

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA
EXTERNA DE *Salmonella typhi* CAPACES DE
INDUCIR INMUNIDAD CELULAR EN UN
MODELO MURINO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
SILVIA GABRIELA MARTINEZ SOREQUE

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.

INDICE

	PAG	
Abreviaturas	1.	
CAPITULO I	INTRODUCCION	1.
1.1 Planteamiento del problema	2.	
1.2 Hipótesis	3.	
1.3 Objetivos	3.	
CAPITULO II	INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	
2.1 Antecedentes	5.	
2.2 Fundamentos de la respuesta inmunológica	16.	
2.3 Salmonelosis murina	20.	
CAPITULO III	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Diseño del experimento	23.	
3.2 Diagrama de flujo	24.	
3.3 Material, Reactivos y Equipo	25.	
3.3.1 Material	25.	
3.3.1.1 Biológico	25.	
3.3.1.2 De laboratorio	25.	
3.3.2 Reactivos	25.	
3.3.3 Equipo	26.	
3.4 Metodología	28.	

3.4.1	Tratamiento del PNC después de la transferencia	28.
3.4.2	Esquema de inmunización	28.
3.4.3	Obtención de esplenocitos	28.
3.4.4	Tratamiento del bazo ..	28.
3.4.5	Ensayo de proliferación de esplenocitos	29.
3.5	Resultados	30.
3.5.1	Obtención de PME	30.
3.5.2	Caracterización de PME	30.
3.5.3	Obtención de porinas ..	30.
3.5.4	Tratamiento del PNC en el cual se transfirieron PME de <i>S.typhi</i>	30.
3.5.5	Activación de esplenocitos de ratón NIH con Con A	31.
3.5.6	Activación de esplenocitos con porinas solubles de <i>S.typhi</i>	31.
3.5.7	Activación de esplenocitos con PME de <i>S.typhi</i> en medio sólido	32.

	3.5.8	Activación de esplenocitos con PME transferidas	32.
	3.5.9	Activación de esplenocitos con péptidos de porinas separados por SDS-PAGE y transferidos a papel de nitrocelulosa	33.
Capítulo IV	DISCUSION	42.
Capítulo V	RESUMEN	46.
Capítulo VI	CONCLUSIONES	47.
	BIBLIOGRAFIA	48.
	APENDICE	55.
	8.1	Material	55.
	8.1.1	Material básico de laboratorio	55.
	8.1.2	Material Biológico	55.
	8.1.2.1	Obtención de PME y porinas	55.
	8.1.3	Reactivos	55.

6.1.4	Soluciones y medios de cultivo	57.
8.2	Preparación de medios y soluciones .	
8.2.1	Medio mínimo de sales "A"	58.
8.2.2	Solución de lavado ...	58.
8.2.3	Soluciones amortiguadoras para el aislamiento de las PME	59
8.2.4	Soluciones para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry	59.
8.2.5	Soluciones para electro- foresis en acrilamida ..	60.
8.2.6	Soluciones para la electrotransferencia ..	62.
8.3	Metodología	62.
8.3.1	Métodos bacteriológicos	62.
8.3.1.1	Cultivo de bacterias	62.
8.3.2	Métodos Bioquímicos ...	63.
8.3.2.1	Aislamiento de PME	63.
8.3.2.2	Purificación de porinas por exclusión molecular	64.
8.3.2.3	Digestión de porinas	64.

8.3.3	Análíticos	65.
8.3.3.1	Determinación de proteínas		65.
8.3.3.2	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilo sulfato de sodio (SDS-PAGE)		65.
8.3.3.3	Inmunolectro- transferencia	66.

ABREVIATURAS:

HTdr	Timidina tritilada.
APS	Persulfato de amonio
BHI	Infusión cerebro-corazón.
C.P.M.	Cuentas por minuto.
Con A	Concanavalina A.
CPA.	Célula presentadora de antígeno.
DL50	Dosis letal al 50%.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl) 1-piperazín-etano-sulfónico.
IL.	Interleucina.
LB.	Linfocito B.
LPS	Lipopolisacárido.
LT.	Linfocito T.
LTC.	Linfocito T citotóxico.
Mφ	Macrófago o monocito.
NIH	Cepa abierta de ratones.
NK.	Célula asesina natural (Natural Killer).
PBS	Regulador de fosfatos salinos.
pho E	PME inducible a concentraciones bajas de fosfatos.
PME	Proteínas de membrana externa.
PNC	Papel de nitrocelulosa.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
SDS.	Dodecilsulfato de sodio.

SFB	Suero Fetal Bovino.
TCR.	Receptor del linfocito T.
TENED	N,N,N',N'-tetrametililén diamino.
T_h.	Linfocito T cooperador o inductor.
Tris	Hidroximetil-aminometano.

CAPITULO I

INTRODUCCION.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa, causada por la ingestión e invasión de *S. typhi* 9,12,Vi:d, que es un bacilo no esporulado, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tribu Salmonella, Gram negativo, móvil, mide dos a tres μ m, citofílico anaerobio facultativo, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos. De acuerdo a la clasificación de Kauffman-Whitte, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D, el cual también se integra por otras especies con las cuales comparte los antígenos somáticos 9 y 12, se diferencia de ellas porque es la única que presenta el antígeno "Vi". La fórmula 9,12,Vi:d caracteriza a *Salmonella typhi* de forma abreviada (10).

Es un hecho, de que a pesar de que los intentos para obtener una vacuna contra la fiebre tifoidea se remontan a principios de siglo, ninguna de las hasta hoy ensayadas ofrecen una protección efectiva y duradera exenta de reacciones adversas e indeseables.

Para contar con un producto biológico capaz de conferir inmunidad eficiente, será necesario entender mejor los mecanismos de relación huésped-parásito. Se sabe que los títulos altos de anticuerpos contra los antígenos O y H no correlacionan con el grado de severidad del padecimiento, es posible que los procesos más importantes en el control de la enfermedad pertenezcan a la rama efectora celular del sistema inmune.

Como el ser humano es el único huésped de *Salmonella typhi*, no es posible reproducir la enfermedad en animales. Sin

embargo, la infección de ratones por *Salmonella typhimurium* produce en ellos un padecimiento de patogenia similar a la fiebre tifoidea en humanos.

En el laboratorio de Inmunoquímica de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S. y en el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Higiene se tiene una línea de investigación sobre el papel que desempeñan las proteínas de membrana externa (PME), particularmente las porinas, en la inducción de inmunidad protectora. Entre otros estudios, en un modelo murino la administración intraperitoneal de dos dosis de PME de *S. typhi* confirió defensa efectiva a un reto de hasta 1000 veces la DL₅₀, un suero hiperinmune de conejo protegió contra 100 DL₅₀ y además, anticuerpos monoclonales dirigidos contra porinas confieren protección parcial (22,52).

Sin embargo, la respuesta inmunológica de la rama efectora celular ha sido poco estudiada. En el laboratorio se ha logrado activación de esplenocitos *in vitro*, provenientes de ratones inmunizados con *S. typhimurium*, PME o porinas.

El interés de este trabajo está dirigido a la obtención de porinas de *Salmonella typhi* puras y en cantidad suficiente para activar poblaciones de linfocitos. Además, se pretende determinar en cual de los péptidos de porinas se localiza el epítipo inmunodominante.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En las activaciones celulares realizadas anteriormente las PME tienen una contaminación del 4% con LPS (52). Se desarrollo este trabajo para determinar si las PME libres de LPS son

capaces de activar linfocitos inmunes en un modelo *in vitro*, así como también para corroborar si son las porinas las proteínas de membrana externa que mejor activan dichas poblaciones celulares; y si lo son, cuál es el epítipo inmunodominante de las porinas.

1.2 HIPOTESIS

Dado el carácter intracelular de la infección por *Salmonella* y la falta de correlación de la respuesta humoral con el desarrollo de protección, la presencia de linfocitos T específicos debe ser primordial para el control del proceso infeccioso.

Ya que las proteínas de membrana externa se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria, pueden ser reconocidas por el sistema inmune generando una respuesta de la rama efectora celular. Puesto que las porinas son las proteínas más abundantes en la membrana externa de la bacteria, funcionarán como antígenos inmunodominantes. Este fenómeno puede ser puesto en evidencia en un modelo de activación *in vitro* de linfocitos, utilizando como antígeno PME separadas electroforéticamente y transferidas a papel de nitrocelulosa.

1.3 OBJETIVOS.

A. GENERAL. Evaluar la capacidad de proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi*, según su peso molecular, para activar subpoblaciones de linfocitos *in vitro* en un modelo murino.

B. PARTICULARES. Obtener proteínas de membrana externa de *S. typhi* 9,12,Vi:d con el máximo grado de pureza posible.

Obtener los patrones electroforéticos de proteínas de membrana externa de *S. typhi*.

Purificar fracciones proteicas de PME mediante separación por electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia a papel de nitrocelulosa.

Utilizar suspensiones de papel de nitrocelulosa conteniendo PME para activar linfocitos inmunes en un modelo *in vitro*.

A partir de péptidos de porinas identificar los determinantes antigénicos responsables de la inducción de la respuesta inmune celular.

CAPITULO II

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA.

2.1 ANTECEDENTES.

Las primeras descripciones de la fiebre tifoidea se le atribuyen a Thomas Willis en 1659; él describió los diferentes signos y síntomas de la enfermedad así como su duración y severidad. A pesar de esto, durante años, el padecimiento se confundió con el tifo y no fue sino hasta 1782 cuando Ruxham describió ambas enfermedades febriles como entidades clínicas diferentes: la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo) (20,61).

Gerhard, en 1837, estableció las diferencias que había entre el tifo y la fiebre tifoidea; Jenner en 1850, en su libro titulado "Sobre la identidad y la no identidad de las fiebres tifoídica y tifosa", estableció que las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos eran específicas de la fiebre tifoidea (61).

William Budd, en 1856 determinó que la enfermedad es transmitida a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas con materia fecal proveniente de individuos enfermos (20).

Eberth, en 1880, describió la presencia del bacilo tifoídico en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de pacientes con fiebre tifoidea; Pfeiffer, en 1885, realizó el primer aislamiento del bacilo a partir de heces (13). En el mismo año, Pfeiffer y Kille demostraron que el suero de pacientes convalescentes protegía a los cobayos contra dosis letales de bacilo tifoídico 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 (61).

La primera inmunización experimental con una suspensión de *Salmonella typhi* fue realizada con éxito en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y, posteriormente, ésto se logró en ratones por Bauner y Pfeiffer (1887), empleándose en los dos casos microorganismos vivos. Después Kikovich empleó bacilos muertos con el mismo propósito, estimulando a Wright en Inglaterra y simultáneamente a Pfeiffer y Kille en Alemania a utilizar, por primera vez (1897), vacunas inactivadas para la inmunización de humanos. Por ejemplo, la de Pfeiffer y Kille, era una vacuna fenolada inactivada por calor a 56°C (57). Estas vacunas fueron utilizadas en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica y generaron una disminución significativa en la morbilidad, así como una atenuación de los síntomas en los individuos inmunizados que adquirieron la enfermedad (58). En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas manufacturadas a base de bacterias vivas atenuadas y administradas por vía oral. El efecto de las mismas fue estudiado en el ejército francés y, desafortunadamente, hubieron decesos que lamentar entre los individuos vacunados (27).

