatro horas después, se reemplazó el medio DME-s por medio HAT (DME suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina) (85). Posteriormente el cambio de medio se realizó cada tercer día. Al décimo primer día de cultivo, el medio HAT se substituyó por medio HT (DME suplementado con hipoxantina y timidina). Las células se mantuvieron en este medio hasta el día 17.

4.2.5 Selección y clonación de hibridomas.

Cuando los hibridomas cubrieron la tercera parte del fondo del pozo de cultivo, se tomó el sobrenadante para cuantificar, por el método de ELISA, la presencia de anticuerpos específicos. Los hibridomas secretores de anticuerpos anti-porinas, se clonaron dos veces por el método de dilución limitante a 1 y posteriormente a 0.3 células por pozo.

4.2.6 Expansión de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

4.2.6.1 La expansión *in vitro*, se realizó en botellas de cultivo de 80 cm² (Nunc Co). Los sobrenadante resultantes se utilizaron para determinar la especificidad del anticuerpo por electroinmunotransferencia, con el fin de determinar los isotipos y realizar los ensayos de protección pasiva.

4.2.6.2 La expansión *in vivo* se realizó en ratones BALB/c, inoculándolos con 10⁵-10⁶ células de hibridoma en 0.5 ml de DHE o Hank's por vía ip., los cuales habían sido tratados, un mes antes, con 0.5 ml de pristano (2,6,10,14 tetrametilpentadecano. Sigma Co.). Cuando el tumor se hizo evidente, se obtuvo el líquido de ascitis mediante punción peritoneal (91).

4.2.7 Almacenamiento de células.

Con el objeto de conservar a los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, se prepararon viales conteniendo de 1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ cels en solución crioprotectora (9 volúmenes de suero fetal bovino y 1 volumen de dimetilsulfóxido), los cuales se almacenaron a -70°C durante 24 h y posteriormente en nitrógeno líquido.

4.3 Capacidad bacteriolítica de los anticuerpos monoclonales.

Se agregaron diluciones del anticuerpo monoclonal (sobrenadante de cultivo) a 50 bacterias, y posteriormente, como fuente de complemento (20 unidades), se utilizó suero de cobayo. Esta mezcla se incubó a 37°C en presencia de iones calcio. La cuenta de colonias viables se efectuó como unidades formadoras de colonias (UFC), 16 h después por plaqueo y por duplicado en agar infusión

cerebro-corazón (BHI). El efecto lítico se expresó como el porcentaje de disminución en la cuenta de UFC, comparado con la bacteria incubada sin anticuerpo monoclonal.

4.4 Ensayo de protección pasiva mediante la administración de anticuerpos monoclonales.

Grupo de 10 de ratones NIH de 18 a 20 g de peso, se inmunizaron pasivamente por vía i.v. con 0.2 ml de líquido de ascitis o sobrenadantes de cultivos de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales; 1 h después, se retaron por vía i.p. con 2.5 y 5.0 DL₅₀ de *Salmonella typhi* 9.12.V1:d. El grado de protección se evaluó como la sobrevivencia a los 10 días del reto.

RESULTADOS.**A. Aislamiento y caracterización de PME.**

De acuerdo al método de Schnaitman (122), se obtuvieron PME de *S. typhi* 9,12,V1:d (aislada de un paciente con diagnóstico clínico de fiebre tifoidea), de *S. typhi* Ty2 (cepa vacunal) y *S. typhimurium* (responsable de la salmonelosis murina). El comportamiento electroforético en geles de poliacrilamida-sda de las PME se muestra en la figura 4. Las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares desde 14 Kd hasta 70 Kd, observandose similitudes importantes entre las tres cepas en un grupo de proteínas con pesos moleculares entre 36 Kd y 41 Kd (éstas corresponden a las proteínas formadoras de canales o porinas), así como en dos proteínas de 17 Kd y 28 Kd.

B. Purificación de porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d.

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.

En la figura 5 se muestran el perfil cromatográfico obtenido de la columna de Sephacryl S-200 de las porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d. En él se observa que la fracción que eluyó inmediatamente después del volumen vacío contenía las porinas en forma de trimeros (114 Kd a 123 Kd). Esto se demuestra por electroforesis

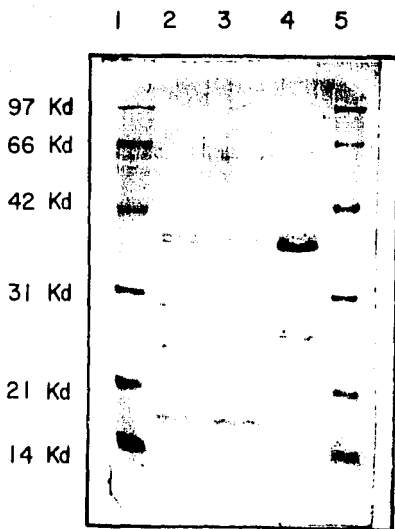


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, teñida con azul de Coomassie, de PME de *Salmonella typhi* aislada por el método de Schnaitman [30 μ g por carril]. Carriles 1 y 5, marcadores de peso molecular (Biorad, Laboratories): fosforilasa b (95 Kd), albúmina sérica bovina (66 Kd), ovoalbúmina (42 Kd), anhidrasa carbónica (31 Kd), inhibidor de tripsina (21 Kd) y lisozima de huevo (14 Kd); carril 2, PME de *S. typhi* 9,12,V1:d; carril 3, PME *S. typhi* Ty2 y carril 4, PME de *S. typhimurium*.

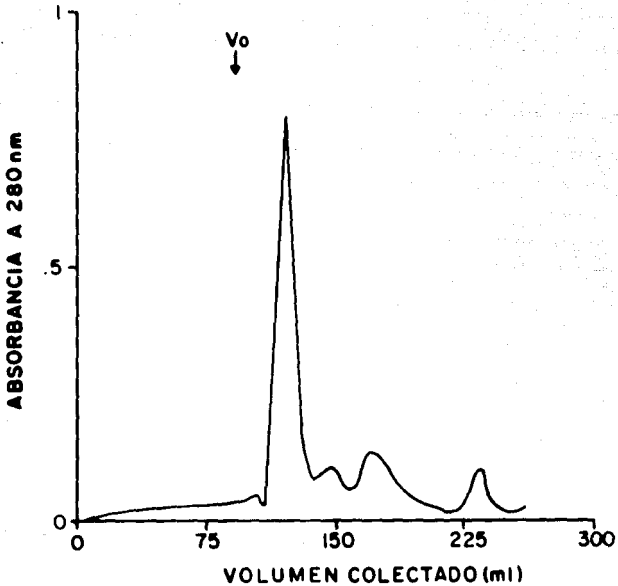


Figura 5. Perfil cromatográfico de purificación de porinas de *S. typhi*, por exclusión molecular. Columna de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical Co.), con una velocidad de flujo de 40 ml/h.