Las vacunas tifoideas elaboradas con bacterias muertas siguieron utilizándose durante décadas sin demostrarse su efecto protector real, ya que se carecía de modelos animales que probaran su eficacia y, además, no se acertaba a relacionar el supuesto efecto protector con algún indicador serológico. Esto,

de hecho, no se logró sino hasta 1955 (27,56). A partir de esta fecha y bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética; en estos lugares se investigó la eficacia de vacunas preparadas con células enteras de *Salmonella typhi* inactivadas con acetona, calor y fenol o con alcohol. De los resultados obtenidos en estas investigaciones, se concluyó que la vacuna inactivada con acetona, designada con la letra K, resultó ser la mejor, ya que la protección conferida no sólo fue de mayor grado, sino también de mayor duración. La vacuna inactivada con calor y fenol, designada con la letra L, manifestó menor eficacia que la K y la inactivada con alcohol evidenció ser la menos efectiva. Se observó que la protección inducida por una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable; sin embargo, el empleo de dos dosis proporcionaba una inmunidad más confiable y de mayor duración (24). Los estudios realizados por Hornick y cols. en voluntarios humanos (1968), usando las vacunas K y L, demostraron que la protección conferida por éstas estaba en función de la dosis a la que el individuo inmunizado estuviera expuesto (12). El hecho de que las vacunas parenterales eran tóxicas y protegían en forma efectiva solo ante inóculos menores o iguales a 10^5 bacterias, motivó la búsqueda de nuevas fórmulas. Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran con bacterias vivas. Una de ellas se prepara con una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomycina y otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (designada por

Germanier como Ty 21a) (16,16,56). La efectividad de ambas vacunas fue valorada en voluntarios humanos, encontrándose resultados contradictorios en cuanto a la protección conferida por la cepa dependiente de estreptomycin (32). En contraste, la vacuna de Germanier protegió al 87% de los individuos inmunizados cuando la dosis de desafío fue de 10^7 bacterias (Digo) (17). Los estudios realizados en Alejandría, Egipto, indicaron que esta última fue capaz de inducir protección en el 95% de la población estudiada. Sin embargo, esta misma, aplicada en Chile (1983) a una población infantil a razón de tres dosis administradas en cápsulas de capa entérica con intervalos de 2 ó 21 días entre cada dosis, sólo indujo una protección del 51 y 67%, respectivamente (16,17).

En las experiencias anteriores destaca el hecho de que se desconoce la naturaleza de los antígenos de *Salmonella typhi* relacionados directamente con la protección y, más aún, la respuesta inmune del humano a dichos antígenos. Han sido numerosas las investigaciones encaminadas a realizar la identificación de los antígenos responsables de la inmunidad protectora en la fiebre tifoidea; la mayoría de ellas se han dirigido hacia el estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático "O" (endotoxina y/o lipopolisacárido), el flagelar "H" y el capsular "VI". Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O" jugaba un papel muy importante en la protección por lo que se elaboró una vacuna a base del oligosacárido de repetición del lipopolisacárido (LP6); no obstante la protección obtenida con esta vacuna fue escasa y de corta

duración (24,27,28).

Por lo que respecta al antígeno flagelar "H", se ha demostrado que tampoco está relacionado directamente con la inmunidad protectora. Tully y cols. (1962) observaron que al inmunizar chimpancés con una cepa rugosa de *S. typhi*, se inducía la producción de anticuerpos contra el antígeno "H", empero, éstos no conferían protección, aún en títulos elevados (75). Anderson, en 1968, encontró que los ratones inmunizados con una mutante de *S. typhi* sin flagelos obtenían el mismo grado de protección que los inmunizados con cepas móviles (3).

Se ha tratado de relacionar al antígeno "Vi" con los mecanismos de protección. Los primeros estudios datan de 1934; Felix y Pitt informaron de la presencia tanto de dicho antígeno en cepas de *S. typhi* aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, como la de sus anticuerpos homólogos en el suero de estas personas (13). Robbins y Robbins, desarrollaron una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir del antígeno Vi (60). Esta vacuna ha sido evaluada en estudios de campo en Nepal (73) y Africa del Sur (26). Los reportes preliminares de los dos estudios muestran una eficacia de 72 y 64%, respectivamente. Una desventaja de esta vacuna es que como el polisacárido es un antígeno timo-independiente, no genera respuesta inmune celular ni se desarrollan efectivamente células de memoria para inmunizaciones o retos posteriores (26).

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. Estos resultados condujeron a aislar estas fracciones de diferentes bacterias e investigar su capacidad protectora. Actualmente se estudia la inducción de protección que confieren los antígenos ribosomales de otros microorganismos tales como *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* (36,76). En 1970, Venneman y cols. demostraron que, en el ratón, las fracciones ribosomales de *Salmonella typhimurium* generaban protección contra la bacteria virulenta (77). Resultados similares fueron obtenidos por Molinari y Larralde (45). En trabajos posteriores, Molinari y Cabrera demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhi* también inducían protección en ratones (44).

Con el fin de encontrar a los antígenos responsables de la protección inducida por estas fracciones ribosomales se han venido realizando varios estudios, con resultados muy diversos. En los primeros trabajos al respecto, Venneman y cols. acreditaron al ARN ribosomal como el antígeno protector (77). Johnson presentó evidencias de que eran las proteínas ribosomales las que protegían a los ratones (23). Smith y Biglye sugirieron que ambos antígenos, el ARN y las proteínas, se requerían para obtener una buena protección (68); sin embargo, en trabajos efectuados por Eisenstein, Misfeld y Johnson, se demostró que las fracciones ribosomales de *Salmonella* se encontraban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular (12,39). Más aún, en trabajos posteriores, Misfeld y Johnson demostraron que las proteínas de la envoltura celular de *Salmonella typhimu-*

rium protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria, en un grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales (40). Estos experimentos ponen en duda la efectividad de las fracciones ribosomales y apoyan lo que sugiere Mates y Yosipovisi, en el sentido de que realmente los antígenos protectores de *Salmonella* se localizan en la superficie bacteriana (36).

En los últimos años, las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas han cobrado gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el establecimiento del papel que desempeñan en la relación huésped-parásito. Su importancia 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. En su investigación, dichas estructuras fueron lisadas por choque osmótico y posteriormente su membrana externa se separó de la citoplasmática en un gradiente de sacarosa (41). El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME (34). Por su parte, Schnaitman describió una metodología que evita la utilización de esferoplastos consistente en llevar a cabo la destrucción de las bacterias en una prensa francesa, antes de conseguir la sedimentación de la envoltura celular y, posteriormente, la solubilización de la membrana citoplasmática con un detergente no iónico.

La identificación de las PME se efectuó por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida. Schnaitman fue el primero en reportar que *Escherichia coli* contenía una proteína principal, la cual constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana (62,69); poco después, él y otros investigadores (65,4), demostraron por electroforesis que en realidad no era una sino cuatro.

Schmitges y Henning describieron una proteína principal que se podía separar, electroforéticamente, en dos bandas. En la actualidad se sabe que el número de las PME varía dependiendo de la información genética de la bacteria y que su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo, temperatura, etc.

Las PME que más se han estudiado, son las de *E. coli* y *S. typhimurium*. Di Rienzo, Nakamura e Inouye (1978) y Osborn y Wu (1980), hicieron una revisión extensa de ellas y las clasificaron en proteínas principales y menores (11,54).

De las proteínas principales se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo se expresan 5 de ellas con más de 100 000 copias por célula. Dentro de las proteínas principales se cuentan:

- 1) Las proteínas matrices o porinas, que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana.

- 2) La proteína modificable por calor, involucrada con los procesos de conjugación y que actúa como receptor de fagos y colicinas.

3) La lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la péptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

En la figura 1, se muestra la disposición de los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas y en la figura 2 el arreglo de las proteínas de la membrana externa.

Con respecto a las proteínas menores, se ha demostrado que estas intervienen como acarreadores en el transporte activo de moléculas y que están relacionadas con la replicación celular. Entre las menores se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad enzimática (fosfolipasa A) (11,54).

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevaron a investigar su eficacia como inmunógenos protectores; Frascch y cols. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos: los anticuerpos anti-PME de la bacteria presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento (14). Buchanan y Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger a chimpancés contra la uretritis gonocócica se encontraba presente en la membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* (5) y posteriormente, comprobaron que los anticuerpos dirigidos contra las PME conferían protección específica a cobayos en que previamente se había inducido una infección gonocócica experimental (6).

Kussi y cols. detectaron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S. typhimurium* protegían al ratón contra una

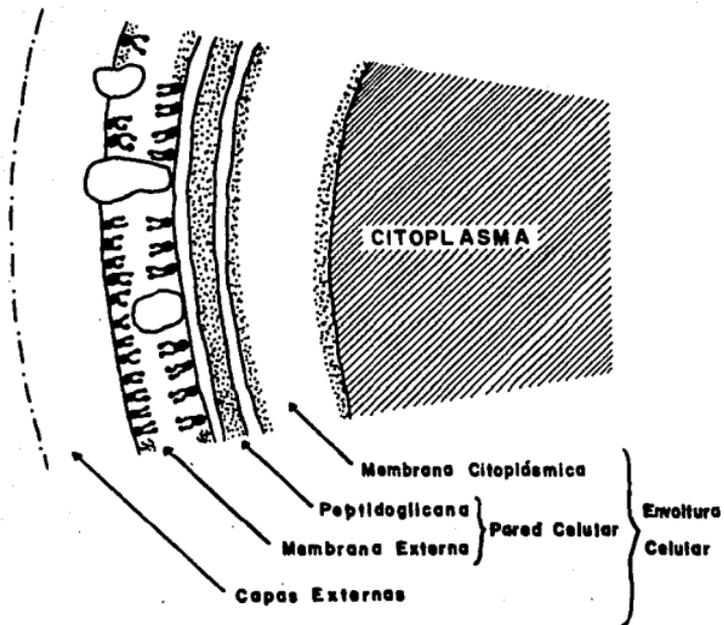


FIGURA I

ESQUEMA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS (41).

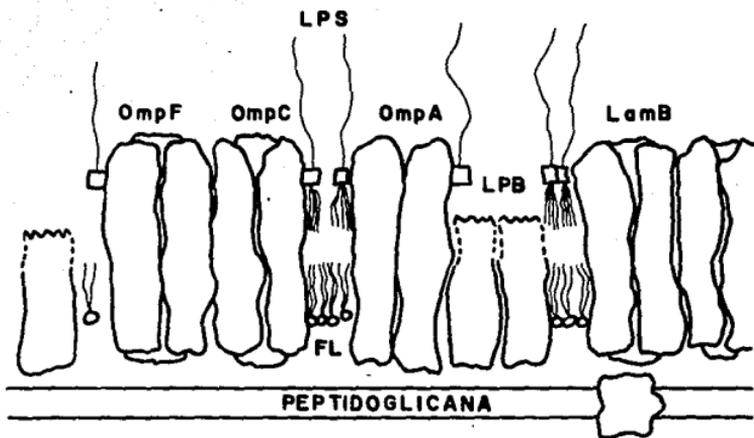


FIGURA 2

ORGANIZACION MOLECULAR DE LAS PROTEINAS MAYORES EN LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

LPS: Lipopolisacárido; FL: Fosfolípidos; OmpF, OmpC, LamB: Proteínas matrices o porinas; OmpA: Proteína modifiable por el calor; LPB: Lipoproteína de Braun (7).

cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (29,30).

Isibasi y cols. (22,52) demostraron que la inmunización activa y pasiva con PME de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, protegían al ratón hasta 500 veces la dosis letal media (DL₅₀). En este modelo, las porinas y la OmpA fueron las PME que jugaron el papel más importante en la protección; sin embargo, cómo estas proteínas estaban contaminadas con 4% de endotoxina cubría 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 consiste en separar las PME por SDS-PAGE y transferir las proteínas a papel de nitrocelulosa y de esta manera emplearlas como antígenos en cultivos celulares *in vitro*.

2.2 FUNDAMENTOS DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA.

La respuesta inmunológica se inicia con la fagocitosis del antígeno por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos, y otras células presentadoras de antígeno (CPA), digieren las fracciones proteicas a péptidos (79,8) y los 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 (35), es indispensable, pues los linfocitos T inductores, responsables de dirigir la respuesta inmunológica, son incapaces de distinguir al antígeno nativo.

Los linfocitos T inductores o cooperadores (T_H)(CD4⁺) reconocen el antígeno unido a moléculas de histocompatibilidad de clase II (II-2 I-A e I-E en el ratón y HLA DR, DQ y DP en el humano).

La activación de estas células no sólo 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 CPA.

Una vez activados los T_H proliferan y producen diversas linfocinas que conducen la fase efectora de la respuesta inmunológica (59). En el ratón se han demostrado dos subpoblaciones de linfocitos cooperadores, de acuerdo a su capacidad de producción de diferentes interleucinas (IL) los T_{H1} se relacionan con la hipersensibilidad de tipo retardado, ya que elaboran principalmente interleucina 2, interferón gamma y linfoxina; en cambio los T_{H2} , producen fundamentalmente interleucinas 4, 5 y 6, las cuales son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B (46).

Aún cuando los linfocitos B (LB) 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.

Algunos de los mediadores solubles mejor estudiados son los siguientes: La IL-2 que es un factor de crecimiento de linfocitos T (69), promueve el crecimiento de clones específicas contra el antígeno, tiene función de factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos T citotóxicos (LTC) y en la expansión de células asesinas naturales (NK) (53). El interferón gamma que tiene efecto antiviral (66), induce la activación de macrófagos (67) y promueve la expresión de diversos genes (59); de manera notable, los del sistema principal de histocompatibilidad (72).

La IL-3 es uno de los varios factores estimulantes de colonias que regulan la hematopoyesis (42). La IL-4 induce la producción de IgG y de IgE, aumenta la expresión de moléculas de clase II. La IL-5 induce la proliferación de los linfocitos B y la secreción de IgM, la IL-6 interviene en la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas y la IL-7 induce la proliferación de timocitos y linfocitos B inmaduros (51).

La fase efectora de la respuesta inmunológica puede dividirse en dos ramas: la humoral, depende las actividades biológicas de los anticuerpos y el complemento, y la celular que involucra los fenómenos de hipersensibilidad retardada.

Los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) participan en la fase efectora celular. A diferencia de los linfocitos T inductores, reconocen antígenos en el contexto de moléculas de clase I de histocompatibilidad (H2K_D en el ratón y HLA B, C y A en el humano). Los LTC al activarse secretan linfocinas, como la interleucina 2 y el interferón gamma, aunque en menor proporción que los T_H. Los LTC no proliferan *in vitro* en presencia de

antígenos solubles pero se activan y expanden frente a aloantígenos, en ausencia de linfocitos cooperadores (43). Tienen la propiedad de lisis células infectadas por virus y células tumorales (47); además, se les ha descrito función supresora, la cual es difícil de interpretar a la luz de los conocimientos actuales (37).

Otros mecanismos efectores no específicos, pero de gran importancia, dependen de los macrófagos; la eliminación de agentes infecciosos mediante la fagocitosis, cuyo mecanismo bactericida fundamental es la producción intracelular de peróxido de hidrógeno (76), y depende de la activación que los macrófagos presentan debido al efecto de algunas sustancias endógenas como el interferón gamma y otras exógenas como los muramildipéptidos y lipopolisacáridos (LPS). Además, el macrófago libera al medio productos biológicamente activos como la interleucina 1, que es mediador de algunos efectos de la endotoxina, el interferón alfa que presenta actividad antiviral, el factor de necrosis tumoral de propiedades similares a la linfoxina y algunos componentes del complemento.

Puede observarse que, el sistema inmunológico está constituido por una gran variedad de estirpes celulares articuladas en una intrincada red de interacciones que permiten finalmente, el reconocimiento de lo propio y de lo ajeno; asegurando la cohesión funcional interna del organismo y el equilibrio con el medio ambiente. La comunicación entre todos los elementos que conforman el concierto inmunológico se establece a través de la liberación de mediadores solubles y del contacto íntimo celular,

donde las moléculas de adhesión son primordiales.

La especificidad de las interacciones celulares, tanto en la respuesta inmunológica como en las histogénesis y embriogénesis esta mediada por las moléculas de adhesión.

Estas interacciones pueden suceder entre células; o bien, entre células y matrices extracelulares. Las moléculas que enlazan al citoesqueleto con medio extracelular se conocen como integrinas, las cuales son glicoproteínas constituidas por heterodímeros de subunidades $\alpha\beta$. Las glicoproteínas que expresan la subunidad $\beta 2$ intervienen en los mecanismos de adhesión inter-leucocitaria (21).

2.3 SALMONELOSIS MURINA

La salmonelosis murina es causada por *S. typhimurium* y constituye el mejor modelo experimental para el estudio de la fiebre tifoidea pues tiene una patogenia semejante (19). La infección se inicia por vía oral, después las bacterias colonizan el intestino delgado sin causar síntomas aparentes. Ellas penetran la submucosa atravesando el tejido epitelial o a través de las células M de las placas de Peyer. Desde ahí viajan por vía linfática a la corriente sanguínea y entonces son fagocitadas por macrófagos del bazo e hígado. Estas células son el sitio de multiplicación de la Salmonela en los siguientes días, la multiplicación de la bacteria es intracelular, protegiéndose así de anticuerpos y muchos antibióticos (34). El porcentaje de multiplicación depende de las características de la bacteria y

del huésped.

El daño de la infección depende de que tan rápido la bacteria se multiplica en el bazo e hígado, si alcanza valores críticos (10^8 bacterias/órgano), la infección entonces empieza a ser severa, con incontrolable bacteremia, toxemia y rápida muerte. Sin embargo, si la dosis del inóculo es pequeña el porcentaje de multiplicación de la bacteria es menor, así que la cantidad de 10^8 bacterias no será alcanzada dentro de 7 a 10 días, desarrollándose entonces inmunidad, el número de bacterias en el organismo disminuye y el animal se recupera (34).

Dentro de las características que el huésped presenta a la infección por *Salmonella typhimurium* existe la influencia de un gen de susceptibilidad, denominado *lty^S* codificado en el cromosoma 1, el alelo que confiere resistencia se denomina *lty^R*, el cual determina una mayor habilidad de los macrófagos de los ratones resistentes para eliminar la *Salmonella* intracelularmente. Se ha demostrado que los linfocitos T no juegan un papel importante en la actividad de este gen.

El gen de respuesta a lipopolisacárido (*Lps^d*) confiere susceptibilidad a la diseminación inicial y a la progresión del proceso infeccioso de manera similar a lo que ocurre en presencia de *lty^S* (9).

La inmunidad celular es primordial en el control de la infección por *Salmonella typhimurium*. Se ha demostrado que el grado de hipersensibilidad tardía contra antígenos proteicos o polisacarídicos está en relación directa con el nivel de protección (30,70). La transferencia pasiva de linfocitos

específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium* confiere resistencia a ratones no inmunizados (55), la protección es efectiva aún empleando antígenos irrelevantes siempre que se incluya un refuerzo de inmunización contra el antígeno al tiempo de retar con la bacteria (15); también es posible transferir inmunidad pasiva mediante sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con Concanavalina-A.

Por tanto, es posible que la activación de macrófagos sea el evento más importante para la eliminación de las bacteria fagocitadas y el control de la infección, y en fases más tardías, el control de la producción de anticuerpos y el desarrollo de la inmunidad celular. Así, en ratones con inmunodeficiencia asociada con cromosoma X (tipo humoral) y en los ratones desnudos (tipo celular) se presenta una enfermedad letal en fase tardía. Estudios recientes sugieren un factor más de resistencia natural que opera a nivel de células similares a las asesinas naturales (NK) (71).

Como resultado de uno o más factores de susceptibilidad o resistencia, la enfermedad progresa con inóculos bacterianos de diferente magnitud. Las cepas ity⁵ (BALB/c, C57Bl/6) enferman con 10 bacterias, en tanto que las cepas resistentes (CBA, A/J) requieren de un inóculo de 10,000 bacterias (50,71).

CAPITULO III

3.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

En base a los métodos propuestos por Schnaitman y Nikaido se obtuvieron PME y porinas, respectivamente. Una vez obtenidas ambas proteínas, su concentración se determinó por el método de Lowry, se caracterizaron electroforéticamente y fueron empleadas como antígenos tanto las porinas solubles, como las PME separadas por electroforesis y transferidas a papel de nitrocelulosa; en estimulaciones de esplenocitos provenientes de ratones NIH que habían sido previamente inoculados con PME de *S. typhi* y ratones no inmunes.

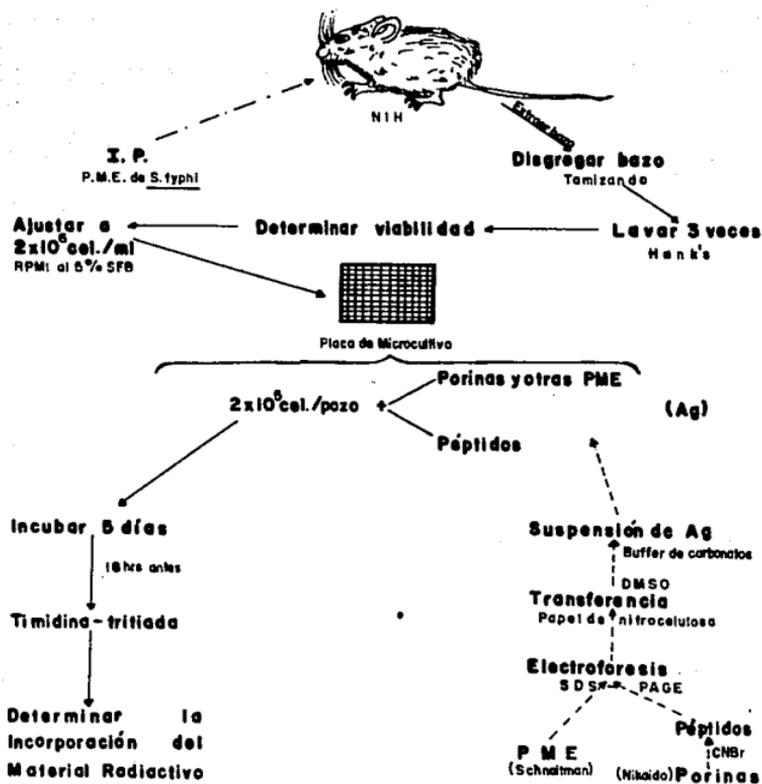
Una vez demostrado que las porinas son las PME de *S. typhi* que mejor activan los esplenocitos, se procedió a la ruptura de dichas proteínas con CNBr; los péptidos obtenidos de esta manera, fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a papel de nitrocelulosa, de esta forma se probaron en cultivos celulares, con el objeto de determinar en cuál de ellos se localizaba el epítipo inmunodominante.