(figura 6), pues solamente se observan dos bandas proteicas de 36 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 0.041%.

C. Evaluación de la actividad protectora de las porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d.

Para analizar la capacidad de las porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d de inducir inmunidad protectora contra la fiebre tifoidea, se empleó el modelo experimental propuesto por la OMS para medir la eficacia de la vacuna tifoidea parenteral "L". Este consiste en determinar la sobrevivencia 10 días después de retar por vía intraperitoneal con la cepa de *S. typhi* resuspendida en una suspensión de mucina al 5%, a ratones previamente inmunizados.

En la tabla 1 se muestran los valores de la dosis letal al 50% (DL₅₀) encontrados para cada una de las cepas de *Salmonella* que se emplearon en el reto.

Tabla 1. Valores de DL₅₀ empleadas en los retos.

Bacteria	DL ₅₀
<i>Salmonella typhi</i> 9,12,Vi:d	2 x 10 ³ bacterias/ml
<i>Salmonella typhi</i> Ty 2	10 ³ bacterias/ml
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 ² bacterias/ml

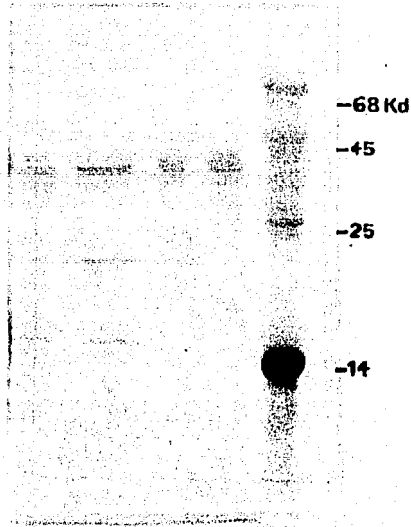


Figura 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS teñida con azul de Coomassie de porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d aisladas como se describió en el texto. Carriles 1 y 2, PME de *S. typhi* obtenidas por el método de Schnaitman, carriles 3 y 4 porinas de la misma bacteria obtenidas por el método de Nikaido y carril 5, estándares de peso molecular (Biorad Laboratories).

Los resultados de protección activa, empleando dos inmunizaciones con 2.5 μ g, 5.0 μ g, 10 μ g y 30 μ g de porinas se muestran en la tabla 2. Como se puede observar en ella, concentraciones de 5 μ g de porinas inducen protección del 100% y del 80% al reto con 20 y 500 DL₅₀ de *Salmonella typhi* 9,12,V1:d respectivamente. Estos resultados sugieren que las porinas tienen epitopos accesibles que confieren inmunidad protectora en contra de la bacteria viva. Sin embargo, cuando se empleó *S. typhimurium* como cepa de reto, los resultados fueron diferentes, ya que 30 μ g de porinas (la dosis de reto más alta), confirieron solamente 45% de protección al reto de 500 DL₅₀ (tabla 3). Los ratones inoculados solo con mucina al 5% (grupo testigo) mueren con retos de 20 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,V1:d y de *Salmonella typhimurium*. Estos resultados muestran que existe una correlación entre la cantidad de porinas administradas y la protección obtenida.

En la tabla 4 se muestra la cinética de sobrevivencia del grupo de ratones inmunizados con 5 μ g de porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d durante los 10 días posteriores al reto. Como se puede observar en ella, esta inmunización confiere una protección del 80% al reto de 500 DL₅₀ de *S. typhi*; mientras que la protección en contra de *S. typhimurium* fue del 0% y se eleva al 20% cuando solamente se emplean 20 DL₅₀. Estos resultados indican que existe un ligero grado de protección cruzada entre *S. typhi* y *S. typhimurium*, aunque parece que los antígenos más importantes en la inducción de protección son epitopos no compartidos.

TABLA 2

Protección en ratones NIH inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d, al reto homólogo.

Cantidad administrada ^a	Sobrevivientes/total ^b	
	Reto: 20 DL ₅₀	Reto: 500 DL ₅₀
2.5 µg	6/10	1/10
5.0 µg	10/10	8/10
10.0 µg	9/10	9/10
30.0 µg	9/10	9/10

^a Se inmunizaron, por vía i.p., grupos de 10 ratones los días 0 y 10 con porinas resuspendidas en 0.2 ml de amortiguador TE. Se retaron el día 25.

^b La protección se expresa como el número de sobrevivientes entre el total de ratones después de un periodo de observación de 10 días.

TABLA 3

Protección heteróloga, contra *S. typhimurium*, de ratones NIH inmunizados con porinas de *S. typhi*.

Cantidad administrada ^A	Sobrevivientes/total ^B	
	Reto: 20 DL ₅₀	Reto: 500 DL ₅₀
2.5 µg	NR	NR
5.0 µg	2/10	0/10
10.0 µg	3/10	3/10
30.0 µg	7/10	4/10

^A Se inmunizaron, por vía i.p., grupos de 10 ratones los días 0 y 10 con porinas resuspendidas en 0.2 ml de amortiguador TE. Se retaron el día 25.

^B La protección se expresa como el número de sobrevivientes entre el total de ratones, después del décimo día de observación.

NR : No realizado.

TABLA 4

Cinética de protección de ratones NIH inmunizados con porinas^a de *S. typhi* y retados con *S. typhi* y *S. typhimurium*.

Dosis de reto	Días post-reto	Sobrevivientes/total	
		<i>S. typhi</i>	<i>S. typhimurium</i>
20 DL ₅₀	0	10/10	10/10
	1	10/10	10/10
	2	10/10	7/10
	3	10/10	2/10
	10	10/10	2/10
500 DL ₅₀	0	10/10	10/10
	1	10/10	5/10
	2	8/10	1/10
	3	8/10	0/10
	10	8/10	0/10

^a Los ratones se inmunizaron por vía i.p. con 5 µg de porinas de *S. typhi* en 0.2 ml de amortiguador TE los días 0 y 10. Se retaron el día 25.

^b Después del reto, se realizó un registro diario de los animales muertos.

D) Obtención de anticuerpos monoclonales

Hibridomas productores de anticuerpos específicos.

De la fusión de las células SP2 con los esplenocitos de ratones inmunizados con porinas, se obtuvieron 46 hibridomas. De éstos, siete produjeron anticuerpos anti-porinas.

Los hibridomas productores de anticuerpos específicos fueron subclonados por dilución limitante a 0.3 células por pozo, y posteriormente su reactividad específica estudiada por ELISA. Se obtuvieron dos subclonas del hibridoma 5F2 productor de anticuerpos anti-porinas. Estos se designaron como P1 y P2. Posteriormente, se derivaron las clonas denominadas 8F5, 8F6, 9E6, 14C2, 14C6, 14D5 y P3 (figura 7). Los siete hibridomas secretaron anticuerpos monoclonales del isotipo IgM.