A continuación se presenta en forma esquemática el diagrama de flujo para la activación de esplenocitos con PME en medio sólido y por el otro lado con péptidos de porinas de *S. typhi* 9,12,VI:d.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo.

Activación de esplenocitos



3.3 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.3.1 MATERIAL:

3.3.1.1 Biológico.

- Ratonés NIH de 17-18 g donados por el Instituto Nacional de Higiene.

- Cepa de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d, aislada de un paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea.

3.3.1.2 Material de laboratorio

Para mayor claridad en el texto ver Apéndice 8.1.1.

3.3.2 REACTIVOS:

- Azul tripano (Sigma).
- Ácido tricloroacético (Baker).
- Cloruro de amonio (Baker).
- Concanavalina A (Sigma).
- Dimetil sulfoxido (Sigma).
- Gentamicina (Ciba Geigy).
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma).
- β -mercaptoetanol (Sigma).
- Penicilina (Lakeside).
- Rojo de Ponceau (Sigma).
- Solución Hank's (Sigma).
- Suero fetal bovino (Sigma).
- Timidina tritiada (Amersham Chemicals).

3.3.2.1 Preparación de medios de cultivo y soluciones empleados en el reconocimiento de porinas *in vitro* por células de ratones inmunizados con PME DE *S. typhi*.

A. 1) Cultivo celular

- a) Medio de cultivo RPMI 1640 complementado con: L-Glutamina 2mM, Penicilina 200u/ml, Gentamicina 10ug/ml, β -Mercaptoetanol 5×10^{-5} M y SFB al 10%.
- b) Cloruro de amonio 0.16M (90ml) y Tris-HCl 0.17M pH 7.65 (10ml).
- c) Timidina Tritelada (3 HTdr) 1 μ Cl/pozo.
- d) Concanavalina A Tipo IV 10 μ g/ml.
- e) Azul tripano al 0.2% en solución salina isotónica.
- f) Porinas y PME de *S. typhi*.

A. 2) Tratamiento del papel de nitrocelulosa (2).

- a) Solución de lavado: PBS Tween-20 0.1%
- b) Amortiguador de carbonatos: Carbonato de sodio y bicarbonato de sodio pH 9.5
- c) Dimetil sulfoxido concentrado
- d) Rojo de Ponceau. 500 mg en 100 ml de ácido tricloroscético al 7.5% P/V.

3.3.3 EQUIPO:

- 1. Centrífuga Sorvall RC5C. Instrument Dupon.
- 2. Espectrofotómetro Beckman DU-7.
- 3. Sonicator Lab-Line.

4. Ultracentrifuga Beckman L8-60.
5. Sistema de electroforesis vertical LKB.
6. Estufa de cultivo celular. Forma Scientific 3157.
7. Cosechador semiautomático Mini-Mash II.
8. Contador Beckman LS 5601.
9. Incubador rotatorio, New Brunswick Scientific Co.
10. Campana de flujo laminar.
11. Potenciómetro Corning Modelo 12.
12. Transpor para electrotransferencia, LKB instruments.
13. Microscopio Optico MicroStar, American Optical.
14. Autoclave.
15. Vortex, Fisher brand Modelo 12-812.

3.4 METODOLOGIA.

3.4.1 Tratamiento del papel de nitrocelulosa después de la transferencia.

Una vez que se localizaron y recortaron las bandas proteicas, lavar vigorosamente para eliminar todo el colorante, recortar en trozos muy finos cada banda por separado y colocar en tubos de cultivo estériles los fragmentos de papel, en seguida adicionar a cada uno, 1 ml. de dimetilsulfóxido e incubar 1.30 hrs. Después resuspender el papel adicionando muy lentamente amortiguador de carbonatos pH 9.5 estéril, hacer tres lavados con Hank's y guardar a 4°C hasta emplearlos.

3.4.2 Esquema de inmunización.

Inmunizar lotes de 3 ratones por vía intraperitoneal los días 0 y 7 con 30µg de PME de *Salmonella typhi* en Hank's. Inocular también tres ratones control con Hank's.

3.4.3 Obtención de esplenocitos.

En condiciones de esterilidad desnucar los ratones inmunes y control el día 14 después de la primera inmunización; en seguida cortar y jalar la piel del abdomen, flamear el instrumental, cortar el músculo, extraer el bazo de cada animal y colocarlos por separado en 5 ml de Hank's.

3.4.4 Tratamiento del bazo.

Disgregar cada bazo tamizando y adicionar 5 ml de Hank's. Colocar en tubo cónico de 15 ml y centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos. Después lavar dos veces con Hank's eliminando en cada ocasión el sobrenadante y resuspender las células. Una vez lavadas las células adicionar 1 ml de cloruro de amonio

0.16 M, frotar entre las manos los tubos suavemente durante 5 minutos y al cabo de ese tiempo adicionar 10 ml de Hank's.

Centrifugar nuevamente a 1200 rpm durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y adicionar 1 ml de RPMI al 10 % SFB para determinar viabilidad empleando azul tripano y diluir con RPMI al 10% SFB hasta tener una concentración de 2 millones de células/ml.

3.4.5 Ensayo de proliferación de esplenocitos.

Colocar 200 000 células por pozo en placas de 96 pozos de microcultivo en 200 μ l. Agregar concentraciones de porinas de 30 μ g/ml, o bien diluciones dobles de las suspensiones de papel de nitrocelulosa que contienen las diferentes bandas de PME. Cultivar las células 5 días a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Durante las últimas 18 horas de cultivo agregar a cada pozo 1 μ Cl de ³HTdr y al final de la incubación cosechar en un cosechador semiautomático. Determinar la incorporación de ³HTdr en un contador de centello líquido.

Como testigo positivo de estimulación emplear células provenientes de ratones inmunes y controles, a las que se adicionan 10 μ g/ml de Concanavalina A (Con A) por pozo.

Para evaluar la eficiencia de la suspensión del papel de nitrocelulosa en la activación de linfocitos inmunes, depositar 200 μ l de PME a 1 mg/ml de *S. typhi* en papeles de nitrocelulosa de 2 X 2 cm, tratados o no con rojo de Ponceau y depositarlos a diferentes diluciones en cultivos de linfocitos inmunes y testigos. Incluir pozos de células cultivadas con papel de nitrocelulosa sin proteína.

3.5 RESULTADOS.

A continuación se presentan los mejores resultados, tanto de obtención y caracterización de PME y porinas, como de la activación de esplenocitos con Con A, porinas, PME y péptidos en medio sólido.

3.5.1 OBTENCION DE PME.

La concentración de PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d obtenidas por el método de Schnitman fue:

Volumen de proteína obtenido: 88.0 ml

Concentración de proteína: 1.0 mg/ml

3.5.2 CARACTERIZACION DE PME.

El comportamiento electroforético en SDS-PAGE de las PME se muestra en la fotografía # 1. Las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares desde 14 Kd hasta 70 Kd. Se observó un grupo de proteínas con pesos moleculares entre 36 Kd y 41 Kd (éstas corresponden a las proteínas formadoras de canales o porinas) y también dos proteínas de 17 Kd y 28 Kd, respectivamente.

3.5.3 OBTENCION DE PORINAS.

La concentración de porinas de *S. typhi* obtenidas por el método de Nikaído fue de 800 µg/ml.

3.5.4 TRATAMIENTO DEL PAPEL DE NITROCELULOSA EN EL CUAL SE TRANSFIRIERON LAS PME DE *S. typhi*.

Una vez obtenidas las PME por el método antes descrito, se separaron por SDS-PAGE y enseguida se transfirieron desde el gel a papel de nitrocelulosa. Para comprobar el corrimiento electroforético se cortó una porción del gel y se tiñó con azul de Coomassie.

Para observar las bandas proteicas transferidas se tiñó el papel de nitrocelulosa con rojo de Ponceau y se lavó con PBS-Tween 20 al 0.1%. Se trató cada banda de papel como se describe en la metodología, cuidando que al resuspender con el amortiguador de carbonatos se mantuviera el tubo en agitación constante y la adición de dicho buffer fuera muy lenta, todo lo anterior con la finalidad de obtener una suspensión fina del papel con proteínas. El papel se lavó con RPMI 1640 y se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso.

3.5.5 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS DE RATON NIH CON CONCA-NAVALINA A.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones NIH que habían sido inmunizados intraperitonealmente (i.p) con 30 µg de PME de *S. typhi*; otros que eran control, solo se inocularon con Hank's. Se colocaron 200 mil células por pozo en una placa de microcultivo de fondo plano con 96 pozos en presencia de 10 y 20 µg/ml de Con A. El cultivo se mantuvo durante cinco días a 37°C y 5% de CO₂, 18 horas antes de finalizar el cultivo se adicionó por pozo 1µCi de ³Htdr. La incorporación de ³Htdr se determinó en un contador de centelleo líquido.

Los resultados obtenidos son los que se muestran en la gráfica # 1.

3.5.6 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS CON PORINAS DE *S. typhi* SOLUBLES.

Ratones NIH fueron inmunizados con 30 µg de PME de *S. typhi* y otros sólo con Hank's, ambos por vía intraperitoneal los días 0 y 7, sacrificándose el día 14. Se cultivaron 200 mil

celulas en placas de 96 pozos en presencia de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de porinas. El cultivo se interrumpió a los 5 días pero 18 horas antes se adicionó por pozo 1 μCi de $^3\text{Hdtr}$. La incorporación del material radiactivo se determinó en un contador de centelleo líquido. Como control de viabilidad se emplearon 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con A.

Los resultados están expresados en cuentas por minuto, se presenta la media de los triplicados en la gráfica # 2.

3.5.7 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS CON PME DE *S. typhi* EN MEDIO SOLIDO.

Ratones NIH fueron inmunizados con 30 μg de PME de *S. typhi* y los controles sólo con Hank's los días 0 y 7 por vía intraperitoneal (i.p), los ratones se sacrificaron el día 14. Se cultivaron 200 mil esplenocitos en placas de microcultivo de 96 pozos en presencia de suspensiones de papel de nitrocelulosa solo, papel de nitrocelulosa con PME y papel de nitrocelulosa con PME teñido con rojo de Ponceau y lavado con PBS-Tween 20 al 0.1%. Como control positivo de viabilidad se emplearon 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con A. El cultivo se interrumpió al igual que en las ocasiones anteriores a los 5 días y 18 horas antes se adicionaron por pozo 1 μCi de $^3\text{Hdtr}$ cuya incorporación se midió en un contador de centelleo líquido.

Los resultados están expresados en cuentas por minuto y se presenta la media de triplicados en las gráficas # 3 y 4.

3.5.8 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS CON PME DE *S. typhi* SEPARADAS POR SDS-PAGE Y TRANSFERIDAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

Se inmunizaron ratones de la cepa NIH de la manera descrita

en los experimentos anteriores. Se sacrificaron el día 14 y las células obtenidas se cultivaron en presencia de papel solo, papel de nitrocelulosa con las PME obtenidas de la separación electroforética y con porinas solubles de *S. typhi*, además también con Con A. El cultivo fue suspendido al quinto día y 18 horas antes de terminarlo se adicionó 1 μCi /pozo de $^3\text{Hdtr}$, la incorporación del material radiactivo se midió en un contador de centelleo líquido.

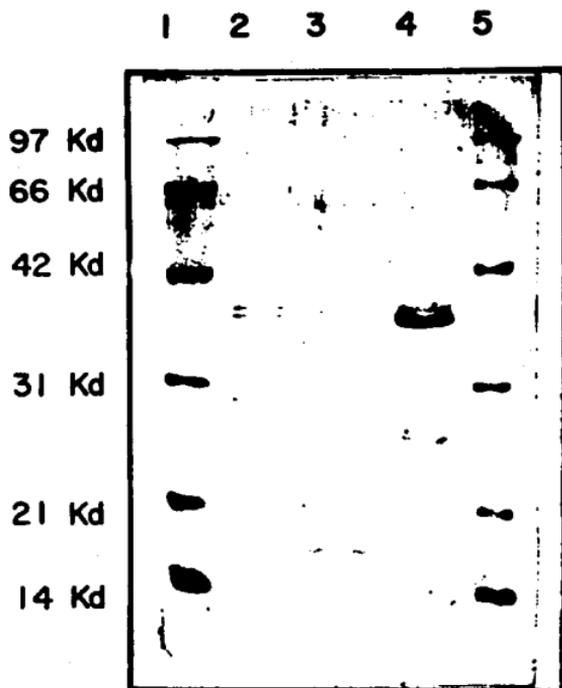
Los resultados están expresados en cuentas por minuto y se presenta a continuación la media de los triplicados; gráfica # 5.

3.5.9 ACTIVACION DE ESPLENOCITOS CON PEPTIDOS DE PORINAS SEPARADOS POR SDS-PAGE Y TRANSFERIDOS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

El esquema de inmunización es igual al descrito en los experimentos anteriores. Se sacrificaron el día 14 y los esplenocitos obtenidos se cultivaron en presencia de suspensiones de papel solo, papel de nitrocelulosa con los diferentes péptidos obtenidos de la separación electroforética, con porinas solubles de *S. typhi* y con Con A. El cultivo fue suspendido al quinto día y 18 horas antes, se colocaron 1 μCi /pozo de $^3\text{Hdtr}$, cuya incorporación fue determinada en un contador de centelleo líquido.

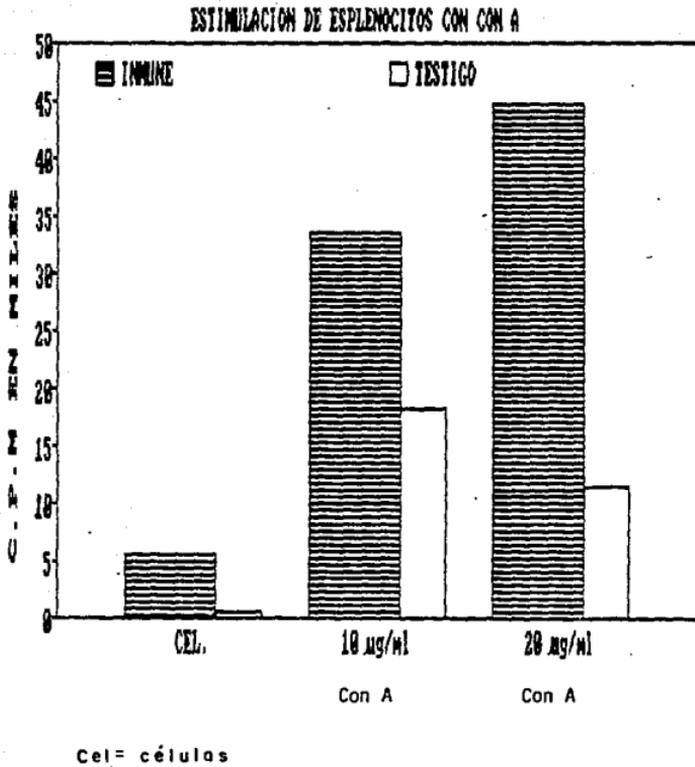
Los resultados de los experimentos realizados están expresados en cuentas por minuto, dando la media de los triplicados en las gráficas 6 y 7.

FOTOGRAFIA 1

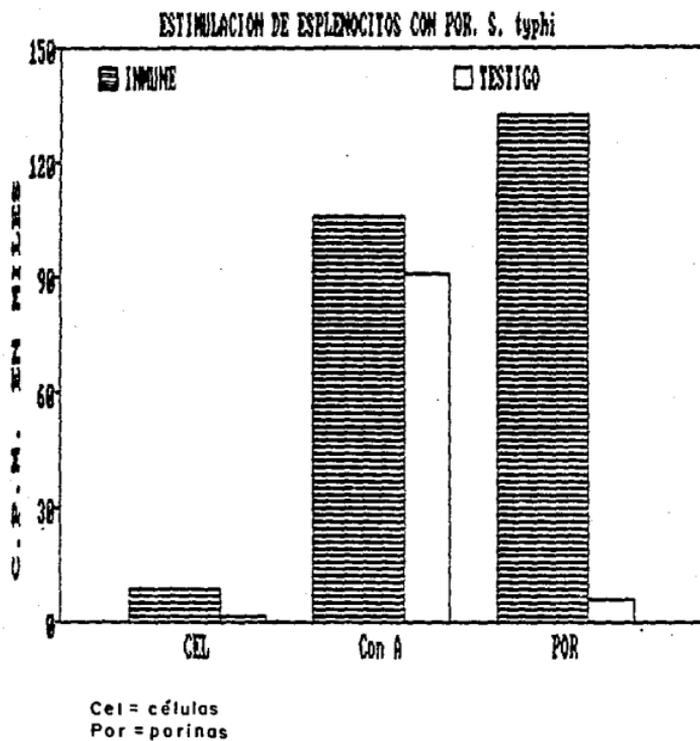


Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS-PAGE Tinción de coomassie
Carril 1 y 5 = Marcadores de peso molecular
Carril 2,3 y 4 = PME

GRAFICA 1

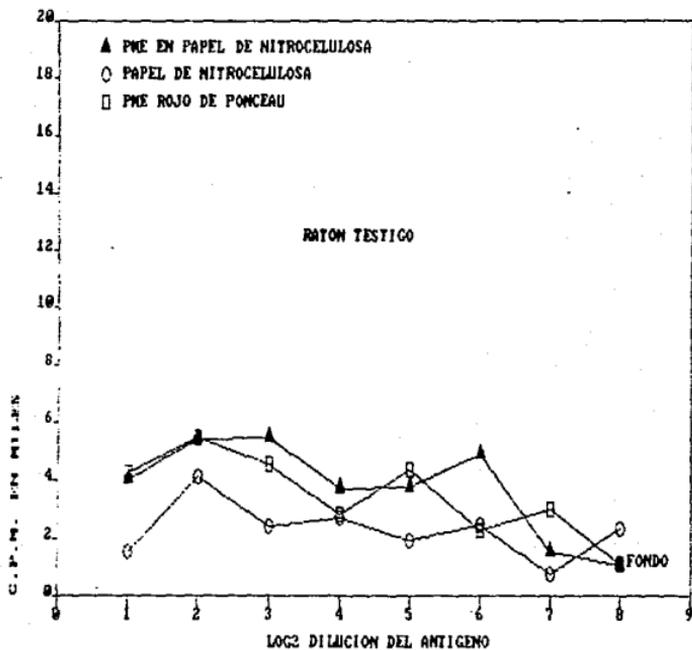


GRAFICA 2

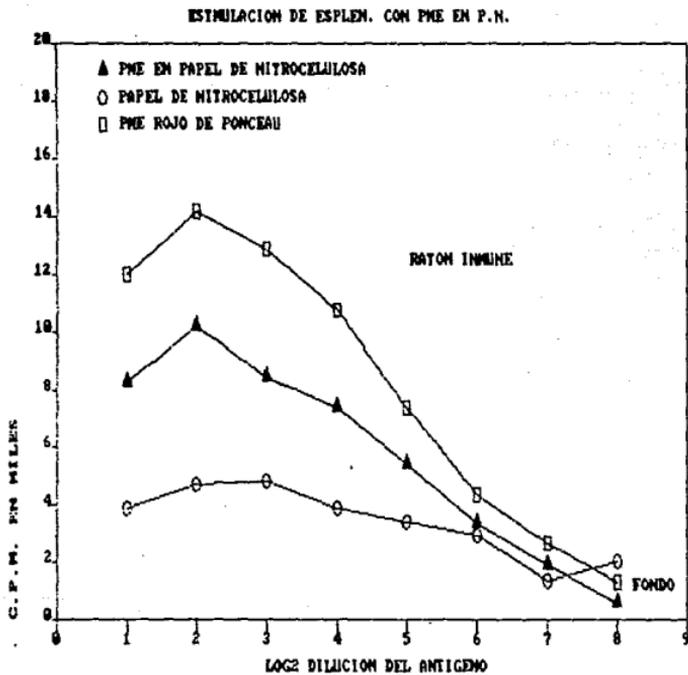


GRAFICA 3

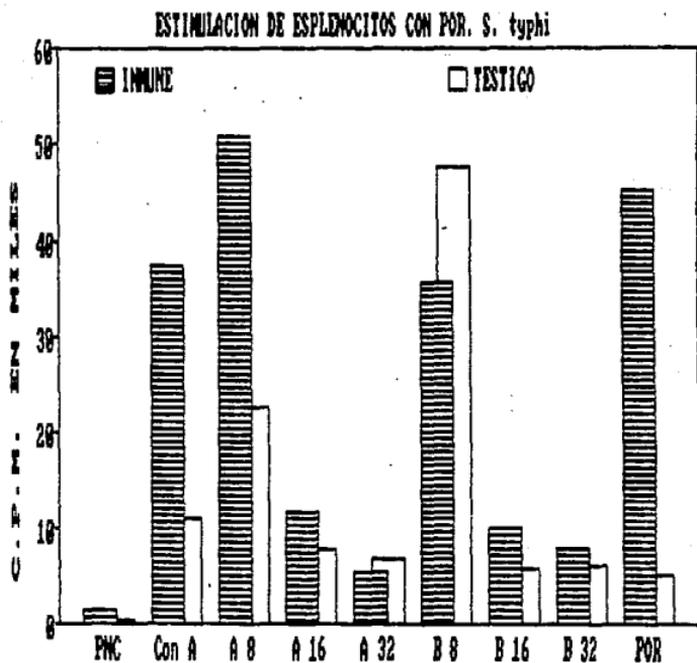
ESTIMULACION DE ESPLEN. COM PME EN P.N.