Análisis de los hibridomas anti-porina por inmunotransferencia.

En la figura 8 se muestran las inmunotransferencias obtenidas cuando se hicieron reaccionar los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas mencionados (anti-porina) con las PME de *S. typhi*. Como puede observarse, los AmC secretados solo reaccionan con la banda de 38 Kd, que corresponde a las porinas de *S. typhi*.

Actividad bacteriolítica de los anticuerpos monoclonales anti-porinas.

Para evaluar el papel de los anticuerpos monoclonales anti-porinas en los mecanismo de defensa contra la infección del microorganismo, se utilizó la lisis celular mediada por complemento (tabla 5). Los AmC 14C2 y 8F6, a una dilución de 1:40, inhibieron en un 95% el crecimiento de colonias de *S. typhi* y el 20% de las UFC de *S. typhimurium*. También se puede observar una

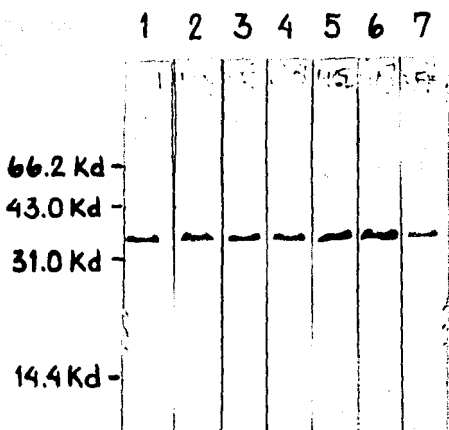


Figura 7. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-porinas de *Salmonella typhi*, medidos por el método de ELISA.

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-PORINAS DE S. typhi

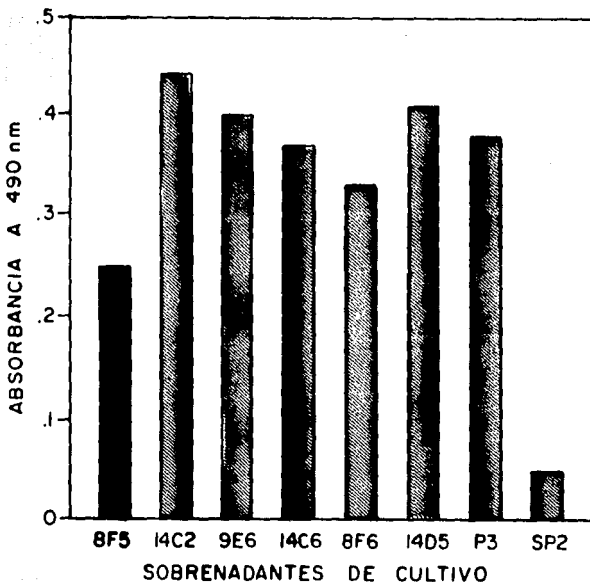


Figura 8. Especificidad de anticuerpos monoclonales (IgM) presentes en los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas, hacia porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d, detectada por inmunotransferencia. Carril 1, 8F5; 2, 14C2; 3, 9E6; 4, 14C6; 5, 8F6; 6, 14D5 y 7, P3.

TABLA 5

Capacidad bacteriolítica del anticuerpo monoclonal 14C2
anti-porinas de *S. typhi*.

Dilución del anticuerpo monoclonal	Porcentaje de bacteriolisis ^a	
	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhimurium</i>
1:40	95	20
1:80	70	15
1:160	55	5
1:320	48	2
SP2/0 (control)	2	0

^a Expresado como la disminución de las UFC con respecto a la bacteria incubada sin el anticuerpo monoclonal.

correlación entre la dilución del anticuerpo y el porcentaje de sobrevivencia del microorganismo como UFC.

E) Transferencia pasiva de inmunidad protectora mediante la administración del anticuerpo monoclonal 14C2.

Finalmente se analizó el papel que los AmC anti-porina podrían jugar en la protección pasiva contra la infección por *S. typhi* en el modelo murino. Los estudios de inmunización pasiva se realizaron mediante la inyección intravenosa de los sobrenadantes de hibridoma o líquido de ascitis a ratones no inmunes una hora antes del reto con bacterias vivas suspendidas en mucina. La tabla 6 muestra los resultados que se obtuvieron en este experimento. Estos sugieren que los AmC anti-porina pueden conferir una ligera protección contra el reto de 2.5 y 5.0 DL₅₀ de *S. typhi*. Comparando estos resultados con los estudios realizados previamente, en los que se emplea un heteroantisuero de conejo anti-PHE, podemos decir que los AmC no son tan efectivos como el antisuero policlonal en la inducción de protección pasiva.

TABLA 6

Protección de ratones NIH contra la infección de *S. typhi* mediante la transferencia de un anticuerpo monoclonal IgM anti-porinas de *S. typhi*.

Anticuerpo administrado ^a	Sobrevivientes/total	
	Reto: 2.5 DL ₅₀	Reto: 5.0 DL ₅₀
AmC 14C2 (sobrenadante de cultivo)	3/10	2/10
AmC 14C2 (líquido de ascitis)	6/10	4/10
Suero de conejo anti-PME	10/10	10/10
SP2/0 (control negativo)	0/10	0/10

^a Grupos de diez ratones fueron retados i.p. con 2.5 DL₅₀ ó 5.0 DL₅₀ de *S. typhi* una hora después de la administración de 0.2 ml de sobrenadante de cultivo de los hibridomas o líquido de ascitis.

DISCUSION.

El concepto de vacuna no ha variado desde que fue 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 prolongada, ser específica y no provocar efectos colaterales adversos. Entre las vacunas que cumplen con esos requisitos se encuentran las vacunas contra la viruela, la difteria, el tétanos, el sarampión, la rubeola y la poliomielitis. Existen otras vacunas como la de la rabia y fiebre tifoidea que tienen los inconvenientes de conferir protección de corta duración y producir efectos colaterales adversos; por lo tanto 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 antigenicos 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-idiotipicas, 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 (8,52,84,129,146).

El primer paso en la elaboración de nuevas vacunas, es identificar los antígenos responsables de la inmunidad. Las moléculas proteicas localizadas en la superficie celular, son las que pre-

sentan 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 prolongada, que es crucial en la defensa contra los patógenos intracelulares tales como *S. typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, etc. (18,49).