GRAFICA 4



GRAFICA 5



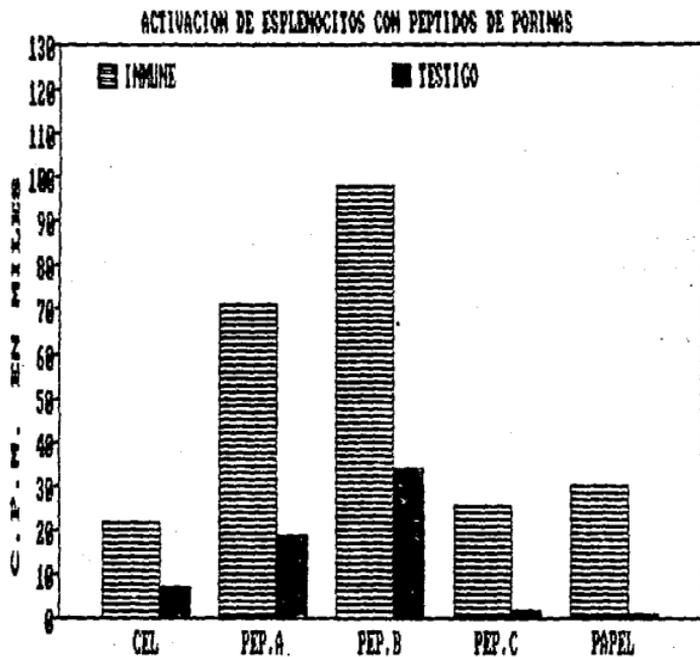
A= Porinas (Por.)

B= Otras PME de menor peso molecular.

B,16 y 32 = Diluciones del antígeno.

PNC = Papel de nitroceluloso.

GRAFICA 6



Pep A = 8 Kd

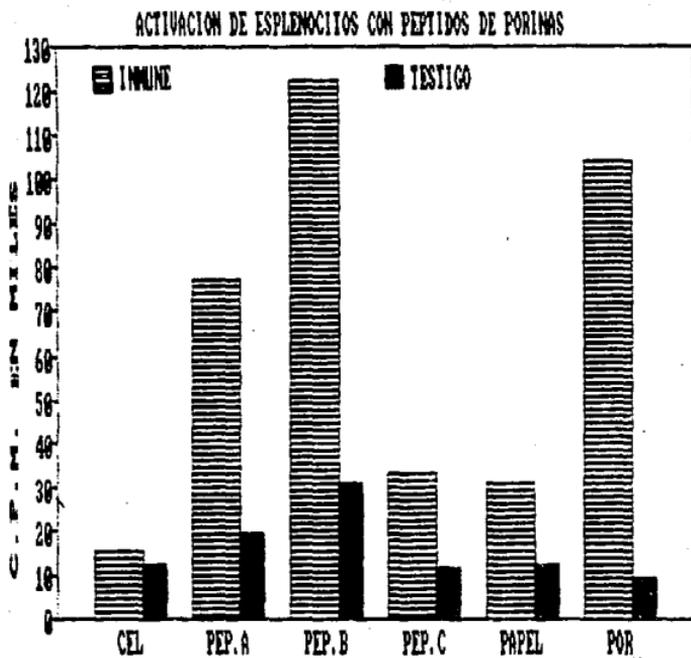
Pep B = 10 Kd

Pep C = 23 Kd

Cel = células

Pep = péptido

GRAFICA 7



Cel = células.
Pep = péptidos.
Por = porinas.

CAPITULO IV

DISCUSION

Los hallazgos más importantes de este trabajo fueron:

1. En el patrón electroforético de las PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d aisladas por el método de Schnaitman, se pueden observar, tanto proteínas mayores como menores, con pesos moleculares que van de 17 Kd a 70 Kd. Entre las mayores destacan la presencia de dos proteínas de 36 Kd a 41 Kd, que de acuerdo a su peso molecular, corresponden a las proteínas formadoras de canales (porinas). Esto fue muy similar a lo encontrado por Kamio para *S. typhimurium* sobre todo en lo que corresponde a las porinas (25).

2. El empleo del método de Schnaitman para la obtención de PME tiene como principales ventajas lo sencillo de la metodología y la obtención de las proteínas en su estado nativo, debido a que no se emplean procedimientos drásticos en la extracción de las mismas, aunque tiene como desventaja el contenido de LPS presente como contaminante en todas las preparaciones, ello obedece, en primer lugar, a que se trata del principal componente de la membrana externa (ocupa el 45 % de la superficie bacteriana) y en segundo lugar, a que algunas PME están unidas de manera no covalente al LPS para llevar a cabo sus funciones biológicas dentro de la bacteria (11).

3. Se logró la estimulación de esplenocitos preactivados y no activados con Con A (mitógeno específico para linfocitos T), siendo mayor la proliferación celular en el caso de linfocitos preactivados.

4. Las porinas solubles de *S. typhi* 9,12,Vi:d fueron

capaces de inducir proliferación celular tanto en esplenocitos de ratones inmunes (mayor respuesta), como en esplenocitos de ratones control. Esto concuerda con los trabajos de Bucnam y Arko quienes demostraron que el antígeno capaz de proteger a chimpancés contra la uretritis gonocócica se encontraba en la membrana externa de *N. gonorrhoeae* (5).

Se ha descrito un método para activar linfocitos, empleando antígenos de difícil purificación y obtención en grandes cantidades (2). Este método consiste en obtener el antígeno (PME), separarlo por SDS-PAGE, transferir a papel de nitrocelulosa y transformar las bandas proteicas obtenidas, en suspensiones finas por medio de dimetil sulfóxido. Estas suspensiones se colocan en las placas de microcultivo para realizar la estimulación de esplenocitos. La desventaja de este método reside en la dificultad de lograr partículas de papel muy finas para que sean fácilmente fagocitadas por los macrófagos. Sin embargo, este método nos permite purificar al antígeno, además, la cantidad de PME necesarias para la separación por SDS-PAGE es mínima y con las suspensiones de papel se logran buenas activaciones celulares. Una modificación hecha al método propuesto por Abou-Zeid (2), consistió en teñir el papel de nitrocelulosa con rojo de Ponceau, localizando de esta manera las bandas proteicas.

5. Con el objeto de analizar cual era la respuesta al papel de nitrocelulosa solo, al papel de nitrocelulosa teñido con rojo de Ponceau y al papel de nitrocelulosa con PME, se realizó un experimento de activación celular encontrándose que:

- a) el papel de nitrocelulosa no tiene efecto alguno en la acti-

vación celular, b) el rojo de Ponceau tuvo efecto mitogénico y; c) se dió proliferación celular en presencia de PME en fase sólida.

Se pensó que el efecto mitogénico del rojo de Ponceau se debió a que las células estaban preactivadas, ya que en el ratón testigo no se encontró el mismo efecto (gráfica # 3).

6. En experimentos subsecuentes se lavó el papel por varias ocasiones más, dejándose de observar la proliferación celular la cual se debía al colorante, ya que como mencionan Abu-Zeid y cols., los colorantes que contienen ácido acético pueden ser mitogénicos (2).

7. La técnica descrita permitió obtener porinas separadas de las otras PME y la cantidad de proteínas en las suspensiones de papel de nitrocelulosa fue suficiente para provocar una respuesta proliferativa celular *in vitro* de esplenocitos de ratones previamente inmunizados con PME. La mayor respuesta celular se obtuvo como en las ocasiones anteriores, con las porinas y menor para el resto de las PME.

De acuerdo con lo anterior se puede decir que se cuenta con un método que permitirá obtener cantidades suficientes de proteína, para emplearse en experimentos de la rama efectora celular que permitan dilucidar el papel de las porinas de *S. typhi* en la protección contra la fiebre tifoidea, así como también este método fue empleado para identificar los determinantes antigénicos responsables de la inducción de la respuesta inmune celular. Con respecto a lo anterior, se determinó que de los tres péptidos probados, sólo el de peso molecular de 10 kd

era el que generaba una mayor proliferación de linfocitos inmunes, por lo que se determinó que en ese péptido se localizaba el epítipo inmunodominante.

CAPITULO V

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de obtener PME de *S. typhi* 9,12,VI:d con el máximo grado de pureza posible y también, para determinar si estas proteínas eran capaces de producir proliferación de linfocitos inmunes *in vitro*.

Las PME aisladas mediante la solubilización con un detergente no iónico, y separadas por SDS-PAGE tuvieron pesos moleculares de 14 Kd a 70 Kd.

Se obtuvieron también porinas de *S. typhi* 9,12,VI:d, las cuales se caracterizaron electroforéticamente encontrando que sus pesos moleculares oscilaban entre 36 y 41 Kd.

Por otro lado, se logró la activación de linfocitos inmunes provenientes de ratones NIH con el mitógeno seleccionado (Con A), así como también con porinas solubles de *S. typhi*.

Por lo que respecta a la activación de esplenocitos inmunes empleando las PME que habían sido separadas por SDS-PAGE, transferidas a papel de nitrocelulosa y transformadas las bandas proteicas a suspensiones finas, se determinó que las proteínas cuyos pesos moleculares se encontraban entre 36 y 41 Kd (porinas) eran las que inducían una mayor activación de esplenocitos inmunes, en tanto que para las proteínas de pesos moleculares menores la respuesta proliferativa fue menor.

Una vez determinado que las porinas son las que inducen inmunidad celular *in vitro*, se hizo la digestión con CNBr de dichas proteínas y de los 4 péptidos obtenidos se probaron 3, de estos péptidos se localizó el epítipo inmunodominante que se encuentra en el péptido de 10 Kd.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1) Las proteínas de membrana externa de *S. typhi* 9,12, Vi:d tienen pesos moleculares que van de 17 Kd a 70 Kd. Destaca un grupo de dos proteínas principales con pesos moleculares de 36 a 41 Kd, las cuales se tratan de las porinas descritas en otras bacterias Gram-negativas.

2) Las porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d producen proliferación *in vitro* de esplenocitos procedentes de ratones inmunizados con PME de *S. typhi*.

3) El método empleado en la separación de porinas del resto de PME de *S. typhi* por SDS-PAGE y transferencia a papel de nitrocelulosa permite una eliminación parcial de la contaminación con LPS, así como la activación de esplenocitos *in vitro* de ratones inmunizados con PME.