Los hallazgos más importantes de este trabajo fueron los siguientes: 1) las PME de *S. typhi* obtenidas mediante la solubilización con un detergente no iónico, tuvieron pesos moleculares de 14 Kd a 70 Kd. Además presentaron como contaminante 6% de LPS ; 2) las porinas de *S. typhi* se aislaron por el método de Nikaído y se encontró que estaban contaminadas con un 0.041% de lipopolisacárido, medido indirectamente por HPLC, mediante la cuantificación de ácido β -hidroxil mirístico. El peso molecular de estas proteínas fue de 114 Kd a 128 Kd en estado nativo (cuando se encuentran asociados en forma de homotrimeros) y de 38 Kd a 41 Kd en su forma monomérica; 3) la vacunación a ratones NIH, con 5.0 μ g (el intervalo de concentraciones usadas fue de 2.5 μ g a 30 μ g) de porinas de *S. typhi*, indujo protección del 100% al reto con 20 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,V1:d y del 80% al reto con 500 DL₅₀; 4) cuando el reto se efectuó con 500 DL₅₀ de *S. typhimurium* la protección fue del 40% con la dosis más alta de inmunización empleada (30 μ g); 5) anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d, con actividad bacteriolítica mediada por complemento, confirieron una ligera protección al reto con 2.5 y 5.0 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,V1:d.

Se han descrito dos métodos para separar la membrana externa de la citoplasmática en bacterias gram-negativas. En el primero, las bacterias son transformadas en esferoplastos mediante el empleo de EDTA lisozima; posteriormente se lisan para formar vesículas membranales (96,106) las cuales a su vez, pueden ser separadas por gradientes de densidad (63), técnicas electroforéticas y agregación a pH 5 y ultracentrifugación (88). Las desventajas de este método se deben sobre todo a la dificultad de formar esferoplastos; al uso de EDTA, que ocasiona la reorganización de las moléculas de LPS y al tiempo prolongado que se requiere para su obtención. Sin embargo, su mayor ventaja reside en la certeza de tener la membrana externa libre de membrana citoplasmática.

En el otro método, se aísla la membrana externa unida a la peptidoglicana; para esto, primero las bacterias se rompen en una prensa francesa y posteriormente la membrana citoplasmática se elimina, solubilizándola con Tritón X-100 al 2% en presencia de iones magnesio. En el complejo insoluble de membrana externa-peptidoglicana, hay una tercera parte del contenido total de fosfolípidos, la mitad del LPS y todas las proteínas (121). Para este trabajo se obtuvo primero el complejo membrana externa-peptidoglicana, y a partir de él, se solubilizaron las PME con Tritón X-100 al 2% en presencia de EDTA (122). Una modificación hecha al método original, fué la ruptura de las bacterias por sonicación. Dunn y cols, no encontraron diferencias en preparaciones de PME *Campylobacter*, obtenidas cuando las bacterias se destruían por sonicación o prensa francesa (24).

Las PME aisladas de las cepas de *S. typhi* 9,12,V1:d y *S. typhi* Ty2, en geles de poli(acrilamida)-SDS, tienen pesos

moleculares de 14 Kd a 70 Kd, destacando la presencia de 6 a 8 proteínas principales de 17 Kd a 41 Kd. Con el objeto de analizar si esas bandas proteicas contenian solo una proteína, las PME de *S. typhi* 9,12,V1:d se sometieron a electroforesis en dos dimensiones, técnica que en base al punto isoeléctrico y peso molecular es capaz de resolver de 5000 a 10 000 diferentes proteínas presentes en una muestra (106,107). Los resultados de la segunda dimensión mostraron que al igual que para *Chlamydia* (13), *Neisseria* (60) y *Campylobacter* (24), las proteínas principales de *S. typhi* contienen solamente una forma isomérica.

El patrón electroforético de PME *S. typhi* es semejante al descrito por Kamio y Nikaido (67) para *S. typhimurium*, quienes empleando un método semejante de extracción al de este trabajo, identificaron de 8 a 10 proteínas principales con pesos moleculares de 12 Kd a 48 Kd. Para *S. typhimurium* en la región de 36 Kd a 41 Kd se han identificado cuatro proteínas principales, tres de ellas denominadas OmpF, OmpC y OmpD que pertenecen al grupo de porinas y una cuarta denominada OmpA o proteína modificable por el calor. En las preparaciones de PME de *S. typhi* estudiadas, se encontraron proteínas principales con peso molecular y pI semejantes al de las porinas de *S. typhimurium* (68,102). 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 (22,23,50,103). 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% (97,143). 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 (97).

El análisis de las unidades monoméricas de porinas de *E. coli* por espectrometría en la región de infrarrojo y dicroísmo circular, muestra que tienen una estructura secundaria en forma de hoja β -plegada antiparalela, sin que se observen segmentos en α -hélice (118). Considerando la estructura secundaria de las porinas se ha propuesto que deben cruzar varias veces la membrana externa para poder anclarse en ella (figura 9); de acuerdo a este modelo de proteína transmembranal, las secuencias de aminoácidos expuestas al medio ambiente deberán ser los receptores para fagos y colicinas (104), 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.

Estudios recientes, hechos por Jap, (61) han propuesto que las porinas son poros individuales que se asocian en trimeros, formando una unidad funcional de tres poros. Esto se fundamenta en estudios de cristalografía electrónica de la porina *phoE* de *E. coli* (figura 10).

Se ha estudiado la respuesta inmune-humoral del hombre hacia algunos antígenos de superficie de la bacteria y se han encontrado anticuerpos en el suero de pacientes con fiebre tifoidea dirigidos contra los antígenos O, H y Vi. Los títulos altos de estos anti-

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

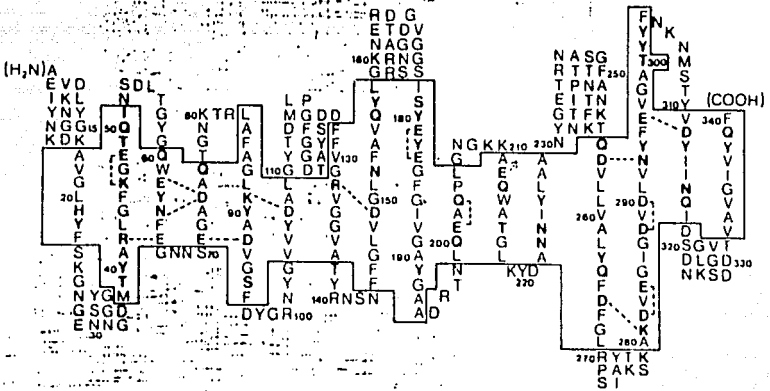


Figura 9. Estructura secundaria de porinas ompF de *E. coli* B. La porina presenta estructura de hoja β -plegada anti-paralela. Cada hoja β -plegada se inserta en la membrana externa con por lo menos seis aminoácidos (aminoácidos enmarcados) (118).

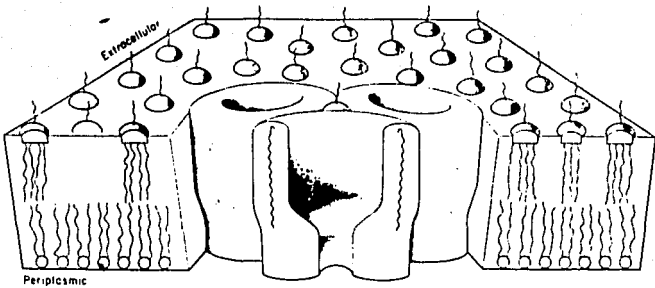


Figura 10. Modelo estructural del trimero de la porina phoE de *E. coli* en base a estudios de cristalografía electrónica con una resolución de 18 Å. Tomado de 61.

cuerpos no tienen relación con el estado de protección ni con la evolución de la enfermedad. Ante estos resultados, se ha continuado la búsqueda de antígenos específicos que estén involucrados en los mecanismos de protección (24,55).

Por el método de inmunoelectrotransferencia, el cual permite identificar y caracterizar por peso molecular el número de proteínas reconocidas por los anticuerpos específicos (132), Ortiz y cols. (107) demostraron que las PME de *S. typhi* son buenos inmunógenos en los pacientes con fiebre tifoidea. La respuesta humoral hacia las porinas de *S. typhi* pudiera estar relacionada con algunos de los mecanismos de protección debido a que en los inicios de la enfermedad solo hay anticuerpos dirigidos contra una proteína de 28 Kd; mientras que en la fase de convalecencia aparecen anticuerpos dirigidos contra las porinas.

La activación de complemento por los anticuerpos anti-porinas probablemente represente uno de los mecanismos efectores del sistema inmune en la fiebre tifoidea, debido a que la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo sobre la superficie de la bacteria, de manera que el complejo C5-C9 (MAC) puede insertarse en la membrana y ejercer su efecto lítico; esto no ocurre con los anticuerpos dirigidos contra el antígeno somático O, pues la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en las unidades de repetición oligosacáridicas O, lejos de la superficie bacteriana (111). Lo anterior podría explicar la falta de correlación entre títulos altos de anticuerpos anti-O y un estado de inmunidad protectora (64,65).

La importancia de la presencia de anticuerpos específicos contra de PME también se ha sugerido en infecciones causadas por

Pseudomonas aeruginosa (32), *Campylobacter jejuni* (7), *Chlamydia trachomatis* (14). Sin embargo, en las infecciones intracelulares se espera que la respuesta inmune celular sea la más importante en el control de la enfermedad.

El principal problema para el estudio de la fiebre tifoidea es que *S. typhi* es patógena solo en humanos y chimpancés (35) y dado que resulta costoso y poco práctico el trabajo con primates fue necesario emplear un modelo murino para analizar la participación de las porinas de *S. typhi* en la inducción de protección contra la fiebre tifoidea. Concentraciones de 2.5 µg a 30 µg de PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d (libres de antígeno flagelar "H" y con 0.041% LPS), confirieron protección del 100% a ratones NIH del reto hasta con 500 DL₅₀ de *S. typhi*; este efecto de protección se debió a las porinas, ya que en experiencias anteriores (58) en las que se emplean PME, como inmunógenos, el LPS presente en la preparación no juega ningún papel en la inducción de protección ya que la inmunización con 1.2 µg de LPS (concentración contenida en 30 µg de PME) no se observa protección a la dosis máxima de reto empleadas, lo que significa que para el control de la enfermedad, se requiere de una estimulación específica del sistema inmune.

Es importante eliminar de las porinas y PME el contaminante de LPS ya que se ha demostrado *in vitro* que él es capaz de inhibir la inmunidad específica al estimular a los macrófagos en tal magnitud, que evita la producción de fragmentos antigénicos necesarios para la estimulación específica de linfocitos T (17,83).

El ligero efecto de protección cruzada observado en el reto

con *S. typhimurium*, indica que en nuestro modelo experimental de fiebre tifoidea, probablemente el alto grado de protección, al reto homólogo, esté dado por epítopes de las porinas especie-específicos. Esto sugiere la importancia que pueden tener los determinantes antigénicos compartidos, en el desarrollo de la inmunidad.

Aún cuando la funcionalidad de los anticuerpos monoclonales anti-porinas se evaluó *in vitro* mediante ensayos de bacteriolisis mediada por complemento, éstos no indujeron un alto grado de protección pasiva; en contraste con la protección activa conferida por las porinas. De esta manera podemos inferir, que para obtener una respuesta efectiva de protección pasiva es mejor el uso de anticuerpos policlonales (58,59,111). Por otro lado, es posible que los anticuerpos anti-*S. typhi* puedan generar una protección contra inóculos pequeños. Sin embargo, para tener una protección contra inóculos mayores, o para controlar la infección misma, cuando la bacteria se encuentra en su fase intracelular, es de esperarse que solamente la inmunidad celular, es decir la intervención de macrófagos y linfocitos T-específicos, puede proveer una adecuada protección, como en el caso de los experimentos de protección activa.

Los experimentos de proliferación celular *in vitro* nos han demostrado, preliminarmente, que las porinas son moléculas capaces de estimular esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con el complejo de PME (44). Esto podría indicar que, probablemente, son las porinas, las PME inductoras de uno de los mecanismos de protección en el modelo murino.

La protección conferida por las porinas de *S. typhi* pro-

bablemente se deba a la inducción de una respuesta inmune-celular específica, ya que ésta es la de mayor importancia en el control de las infecciones intracelulares (18,49). Un modelo para explicar este mecanismo sería el siguiente: la liberación de INF γ e IL-2 por linfocitos Th1 (100) antígeno-específicos, activaría macrófagos capaces de destruir bacterias, así como clones antígeno específicos de linfocitos Ly2+ que ejercerían actividad citotóxica sobre macrófagos infectados con *S. typhi*, de manera semejante a lo que sucede en el modelo murino infectado por *Listeria monocytogenes* (69) (figura 11).

Por otro lado, la presencia de anticuerpos anti-porinas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y animales inmunizados con PME, sugiere que hay activación de linfocitos Th2, con la subsecuente producción de linfocinas (IL-4, IL-5 e IL-6) necesarias para la proliferación y diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas (71) (figura 11).

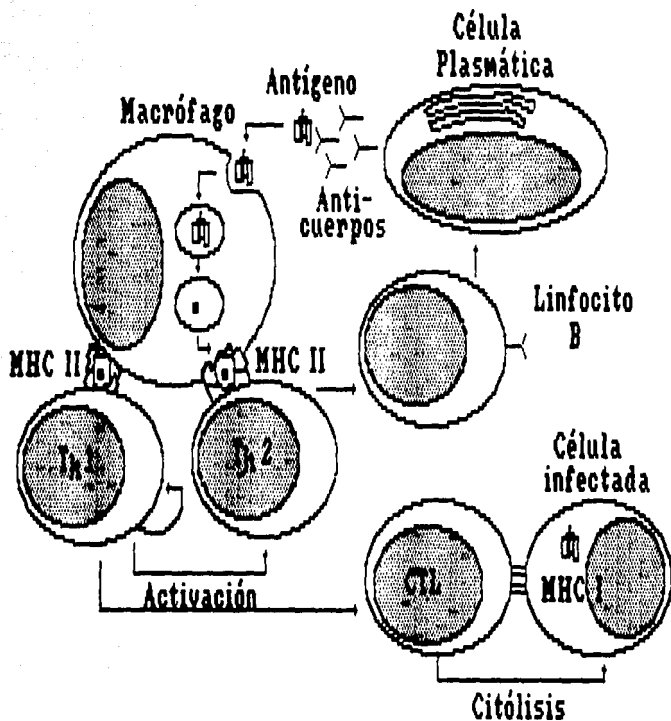


Figura 11. Modelo de estimulación del sistema inmune murino por porinas de *S. typhi* 9,12,V1d. Modificado de (69 y 71).

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. y 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. Adamus, G., Mulczka, M., Witkowska, D. y Romanowska, E. 1980. Protection against Keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. Infect. Immun. 30:321-324.
3. Anderson, E.S. 1968. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio Series in Immunobiological Standardization. 15:79-86.
4. Bell, G.I. 1984. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. Biophys J. 45:1051-1064.
5. Berke, G. 1989. Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and Natural Killer cells. En: Fundamental Immunology, second edition, Paul, W.E. edit. New York, U.S.A. pg. 7375-764.
6. Blake, M.S. y Gotschlin, E.C. 1983. Gonococcal membrane proteins: speculation on their role in pathogenesis. Prog. Allergy 33:298-313.
7. Blaser, M.J.; Hopkins, J.A. y Vasil, M.L. 1984. *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins are antigenic for humans. Infect. Immun. 43:986-993.
8. Bona, C. y Moran, T. 1975. Idiotype vaccines. Ann.Int.Pasteur, immunologie. 136-C:299-312.
9. Bragg, P.D. y Hov, 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. y 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.
12. Buchanan, T.M.; Pearce, W.A.; Schoolnick, G.K. y Arko, R.J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pill. J.Infect.Dis. 136(supl):132-137.
13. Butterger, B.E.; Newhall, W.J. y Jones, R.B. 1985. Differences in outer membrane proteins of the lymphogranuloma venereum and *Trachoma biovars* of *Chlamydia trachomatis*. Infect.Immun. 50:485-494.
14. Caldwell, H.D. y Perry, L.P. 1982. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to major outer membrane proteins. Infect.Immun. 38:745-754.
15. Chai, T. y Fould, J. 1974. Demonstration of missing outer membrane protein in tolG mutante in *Escherichia coli*. J.Mol.Biol. 85:465-474.
16. Chesnut, R.W., Colon, S.M. y Grey, H.M. 1982. Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I.

- Functional comparasion of B cell tumor and macrophages. J. Immunol. 129:2382-2388.
17. Cluff,C.W. y Ziegler,K.A. 1987. An early response to lipopoly-saccharide is the elicitation of macrophages specialized for antigen degradation with negative regulatory effects on the induction of specific immune responses. Infect.Immun. 55:1346-1354.
 18. Collins,F.M. 1979. Cellular antimicrobial Immunity. Critical Reviews in Microbiology. CRC 27-91.
 19. Cvjetanovic,B. y Vemun,K. 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull WHO. 32:29-36.
 20. Datta,D.B.; Arden,B.D. y Henning,U. 1977. Mayor protein of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J.Bacteriol. 128:821-829.
 21. Di Rienzo,J.M.; Nakamura,K. y Inouye,M. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. Annu.Rev.Biochem. 47:481-532.
 22. Douglas,J.T.; Roseberg,E.Y.; Nikaïdo,H.; Verstrete,D.R. y Winter,A.J. 1984. Porins of *Brucella* species. Infect.Immun. 44:15-21.
 23. Douglas,J.T.; Lee,M.D. y Nikaïdo,H. 1981. Protein I of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane is a porin. FEMS Microbial.Lett. 12:305-309.
 24. Dunn,B.C.; Blaser,M.J. y Smyder,E. 1987. Two-dimensional gel electrophoresis and immunobloting of *Champylobacter* outer membrane proteins. Infect.Immun. 55:1564-1572.
 25. Einsen,H.N. y SisKind,G.W. 1969. Variations in affinities of antibodies during the immune response. Biochemistry 3:996-1008.
 26. Einsenstein,T.K. 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect.Immun. 12:364-377.
 27. Engvall,E. y Perlmann,P. 1971. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Immunochem. 8:874-879.
 28. Felix,A. y Pitt,R.M. 1934. A new antigen of *B. typhosus*: its relation to virulence and to active and passive immunisation. Lancet 2:186-191.
 29. Felix,A.; Krikorian,K.S. y Reitler,R. 1935. The ocurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J.Hyg. 35:421-427.
 30. Felix, A. y Pitt, R.M. 1951. The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. J. Hyg. 49:92-110.
 31. Ferluga, J. y Allison, A.C. 1974. Observations on the mechanism by which T lymphocytes exert cytotoxic effects. Nature 250:673-675.
 32. Fernández,P.B.; Kim,C.; Cundy,K.R. y Huang,N.N. 1981. Antibodies to cell envelope proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. Infect.Immun. 33:527-532.
 33. Frasch,C.E. y 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.
 34. French,D.; Fischberg,E.; Buhl,S. y Scharff,M.D. 1986. The pro-

- duction of more useful monoclonal antibodies. I. Modifications of the basic technology. *Immunol. Today* 7:344-346.
35. Gaines, S.A.; Sprinz, A. y Tully, J. 1966. 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.
 36. Galfré, G. y Milstein, C. 1981. Preparations of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Methods in Enzymol.* 73:3-95.
 37. Germanier, R. y 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.* 141:553-558.
 38. Germanier, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. *Bol. of Sanit. Panam.* 82:300-311.
 39. Germanier, R. 1984. Typhoid fever. En *Bacterial Vaccines*. Germanier R. (Ed.) Academic Press. pp. 137-165.
 40. Germanier, R. 1986. The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results. *Sciavo International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity*. Siena, Italy. pp. 10-12.
 41. Gilleland, H.E., Parker, M.G., Matthews, J.W. y Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* 44:49-54.
 42. Golstein, P., Svedmyr, E.A.J. y Wigzell, H. 1971. Cell mediating specific *in vitro* cytotoxicity. I. Detection of receptor-bearing lymphocytes. *J. Exp. Med.* 134:1385-1402.
 43. Golstein, P. 1987. Cytolytic T cell melodrama. *Nature* 327:12.
 44. González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Blanco, F., Moreno, J. y Kumate, J. 1989. Cell-mediated immune response to porins from *S. typhi* in mice. 7th International Congress of Immunology. Berlin, RFA.
 45. Gregory, R.L. 1986. Microbial Ribosomal Vaccines. *Rev. Inf. Dis.* 6:208-217.
 46. Groscurth, P., Giao, B.Y., Podack, E.R. y Hengartner, H. 1987. Cellular localization of perforin 1 in murin cloned cytotoxic lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 138: 2749-2752.
 47. Grusby, M.J., Nabavi, N., Wong, H., Dick, R.F., Bluestone, J.A., Schotz, M.C. y Glimcher, L.H. 1990. Cloning of an Interleukin-4 inducible gene from cytotoxic T lymphocytes and its identification as a lipase. *Cell* 60:451-459.
 48. Guling, P.A., McCracken, G.H., Frich, C.F., Johnston, K.H. y Hansen, E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect. Immun.* 37:82-86.
 49. Hahn, H. y Kaufmann, S.H.E. 1981. The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Inf. Dis.* 3:1221-1251.
 50. Hancock, R.E.W., Decad, O.M. y Nikaido, H. 1979. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI. *Biochim. Biophys. Acta.* 559:323-331.
 51. Hejfec, L.B. et al. 1966. A controlled field trial and labora-

- tory study of five typhoid vaccines in the USSR. Bull WHO. 30:321-339.
52. Hiernave, J.R. 1968. Idiotypic vaccines and infectious diseases. Infect. Immun. 56:1407-1413.
 53. Hornick, R.B.; Dupont, H.L.; Dawkins, A.T.; Snyder, M.J. y Woodward, T.E. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Symposia Series in Immunobiological Standardization. 15:143-150.
 54. Hornick, R.B.; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; DuPont, H.L.; Dawkins, A.T. y Snyder, M.J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. N.Engl.J.Med. 283:686-691.
 55. Hornick, R.B.; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; DuPont, H.L.; Dawkins, A.T. y Snyder, M.J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. N.Engl.J.Med. 283:739-746.
 56. Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. E. y S. Livingston, L.T.D., London. pp. 4-9.
 57. Inouye, M. y Yee, H.L. 1973. Homogeneity of envelope proteins of *Escherichia coli* separated by gel electrophoresis. J.Bacteriol. 113:304-312.
 58. 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 proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. Infect. Immun. 56:2953-2959.
 59. Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C. y Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever: Monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. En: Cell function and disease. Cañedo, Todd and Jaz (Eds.). Plenum Press, New York.
 60. Jackson, P.M.; Thornley, M.J. y Thompson, R.J. 1984. A study of high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of relationships between *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. J.Gen.Microbiol. 130:3189-3201.
 61. Jap, B.K. 1989. Molecular design of *phoE* porin and its functional consequences. J.Mol.Biol. 205:407-419.
 62. Johnson, W. 1972. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 5:947-952.
 63. Johnson, K.H. y Gotschlich, E.C. 1979. Isolation and characterization of the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. J.Bacteriol. 119:250-257.
 64. Joiner, K.A.; Hamner, C.A.; Brown, E.S.; Cole, R.J. y Frank, M.M. 1982. Studies on the mechanisms of bacterial resistance to complement-mediated killing. I. Terminal complement components are deposited and released from *Salmonella minnesota* S218 without bacterial death. J.Exp.Med. 155:797-802.
 65. Joiner, K.A.; Brown, E.J. y Frank, M.M. 1984. Complement and bacterial: Chemistry and biology in host defense. Ann.Rev.Immunol. 2:461-491.
 66. Jones, G.W., Richardson, L.A. y Uhlman, D. 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. J.Gen.Microbiol. 127:351-360.
 67. Kamio, Y. y Nikaido, H. 1977. Outer membrane of *Salmonella*

- typhimurium* identification of proteins exposed on cell surface. *Biochem.Biophys.Acta.* 464:589-601.
68. Karkhanis, Y.D.; Zeltner, J.Y.; Jackson, J.J. y 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.
 69. 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.
 70. Kaufmann, S.H.E., Munk, M.E., Koga, T., Steinhoff, U., Wand-Württenberger, A., Gatrill, A.J., Flesch, I. y Schoel, B. 1989. Effector T cells in bacterial infections. En: *Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7th International Congress of Immunology.* Melchers, F. et al eds. Springer-Verlag, RFA pg. 963-970.
 71. Kishimoto, T. 1985. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Ann.Rev.Immunol.* 3:133-157.
 72. Klugman, K.P., Koornhof, H.J., Gilbertson, I.T., Robbins, J.B., Schneerson, R., Schulz, D., Cadoz, M., Armand, J. y the Vaccination Advisory Committee. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 11:1165-1169.
 73. Köhler, G. y Milstein, C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-497.
 74. Kumate, J. 1979. Inmunidad, inmunización y vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp. 227-247.
 75. Kumate, J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: *Manual de Infectología.* Kumate, J. y Gutiérrez, G. (Eds.) Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. págs. 45-55.
 76. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H.; Valtonen, M. y Makela, P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. *Infect.Immun.* 25:857-862.
 77. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H. y Makela, P.H. 1982. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. *Infect.Immun.* 34:326-332.
 78. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
 79. Lanzavecchia, A. 1985. Antigen-specific interaction between B and T cells. *Nature* 314:537-539.
 80. Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T., Berman, P. y Abrignani, S. 1988. T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature* 334:530-532.
 81. Levine, M.M.; DuPont, H.L.; Hornick, R.B.; Snyder, M.S.; Woodward, W.; Gilman, H.R. y Libonatti, J.P. 1976. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. *J.Infect.Dis.* 133:424-429.
 82. Levine, M.M., Ferreccio, C., Black, R.E., Tacket, C.O., Germanier, R. y the Chilean Typhoid Committee. 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.*

- 11:S552-S567.
83. Leyva-Cobian, F. y Unanue, E.R. 1988. Intracellular interference with antigen presentation. *J.Immunol.* 141:1445-1450.
 84. Liew, F.Y. 1985. New aspect of vaccine development. *Clin.Exp.Immunol.* 62:225-241.
 85. Littlefield, J.V. 1964. Selection of hybrids from making of fibroblast *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* 193:265-275.
 86. Liu, S.L., Ezaki, T., Miura, H., Matsui, K. y Yabuuchi, E. 1988. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect. Immun.* 56:1967-1973.
 87. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
 88. Lugtenberg, B. y Van Alphen, L. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochem.Biophys.Acta.* 737:51-115.
 89. Mäkelä, P.H., Hovi, M., Saxén, H., Valtonen, M. y Valtonen, V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. *Immunol. Lett.* 19:217-222.
 90. Mates, A. y Yosipovici, H. 1976. Localization of the protective antigens in *Salmonella typhimurium*. *Microbiol.* 16:81-90.
 91. Milstein, C.; Clark, H.R.; Galfre, G. y Cuellar, A.C. 1980. Monoclonal antibodies from hybrid myelomas, p 17-33. *En: Immunology.* M.Fourgerau (ed.). Academic Press. New York.
 92. Misfeldt, M.L. y Johnson, W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 17:98-104.
 93. Misfeldt, M.L. y Johnson, W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 24:808-816.
 94. Mitchison, N.A. 1989. Is genes in the mouse. En: *Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7th International Congress of Immunology.* Melchers, F. et al eds. Springer-Verlag, RFA pg. 845-852.
 95. Miura, T. y 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.
 96. Miura, T. y 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.
 97. Mizuno, T.; Choo, M.Y. y 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.
 98. Molinari, J.L. y Cabrera, R. 1974. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. *Rev.Lat. Amer.Microbiol.* 16:199-204.
 99. Molinari, J.L. y Larralde, C. 1974. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. *Rev.Lat.Amer.Microbiol.* 16:189-197.

100. Mosmann, T.R. y Hoffman, R.L. 1987. Two types of mouse helper T-cell clone implications for immunoregulation. *Immunol. Today*. 8:223-227.
101. Mosmann, T.R., Chervinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. y Coffman, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2346-2357.
102. Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* 97:85-100.
103. Nikaido, H. y Vaara, M. 1985. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
104. Moyami, T.; Mizuno, T. y 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.
105. O'Brien, A.D. 1986. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 124:37-~~---~~
106. O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
107. Ortiz, V.; Isibasi, A.; Garcia-Ortigoza, E. y Kumate, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with Typhoid Fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1640-1645.
108. Osborn, M.J.; Grander, J.F.; Paris, E. y Corgan, J. 1972. Mechanism and assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* 247:3962-3972.
109. Osborn, M.J.; Gander, J.E.; Paris, E. y 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.
110. Osborn, M.J. y Wu, H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:369-422.
111. Paniagua, J.; Isibasi, A.; Pelayo, R.; Ortiz, V.; Muiy, H.; González, C.; García, J.A.; Islas, S. y Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12, Vid. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20: (En prensa).
112. Pasternack, M.S., Verret, C.R., Liu, M.A. y Eisen, H.N. 1986. Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* 322: 74C-743.
113. Pelayo, R.; Isibasi, A.; Paniagua, J.; Ortiz, V.; Muiy, H.; González, C.; Islas, S. y Kumate, J. 1989. Elaboración de un inmunoadsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vid. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20: (En prensa).
114. Peters, P.J., Geuze, H.J., van der Donk, H.A. y Borst, J. 1990. A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Today* 11:28-32.
115. Polish Typhoid Committee. 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in

- Poland. Bull WHO. 32:15-27.
116. Reed, L.J. y Muench, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Am.J.Hyg. 27:493-497.
 117. Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J.Infect.Dis. 117:101-107.
 118. Rosenbusch, J.P. 1987. Tree-dimensional structure of membrane proteins. En: Bacterial outer membranes as model systems. Inouye, M. (Ed.). John Wiley and Sons. pp. 141-162. U.S.A.
 119. Schmitges, C.J. y Henning, U. 1976. The major proteins the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. Heterogeneity of protein I. Eur.J.Biochem. 63:47-52.
 120. Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by polyacrilamida electrophoresis. J.Bacteriol. 104:882-889.
 121. Schnaitman, C.A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. J.Bacteriol. 108:545-552.
 122. 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.
 123. Schnaitman, C.A. 1974. Outer membrane proteins of *Escherichia coli* O III outer membrane consist of four distinct polypeptide species. J.Bacteriol. 118:442-453.
 124. Schweizer, M. y Henning, U. 1977. Action of major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. J.Bacteriol. 129:1651-1652.
 125. Schwartz, R.H. 1987. Immune response (I_r) genes of the murine major histocompatibility complex. Adv. Immunol. 38:31-199.
 126. Shimizu, A., Kinashi, T., Ishida, Y. y Honjo, T. Structure and function of lymphokines and their receptors. En: Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7th International Congress of Immunology. Melchers, F. et al eds. Springer-Verlag, RFA pg. 601-610.
 127. Smith, R.A. y Blegly, N.J. 1972. Ribonucleic acid protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. Infect.Immun. 6:373-383.
 128. Spaun, J. 1964. Studies on the influence of the immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. Bull WHO. 31:793-798.
 129. Steward, M.W. y Howard, C.R. 1987. Synthetic peptides: a next generation of vaccines?. Immunol.Today. 8:51-58.
 130. Szu, S.C., Stone, A.L., Robbins, J.D., Schneerson, R. y Robbins, J.B. 1987. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. J. Exp. Med. 166:1510-1521.
 131. Szu, S.C., Li, X., Schneerson, R., Vickers, J.H., Bryla, D. y Robbins, J.B. 1989. Comparative immunogenicities of Vi polysaccharide-protein conjugates composed of cholera toxin or its B subunit as a carrier bound to high-or lower-molecular-weight Vi. Infect. Immun. 57:3823-3827.
 132. Towbin, H.T.; Staehlin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

- Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76:4350-4354.
133. Trenn, G., Takayama, H. y Sitkovsy, M.V. 1987. Antigen-receptor regulated exocytosis of cytolytic granules may not be required for target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 330:72-74.
 134. Tully, J.G.; Gaines, S. y 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.
 135. 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. *Bull WHO.* 30:631-634.
 136. Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2:395-428.
 137. Venneman, M.R.; Brigley, N.J. y Berry, L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 1:574-582.
 138. Wahdan, M.H.; Serie, C.; Cerisier, Y.; Sallam, S. y Germanier, R. 1982. Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a a oral vaccine against typhoid: Three years results. *J.Infect.Dis.* 145:292-296.
 139. Weiss, A. 1989. T Lymphocyte activation. En: *Fundamental Immunology*, second edition, Paul, W.E. edit. New York, U.S.A. pg. 359-384.
 140. Wood, R. y Lee, T. 1983. High-Performance Liquid Chromatography of fatty acid: Quantitative analysis of saturated, monoenoic, polyenoic and geometrical isomers. *J. Chromatogr.* 25:237-246.
 141. Yabuuchi, E., Ikedo, M. y Ezaki, T. 1986. Invasiveness of *Salmonella typhi* strains in HeLa S3 monolayer cells. *Microbiol. Immunol.* 30:1213-1224.
 142. Youmans, A.S. y Youmans, G.P. 1965. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Bacteriol.* 99:42-50.
 143. Yu, F. 1987. DNA y aminoacid sequences of outer membrane proteins and lipoproteins. En: *bacterial outer membrane as model systems*. Inouye, M. (Ed.). John Wiley and Sons. pp. 419-432. U.S.A.
 144. 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.
 145. Zagury, D., Bernard, J., Thierness, N., Feldman, M. y Berke, G. 1975. Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T lymphocytes. Conjugation, killing and recycling at the single cell level. *Eur. J. Immunol.* 5:818-822.
 146. Zanatti, M.; Sercarz, E. y Salk, J. 1987. The immunology of new generation vaccines. *Immunol.Today.* 8:18-25.