4) De los péptidos de porinas, se demostró que en el correspondiente a 10 Kd, se localiza el epítipo inmunodominante.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Bonavida, B., Miller, A. and Sercarz, E. Structural basis for immune recognition of lysozymes. I. Effect of cyanogen bromide on Hen egg-white lysozyme. Biochem. 8: 968. 1969.
2. Abou-Zeid, C., Filley, E., Steele, J. and Rook, G. A. W. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. J. Immunol. Meth. 98: 5. 1987.
3. Anderson, E.S. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio Series In Immunobiological Standerization. 15: 79. 1968.
4. Bragg, P.D. y Hoy, C. Organization of protein in the native and refomed outer membrane of *E. coli*. Biochem. Biophys. Acta. 274: 478. 1972.
5. Buchanan, T.M.; Pearce, W.A.; Schoolnick, G.K. y Arko, R.J. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. J. Infect. Dis. 136(supl): 132. 1977.
6. Buchanan, T.M. y Arko, R.J. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs. J. Infect. Dis. 135: 879. 1977.
7. Cabern, M.J.; Gander, J. E.; Parisi, E.; Carson, J. Mecanism of assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*: Isolation and characterization of cytoplasmatic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247:3962. 1972.
8. Chesunt, R. W., Colon, S.M. and Gery, H. M., Requeriments for the prosscising of antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumor and macrophages. J. Immunol. 1219: 2382. 1982.
9. Colwell, D.E., Michalek, S.M., McGhee, J.R. LPS gene regulation of mucosal immunity and susceptibility to *Salmonella* infection in mice. Curr. Topics. Microbiol. Immunol. 124: 121. 1986.
10. Davies, B.D.; Dulbeco, R.; Eisen, H.N.; Gingberg, H.S. y Wood, W.B. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. Barcelona, Esp. 1983.
11. Di Rienzo, J., Nakumura, K., Inouye, Y. The outer membrane protein of Gram-negative bacteria: Biosynthesis assembly and functions. Ann. Rev. Biochem. 47: 481. 1978.

12. Eisenstein, T.K. Evidence for O antigen as the antigenic in "ribosomal vaccines" prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 12: 364. 1975.
13. Felix, A.; Krikorian, K.S. y Reitler, R. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J. Hyg. 35: 421. 1935.
14. Frasch, C.F. y Robbins, J.D. 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. 1978.
15. Fukazawa, Y., Kagaya, K., Isibasi, Y. Effect of delayed-type hypersensitivity reaction and transferred lymphokine on resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection. Infect. Immun. 46: 40. 1983.
16. Germanier, R. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Boi. of Sanit. Panam. 82: 300. 1977.
17. Germanier, R. The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results. Slavo International Conference on Bacterial Vaccines and local immunity. Siena, Italy. pp 10-12. 1986.
18. Germanier, R y Furer, E. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E mutant Ty 21a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131: 553. 1975.
19. Honam, A. W. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. Infect. Immunol. 22: 763. 1978.
20. Huckstep, R.L. Typhoid fever and other Salmonella infections. Ed. E. y S. Livingstone, Ltd, London. pp. 4-9. 1983.
21. Hynes, R. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48: 549. 1987.
22. Isibasi, A.; Calve, E.; Ortiz, V.; Fernández, M.; Hernández, A. y Kumate, J. Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa. Simposio Avances en el Uso de Vacunas 1985-1985. Ed. Gerencia General de biológicos y reactivos. págs. 109-115. Mexico, D.F. 1985.
23. Johnson, W. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ribosomal fraction isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 5: 947. 1972.
24. Joo, I. Present status and perspectives of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b diseases mediated by monoclonal antibody directed against a *Haemophilus* outer membrane protein. Lancet. 1: 366. 1982.

25. Kamio, Y., Nikaido, H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium* identification of proteins exposed on cell surface. Biochim. Biophys. Acta. 464: 589. 1977.
26. Klugman, K.P., Koornof, H.J., Gilbertson, I.T., Robbins, J.B., Schneerson, R., Shulz, D., Cadoz, M., Armand, J. and The Vaccination Advisory Committee. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. The Lancet. i. 1166. 1987.
27. Kumate, J. Inmunidad, inmunización y vacunas. Primera edición. Ediciones médicas del hospital infantil de México. pp 227-247. 1970.
28. Kumate, J. Inmunidad, inmunización y vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp. 227-247. 1979.
29. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H. y Mäkelä, P.H. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in experimental murine salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. Infect. Immun. 34: 328. 1982.
30. Kussi, N.; Nurminen, M.; Saxén, H.; Valtonen, M. y Mäkelä, P.H. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25:857-862. 1979.
31. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680. 1970.
32. Levine, M.M.; DuPont, H.L.; Hornick, R.B.; Snyder, M.S.; Woodwar, W.; Gilman, H.R. y Libonatti, J.P. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. J. Infect. Dis. 133: 424. 1976.
33. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. Protein measurement with the phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265. 1951.
34. Mäkelä, P. H., Houli, M. Saxén, H., Valtonen M. and Valtonen V. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. Immunol. Lett. 19: 217. 1988.
35. Marrack, P., Enders, R., Schimonkevitz, R. et al. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cell. II Role of the L3T4 product. J. Exp. Med. 158: 1077. 1983.
36. Mates, A. y Yosipovici, H. Localization of the protective antigens in *Salmonella typhimurium*. Microbios. 16: 81. 1976.
37. Miller, G. Do suppressor T cells exist? Scand. J. Immunol. 27: 247. 1980.

38. Misfeldt, M.L. y Johnson, W. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 14: 652. 1976.
39. Misfeldt, M.L. y Johnson, W. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 17: 98. 1977
40. Misfeldt, M.L. y Johnson, W. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 24: 808. 1978.
41. Miura, T. y Mizushima, S. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of *Escherichia coli* K-12. Biochim. Biophys. Acta. 150: 159. 1988.
42. Miyajima, A., Schoichiro, M., Scheurs, J., De Vries, J., Arai, N., Yokota, T. and Arai K. Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell-derived lymphokines. FASEB J. 2: 2462. 1988.
43. Mizuoci, T., Ono, S., Malek, T.R. and Singer, A. Characterization of two distinct primary T cell populations that secrete interleukin 2 upon recognition of class I or class II major histocompatibility antigens. J. Exp. Med. 163: 603. 1986.
44. Molinari, J.L. y Cabrera, R. Inmunidad inducida con una preparacion ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 199. 1974.
45. Molinari, J. L. y Larralde, C. Acquired Immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 16: 189. 1974.
46. Mosmann, T.R., Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immunol. 7: 145. 1984.
47. Nabholz, M., MacDonald, H.R. Cytolytic T Lymphocytes. Ann. Rev. Immunol. 1: 273. 1983.
48. Nikaïdo, H. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. Methods Enzymol. 97: 85. 1983.
49. Nikaïdo, H. and Vaara, M. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49:1. 1985.
50. O'Brien, A. D., Metcalf, E.F. Control of early *Salmonella typhimurium* growth in innately *Salmonella*-resistant mice does not require functional T lymphocytes. J. Immunol. 124: 121. 1986.
51. O'Garra, A. Peptide regulatory factors. Interleukins and the immune system 2. The Lancet. 1989.

52. Ortiz, V., Isibasi, A., García Ortigoza, E. y Kumate J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27: 1640. 1989.
53. Ortado, J.R. and Hebermen, R.B. Heterogeneity of natural killer cells. Annu. Rev. Immunol. 2: 359. 1984.
54. Osborn, M.J.; Gander, J.E.; Parisi, E. y Carson, J. Mechanism and assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247: 3962. 1972.
55. Paul, C., Shalada, K., Warren, R. et. al. Adoptive transfer of murine host protection to salmonellosis with T-cell growth factor-dependent, *Salmonella*-specific T-cell lines. Infect. Immun. 48: 40. 1985.
56. Pérez, M. A. y Cabrera, R. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Rev. Salud Pública de México. XV: 185-194. 1974.
57. Pfeiffer, R. y Kölle, W. Ober die spezifische Immunitäts Reaktion der Typhusbazillen. Z. Hyg. Infect. Jc. 21: 202. 1896.
58. Reitman, M. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J. Infect. Dis. 117: 101. 1967.
59. Revel, M. and Chebath, J. Interferon activates genes. TIBB. 11: 166. 1986.
60. Robbins, J.D. y Robbins, J.B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (VI antigen) of *Salmonella typhi*. J. Infect. Dis. 150: 436. 1984.
61. Sandford, G.R. Infectious diseases. Ed. Burgess Pub. Co. U.S.A. pp. 55-130. 1979.
62. Schnaitman, C.A. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriol. 104: 882. 1970.
63. Schnaitman, C.A. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. J. Bacteriol. 108: 545. 1971.
64. Schnaitman, C.A. 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. 1971.
65. Schnaitman, C.A. Outer membrane proteins of *E. coli* O 111 outer membrane consist of four distinct polypeptide species. J. Bacteriol. 118: 442. 1974.

66. Schreiber, J.R., Hicks, L.J., Celada, A., et al. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. J. Immunol. 134: 1609. 1985.
67. Schultz, R.R.M., and Kleinsmith, W.J. Functional identity between murine recombinant gamma interferon and macrophage activating factor. Nature 305 : 239. 1983.
68. Smith, R. A. y Blegly, M.J. Ribonucleic acid protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogen. Infect. Immunol. 6: 373. 1972.
69. Smith, K. A. and Rennik, D.M. Characterization of a murine lymphokine distinct from Interleukin 2 and Interleukin 3 possessing a T cell growth factor activity and mast cell growth factor activity that synergizes with IL-3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1857. 1986.
70. Svenson, S. B., Nurminen, M. and Linberg, C. A. Artificial *Salmonella* vaccines: O-Antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immunol. 3: 328. 1981.
71. Tagliabue, A., Nencioli, L., Villa, L. et al. Genetic control of in vitro natural cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by intestinal and splenic lymphoid cells in mice. Clin. Exp. Immunol. 56: 531. 1986.
72. Ternberger, K., A.J., Eake, C.T., et al. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 81. 1984.
73. Thapa, R., Acharya, I.L., Lowe, C.L., Gurubacharya, V.L., Shrestha, M.B., Bact, D., Cadoz, M., Schulz, D., Armand, J., Bryla, D.A., Trollifors, B., Cranton, T., Scheerson, R. y Robbins, J.B. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. J. Med. 317: 1101. 1987.
74. Towin, H.T.; Staehlin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350. 1979.
75. Tully, J.G.; Gaines, S. y Tigerit, W.D. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. J. Infect. Dis. 112: 118. 1963.
76. Unanue, E.R. Antigen-presenting function of the macrophage. Ann Rev. Immunol. 2: 395. 1984.

77. Venneman, M.R.; Brigley, N.J. y Berry, L.J. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 1: 574. 1970.

78. Youmans, A.S. y Youmans, G.P. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 99: 42. 1965.

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

APENDICE .

8.1 MATERIAL .

8.1.1 MATERIAL BASICO DE LABORATORIO .

- Asas bacteriológicas .
- Botellas de 4 litros para cultivo bacteriano .
- Cajas de petri .
- Filtros Millipore estériles de 0.22 μ m .
- Frascos ambar de 250 ml con tapón esmerilado .
- Instrumental quirúrgico .
- Matraces aforados de 100 ml y 500 ml .
- Matraces Earlenmeyer de 250 ml .
- Micropipeta ajustable hasta 20 μ l .
- Micropipeta ajustable hasta 200 μ l .
- Pipetas serológicas de 1 ml , 5 ml y 10 ml .
- Pipetas volumétricas de 1ml , 5 ml y 10 ml .
- Placas para microcultivo de 96 pozos Nunclon .
- Puntas para micropipetas .
- Tubos cónicos desechables estériles de 10 ml y 50 ml .
- Vasos de precipitado de 50 ml y de 250 ml .

8.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO .

8.1.2.1 Obtención de PME y porinas .

- Cultivo Bacteriano

a) Cepa de *Salmonella typhi* 9,12 Vi:d, aislada de un paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea .

6.1.3 REACTIVOS.

- Acido acético (Merk).
- Acido fórmico (Merk).
- Acrilamida (Biorad).
- Albúmina sérica bovina (Sigma).
- Azul de Coomasie (Merk).
- Bromuro de cianógeno (Merk).
- Carbonato de sodio (Baker).
- Citrato de sodio (Baker).
- Cloruro de sodio (Merk).
- Dodecil sulfato de sodio (Merk).
- Extracto de levadura (Bioxon).
- EDTA (Sigma).
- Fosfato de potasio monobásico y dibásico (Baker).
- Glicerol (Merk).
- Glicina (Merk).
- Glucosa (Merk).
- Hepes (Sigma).
- Hidróxido de sodio (Baker).
- Metanol (Merk).
- Persulfato de amonio (Baker).
- Reactivo de Folin ciocolteu (Merk).
- Sulfato de amonio (Baker).
- Sulfato de magnesio (Baker).
- Sulfato de cobre pentahidratado (Baker).
- Tartrato doble de sodio y potasio (Baker).
- TEMED (LKB).

- Tris (Sigma).
- Triton X-100 (Sigma).

8.1.4 SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

8.1.4.1 Medios de cultivo para bacterias

- Agar Infusión cerebro corazón (BHI).
- Medio mínimo de sales "A".

8.1.4.2 Aislamiento de las PME

- Hepes 10 mM pH 7.4, Tritón X-100 al 2%.
- Tris 50 mM pH 7.8, Tritón X-100 al 2%.

8.1.4.3 Cuantificación de proteínas

- Solución patrón de proteína: Albúmina sérica bovina al 0.1%
- Carbonato de sodio al 2% (solución alcalina).
- Tartrato de sodio y potasio al 2%.
- Sulfato de cobre pentahidratado al 1%.
- Reactivo de Folin-Ciocalteus.

8.1.4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

- Solución de acrilamida.
- Amortiguador Tris-HCl 1.5M pH 8.8
- Amortiguador Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- SDS al 10%
- APS al 10%
- Amortiguador de muestra

- Amortiguador de corrimiento: Tris-glicina pH 8.3
- Solución colorante de azul de Coomasie
- Solución decolorante

8.1.4.5 Inmunoelctrotransferencia

- Amortiguador de transferencia: Tris-glicina pH 7.9
- Amortiguador de fosfatos salinos pH 7.4
- Solución de lavado: PBS-Tween al 0.1%

8.1.4.6 Digestión de porinas

- Bromuro de cianógeno
- Acido fórmico concentrado

8.2 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

8.2.1 MEDIO MINIMO DE SALES "A"

fosfato de potasio dibásico	7.0 g/l
fosfato de potasio monobásico	3.0 g/l
citrato de sodio	0.5 g/l
sulfato de amonio	1.0 g/l
sulfato de magnesio	0.1 g/l

Esterilizar el medio a 15 lb de presión, 15 minutos, a 120 °C. Posteriormente adicionar 20 ml de glucosa al 12.5% y 10 ml de extracto de levadura al 5% ; previamente esterilizados a 10 lb de presión, 10 minutos.

8.2.2 SOLUCION DE LAVADO

Hepes 10 mM pH 7.4, Tritón X-100 al 2 %

hepes	2.6 g/l
tritón X-100	20.0 g/l

8.2.3 SOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA EL AISLAMIENTO DE LAS PME.

Tris 50 mM, EDTA 5 mM pH 7.8, Tritón X-100 al 2 %

tris	6.05 g/l
EDTA	1.86 g/l
triton X-100	20.0 g/l
agua destilada c.b.p.	1.00 l
Hepes 0.01 M pH 7.4, Tritón X-100 al 2%	
Hepes	2.6 g/l
Tritón X-100	20.0 g
agua destilada c.b.p.	1.00 l

8.2.4 SOLUCIONES PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

Solución para la curva patrón de proteínas

Albumina sérica bovina	25.0 mg
agua destilada c.b.p.	25.0 ml
Reactivos para la curva patrón	
Carbonato de sodio	2.0 g
Hidróxido de sodio 0.1 M	100 ml
Tartrato doble de sodio y potasio	2.0 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml
Sulfato de cobre pentahidratado	1.0 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Reactivo de Folin ciecolteu	2.0	ml
Agua destilada c.b.p.	6.0	ml

6.2.5 SOLUCIONES PARA LA ELECTROFRESIS EN ACRILAMIDA

Acrilamida	30.0	g
N'N bismetilen acrilamida	0.08	g

Aforar a 100 ml con agua desionizada y destilada; filtrar en papel Whatman # 41 y mantener a 4 °C en un frasco ámbar.

Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Trizma base	6.0	g
-------------	-----	---

Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml

Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Trizma base	6.0	g
-------------	-----	---

Ajustar el pH con HCl 2 N y aforar con agua destilada y desionizada a 100 ml

Amortiguador de muestra

Amortiguador Tris-HCl pH 6.8	25	ml
SDS	2.0	ml
Azul de Bromofenol al 1%	0.1	ml
Glicerol	10	ml
2-Mercaptoetanol	5.0	ml

Amortiguador de corrimiento pH 8.3

Trizma base	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS	1.0 g
Agua destilada y desionizada c.b.p.	1.0 l

Solución colorante de proteínas

Metanol al 50%	454 ml
Acido acético	46 ml
Azul de Coomasie	1.2 g

Agitar durante 30 minutos y filtrar en papel Whatman # 41.

Solución decolorante para el azul de Coomassie

Metanol	50 ml
Acido acético	25 ml

Aforar a un litro con agua destilada.

Gel separador para la placa de electroforesis al 11.5%

Acrilamida	11.5 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	7.5 ml
Agua destilada y desionizada c.b.p.	11.0 ml
SDS al 10 %	0.6 ml
TEMED	0.01 ml
PSA 10%	0.05 ml

Mezclar el agua, tris y acrilamida; desgasificar la solución de 3 a 5 minutos para posteriormente adicionar el SDS, TEMED y PSA.

Gel introductor para placa de electroforesis

Acrilamida	2.5	ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	3.75	ml
Agua destilada y desionizada c.b.p.	7.5	ml
SDS al 10 %	0.15	ml.
TEMED	7.5	µl
APS al 10 %	50	µl

8.2.6 SOLUCIONES PARA LA ELECTROTRANSFERENCIA

Amortiguador de transferencia

Trizma base	9.075	g
Glicina	43.2	g
Metanol	600	ml
Agua destilada c.b.p.	2400	ml

Amortiguador de Fosfatos (PBS)

Cloruro de Sodio	8.7	g
Fosfato monobásico de sodio	0.4	g
Fosfato dibásico de sodio	2.7	g
Agua destilada y desionizada c.b.p.	1.0	l

8.3 METODOLOGIA.

8.3.1 METODOS BACTERIOLOGICOS.

8.3.1.1 Cultivo de bacterias.

- Para preparar la semilla hay que sembrar *S. typhi* en 2 cajas de petri con BHI e incubar de 18 a 24 horas, en seguida tomar 2 o 3 asadas del crecimiento, colocarlas en 150 ml de MMA

suplementado e incubar de 18 a 24 horas. Al cabo de este período de incubación crecer las bacterias durante 8 h a 37°C y 200 rpm en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente, cosechar las bacterias, en fase de crecimiento logarítmico, por centrifugación a 1650 xG durante 15 min a 4°C. Resuspender la pastilla bacteriana en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservar a -20°C hasta su uso.

8.3.2 METODOS BIOQUIMICOS.

8.3.2.1 Aislamiento de PME.

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realiza de acuerdo al método de Schnaitman (63), para ello ajustar las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm; posteriormente romper mediante sonicación a 180 watts por períodos de 2 min en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.3. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, centrifugar a 7000 xG durante 15 min, del sobrenadante sedimentar la envoltura celular por ultracentrifugación a 200 000 xG/45 min a 4°C, solubilizar ésta 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) sedimentarla por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas y para lograr la extracción de las PME resuspender en Tris-HCl pH 7.2 que debe contener tritón X-100 al 2% y 5 mM de EDTA, incubar durante 10 min a 37°C y posteriormente ultracentrifugar a 200 000 xg/45 min./37°C (64). Recuperar las PME del sobrenadante y mantener a -70°C hasta que se utilicen.

8.3.2.2 Purificación de porinas por exclusión molecular.

La obtención de porinas se efectúa mediante el método descrito por Nikaido (48,49). Cosechar las bacterias en la fase de crecimiento logarítmico y ajustar a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente romper por sonicación en períodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. En seguida eliminar las bacterias enteras por centrifugación a 7000 xG/15 min, obtener la envoltura celular por ultracentrifugación a 100 000 xG/30 min a 20°C, solubilizar ésta en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de SDS al 2% y incubar 30 min a 32°C, posteriormente ultracentrifugar y someter el sedimento a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contiene peptidoglicana, de donde se extraen 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 período de incubación de 2 h a 37°C, ultracentrifugar a 100 000 xG/30 min a 25°C y pasar el sobrenadante a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm.) con una velocidad de flujo de 4 ml/h. La fracción que eluye inmediatamente después del volumen vacío, se detectada por absorbancia a 280 nm. Para reutilizar la columna, lavar con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel.

8.3.2.3 Digestión de porinas.

Liofilizar las porinas y pesar 100 mg de BrCN (cantidad empleada para digerir 1 mg de porinas). Adicionar al BrCN 1 ml de ácido fórmico y adicionar esta mezcla a las porinas liofil-

zadas. Agitar y proteger de la luz. Mantener la reacción durante 20 hrs.; al cabo del cual, colocar la mezcla dentro de una membrana de diálisis para permitir el paso de las moléculas menores a 2,000 d, dializando este contenido contra PBS pH 7.4 con cambios frecuentes del amortiguador hasta eliminar completamente el BRCN (1).

8.3.3 METODOS ANALITICOS.

8.3.3.1 Determinación de proteínas.

Para cuantificar el contenido de proteínas tanto en las preparaciones de PME (obtenidas por Schnaltman) como en las de porinas purificadas; realizar el método de Lowry (33) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

8.3.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Realizar la SDS-PAGE de PME y porinas en una unidad electroforética para geles verticales en placa en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos (31). El gel separador debe contener 11.2 % de acrilamida, 2.5 % de bis-acrilamida, 0.19 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.6. El gel introductor debe contener 5 % de acrilamida, 0.13 % de bis-acrilamida, 0.1 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra usar Tris 0.125 M pH 6.8, que debe contener SDS al 2 %, β -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005 %.

Llevar a cabo el corrimiento electroforético colocando 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 teñir los

geles durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Decolorar con una solución de metanol-ácido acético agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel sea transparente.

8.3.3.3 Inmuno-electrotransferencia.

La electrotransferencia de PME y porinas de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se lleva a cabo durante 1.15 hrs a 50 mA en un equipo Transphor. El amortiguador para la transferencia debe contener glicina 192 mM, metanol al 20 % en Tris 20 mM, pH 8.3 (74). Transcurrido este tiempo y para comprobar que la transferencia se llevó a cabo, teñir una parte del PNC con rojo de Ponceau durante 5 minutos y lavar en seguida con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS).