

10 300627
24



UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDUCCION DE PROTECCION ACTIVA CON
LIPOSOMAS DE PORINAS DE Salmonella typhi
9, 12, Vid EN UN MODELO MURINO

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JOSE ANTONIO GARCIA MACIAS

Director de Tesis:
DRA. ARACELI SANCHEZ DE CORRAL

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.



**SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN
PARA LA APROBACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS
(INDIVIDUAL)**

C. DIRECTOR GENERAL DE INCORPORACIÓN
Y REVALIDACIÓN DE ESTUDIOS DE LA UNAM
Presente.

GARCIA

Apellido Paterno

MACIAS

Apellido

JOSE ANTONIO

Nombre(s)

Número de cuenta: 82715428-2

Alumno de la carrera de: QUIMICO FARMACUTICO BIOLÓGICO

Solicita la autorización de impresión de la tesis titulada: INDUCCIÓN DE PROTECCIÓN ACTIVA
CON LIPOSOMAS DE PORIRAS DE Salmonella typhi 8,12, VIDA EN UN MODELO MURINO.

del área:

México, D.F., a 30 de Junio de 1988

OTORGÓ EL VOTO APROBATORIO Y
CONFORMIDAD PARA ASISTIR COMO
MEMBRAL AL EXAMEN PROFESIONAL


Firma del autor

Vc. No.


Dr. Arcadio Sánchez de Corral

Director de Tesis
Ponente y Jefe


Q.B.F. Guadalupe Miralón Neco

Encargada de Tesis
Ponente y Jefe

Vc. No.


Dr. Arcadio Sánchez de Corral

Director de Tesis
Ponente y Jefe

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
SECRETARÍA DE CULTURA Y FOLCLORE

EL JEFE DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Ha de constar la aprobación de la tesis objeto de esta solicitud, y a su vez su impresión.

Ciudad Universitaria, D.F., a 22 de Junio de 1988

"POR MI BAZA HABLARÁ EL SEÑOR"

Dr. David Casaverías Ballea

Jefe de Tesis

INDICE

	Página
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	2
III. OBJETIVOS.	4
IV. GENERALIDADES.	5
V. MATERIALES Y METODOS.	21
1. Equipo.	21
2. Copas de bacterias y ratones.	21
3. Cultivo de bacterias.	21
4. Aislamiento de porinas.	22
5. Determinación de proteínas.	23
6. Determinación de endotoxina.	23
7. Electroforesis en sales de poliacrilamida	23
8. Obtención de liposomas.	24
9. Determinación de dosis letal media.	25
10. Obtención de esplenocitos de ratón.	26
11. Estimulación de esplenocitos.	26
12. Evaluación de la protección activa.	27
VI. RESULTADOS.	28
VII. DISCUSION DE RESULTADOS.	37
VIII. CONCLUSIONES.	46
IX. ANEXOS I. PREPARACION DE MEDIOS Y SOLUCIONES.	47
X. ANEXOS II. GLOSARIO.	50
XI. BIBLIOGRAFIA.	57

I. RESUMEN.

Porinas de 9, lyb 9,12,11d fueron purificadas e incorporadas a lípidos polares secos para obtener la molécula adyuvada liposomas-porinas.

La participación de estos liposomas en el desencadenamiento de una respuesta inmune contra la bacteria fue evaluada in vivo a través de ensayo de protección activa empleando un modelo murino e in vitro por la determinación de linfina, fílida incorporada a esplenocitos murinos en presencia o ausencia de antígeno.

Los resultados obtenidos muestran una mayor activación in vitro cuando se emplean porinas incorporadas a liposomas en comparación con porinas. Los resultados de protección, sin embargo, fueron contrarios, lo que sugiere que cuando las porinas se encuentran asociadas a membranas lipídicas se presentan preferentemente a las células inmunocompetentes en el contexto de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

II. INTRODUCCION.

Las porinas son proteínas intrínsecas que se encuentran en la membrana externa de bacterias gram-negativas, capaces de formar canales de difusión transmembranales para el paso libre de ciertas solutos a la bacteria. Se ha demostrado que las porinas son inmunógenas importantes en la protección activa ante el reto de bacterias como *E. coli* (30), *E. gonorrhoeae* (9), *Shigella* sp. (4) y *E. lacturum* (26) entre otras.

Las porinas en su forma monomérica tienen un peso aproximado de 36 a 41 kD. Se ha pensado que se pueden aumentar sus propiedades inmunogénicas si se le conjuga con otra molécula, o bien si se administra con adyuvantes. Ejemplos como los liposomas (79).

Los liposomas son estructuras multilaminares que resultan del enfrentamiento de lípidos polares hacia a medias acuosas (4). Estos se caracterizan por la presencia de bicapas concéntricas de lípidos, alternando con compartimientos acuosos, donde las sustancias solubles en agua, como enzimas y proteínas se incorporan (80). En el año de 1974 Allison y Gregoriadis demostraron que los liposomas pueden actuar como adyuvantes de la respuesta inmune, al observar un aumento del título de anticuerpos, cuando se inmunizaba a ratones con toxoide difterico incorporado a liposomas, comparando con el ratón inmunizado solo con el toxoide (8). Así también en el año de 1981, Shes y Sabistan encontraron que se podía potenciar la respuesta de esplenocitos de ratas a albúmina sérica bovina *in vitro*, cuando se inmunizaba esta incorporada a liposomas

084.

Con base en estos antecedentes, se evalúa la respuesta inmune del ratón a las perlas de 8, trp incorporadas a liposomas.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad de las perinas de Salmonella typhi 9,12,Viad incorporadas a liposomas de inducir inmunidad protectora in vitro ante el reto de la bacteria homóloga, así como respuesta celular in vitro.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Purificar y caracterizar las perinas de S. typhi.
- b) Incorporar perinas a liposomas.
- c) Realizar ensayos de activación celular in vitro con las perinas incorporadas o no a liposomas.
- d) Evaluar la protección activa conferida por las perinas incorporadas o no liposomas en un modelo murino.

IV. GENERALIDADES

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión o invasión intestinal de Salmonella typhi, una bacteria gram-negativa, móvil, no esporulada, que se caracteriza serológicamente por presentar los antígenos somáticos 9 y 12, el antígeno flagelar "d", y el antígeno capsular denominado "Vi". Esta bacteria es un parásito exclusivo del hombre por lo que la infección involucra siempre una fuente humana.

Origen de la infección y entrada de la bacteria.

La infección se adquiere mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados, no existen reservorios animales y la principal fuente de infección son los portadores asintomáticos, personas que eliminan repetidamente salmonela a través de las heces, sin presentar signos o síntomas de la enfermedad (30). Las bacterias se excretan en las heces a partir de las cuales pueden ser transmitidas al agua y a los alimentos, continuando de esta manera el ciclo (28).

La infección por Salmonella typhi es por vía oral. La bacteria coloniza el intestino delgado sin causar síntomas apreciables. Es probable que la salmonela interactúe predominantemente con las superficies apicales o con un receptor primario de azúcar (71), produciendo una unidireccionalidad durante la infección (a vix) y que de esta forma se lleva a cabo el tránsito a través del epitelio (17).

Las bacterias ganan el acceso a espacios de tejido submucosa a través de las células M de las placas de Peyer (10). De allí viajan por vía linfática a la circulación y son entonces tomadas por los macrófagos del bazo y del hígado (células de Kuffer en el último). Estas células son el principal lugar de multiplicación de las salmonelas en los días siguientes (12). La multiplicación toma lugar intracelularmente donde no es afectada por la presencia de anticuerpos y muchos antibióticos (13).

La invasión del sistema biliar de nueva causa la entrada de las bacterias en el aparato digestivo en cantidad masiva. La afección del tejido linfático en el aparato digestivo, principalmente de las placas de Peyer en el ileo terminal, conduce a la necrosis y a la ulceración. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, cefalea, malestar general, diarrea o constipación, en ocasiones puede haber exantema, desorientación y estado psicofísico; el padecimiento puede complicarse con perforación intestinal o choque séptico que pueden llevar a la muerte (14). Las pruebas serológicas sólo orientan en el diagnóstico, el cual se confirma mediante el aislamiento de la bacteria de sangre, médula ósea o heces del paciente.

La fiebre se produce por un mecanismo que involucra a una sustancia conocida como "pirógeno endógeno" y que se sabe corresponde a la actual interleucina 1 (IL-1). La endotoxina de la bacteria estimula a los monocitos y macrófagos a que produzcan esta hormona, la cual además de actuar a las células T inmunocompetentes, actúa a nivel del área preóptica del hipotálamo donde

se induce la producción de prostaglandinas. Estas sustancias, a su vez, incrementan la síntesis de noradrenalina, un agonista α -adrenérgico que aumenta la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Finalmente, este ciclonucleótido produce alteraciones en la actividad de las neuronas sensibles a la temperatura originando un incremento de la misma (Figura 1).

Mecanismos inespecíficos de defensa.

En los mamíferos estos mecanismos incluyen las barreras de los epitelios dérmico y mucoso, la lisis de la bacteria por componentes antimicrobianos del suero y otros fluidos y finalmente, la fagocitosis.

Las células epiteliales usualmente engloban a los microorganismos invasores, sin embargo las bacterias que son tomadas por estos fagocitos no profesionales, quedan sobrevivir en el interior de los fagosomas e intentar pasar el suero a espacios de tejido subcutáneo por mecanismos de escape (3).

Las actividades antimicrobianas de los fluidos extracelulares del hospedero, actúan mediante dos mecanismos diferentes. El primero se realiza de una manera pasiva promoviendo la destrucción de la bacteria por un proceso que involucra al complemento.

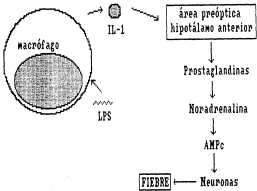


Figura 1. Probable mecanismo de producción de fiebre por la endotoxina de bacterias gram-negativas (LPS). IL-1 = interleucina 1; AMPc = monofosfato de adenosina cíclica. (Esquema modificado de Orata, D.V. y Mills, J. 1985. Inmunitas e infección. En: Inmunología Básica y Clínica. Quinta edición. Giltes et al edit. EP Manual Moderno. México D.F. pg. 224.

El segundo mecanismo funciona por la captura de hierro de las fluidas, un elemento esencial para la viabilidad de los microorganismos (18).

Las bacterias gram-negativas usualmente resisten la acción aislada de la β -lisina y de la lisocima, pero suelen ser sensibles a la lisis del complemento por una activación de la vía alterna del mismo. La muerte se produce por la deposición estable del complejo MAC C5-C9 en la membrana de la bacteria. La interacción resultante permite el acceso de la lisocima del suero a la peptidoglicano de la bacteria, ocasionando su lisis (72).

La fagocitosis representa el último y más efectivo mecanismo inespecífico de defensa. Los principales fagocitos profesionales, involucrados en la destrucción de las bacterias invasoras, incluyen a los neutrófilos, monocitos y macrófagos. Estas células son atraídas a las bacterias por sustancias químicas como péptidos que contienen α -factor, metformina, así como ciertos componentes de la cascada del complemento (C3a y C5a).

Los fagocitos estimulados por estas quimiocinas entran en contacto con la bacteria vía receptores para el Fc de IgG1 a IgG3, así como diversos receptores para C3b. Después de la endocitosis el fagosoma formado se fusiona con los lisosomas para constituir el fagolisosoma. Los granulos de los lisosomas específicos o secundarios, que son los más abundantes, contienen predominantemente lisocima y lactoferrina (18). Los gránulos azufreos o primarios son más bactericidas y poseen una gran diversidad de

componentes antimicrobianos que incluyen proteínas catalíticas (51), mieloperoxidasa (52) y defensinas (53) entre otras. Cuando la mieloperoxidasa se combina con un haluro y peróxido de hidrógeno, generados por la vía oxidativa, se provee de un mecanismo antibacteriano efectivo, siendo el agente real del proceso el ácido hipocloroso o el hipoclorito, asociándose la muerte con un incremento de la permeabilidad de la pared celular (54). Otras especies reactivas del oxígeno como los radicales hidroxilo y superóxido, contribuyen a la muerte de la bacteria. Aunque el sistema de la mieloperoxidasa no es expresado por macrófagos, estas células están sujetas a activación inmunológica por el interferón gamma, lo que eleva su capacidad de generar especies reactivas del oxígeno (74).

Mecanismos de Virulencia.

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

El antígeno VI de Salmonella typhi ha sido objeto de muchas investigaciones desde los años 30 en que se observó su importancia en la patogénesis e inusidad de la fiebre tifoidea; invariablemente S. typhi aislado de sangre de pacientes con fiebre tifoidea contiene este antígeno (14). El antígeno VI parece ser 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 (44). La demostración de que el antígeno Vi no está involucrada en la invasividad de S. typhi, se ha realizado en un modelo emulando monocapas celulares como las que se encuentran en el epitelio del carcinoma de cervix humana (células HeLa) (42).

Jones et al realizaron experimentos de invasiones de Salmonella typhimurium a células HeLa y encontraron que cuando se usaban mutantes de esta especie, sin motilidad, no se establecía el contacto entre las 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 produjo la invasión (31). Cuando estos experimentos se repitieron para S. typhi empleando el modelo de monocapas celulares de riñón de perro (PKCK), no se obtuvo el mismo resultado, lo que sugirió que esta bacteria requiere de motilidad intrínseca para invadir células epiteliales, y que esta no puede ser sustituida por fuerzas mecánicas, como en el caso de S. typhimurium (44).

Por otra parte, se ha demostrado que el antígeno O aumenta la virulencia de la bacteria, cuando la infección ocurre por una ruta en la cual estas son expuestas a macrófagos capaces de matar a las salmonelas (47). 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 esta 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 defectivo en el componente C9, es incapaz de llevar a las bacterias sensibles a lisis (47).

En cuanto a los mecanismos por los cuales la bacteria evade su destrucción en el interior de las fagocitos, se han propuesto tres probables (34): 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 monocuclear. Los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APC) digieren las fracciones proteicas a péptidos (18) 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.

Las T_H ($CD4^+$) reconocen al antígeno asociado a moléculas de histocompatibilidad de clase II (64). 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 linfaínas que conducen la fase efectora de la respuesta inmune (67). 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 linfaínas ($INF-\beta$); en cambio, los T_H2 producen fundamentalmente IL-4, 5 y 6, las cuales son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B (68).

Aún cuando los linfocitos B reconocen el 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 (49). 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 antigenicos (41).

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 citocinas, 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 (6); además, se les ha descrito función supresora, la cual es difícil de interpretar bajo la luz de los conocimientos actuales (49).

Para que la citotoxicidad se lleve a cabo es necesario que en primer término entren en contacto la célula infectada con los CTL (23). La formación del conjugado es promovida en un medio rico en iones Hg^{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 (2,24) (Figura 2).

En la fase específica por CTL la unión del complejo antígeno-MHC en la célula blanca, con las cadenas α y β del TCR 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 (25), enzimas hidrolíticas y proteoglicanos entre otros (27). Recientemente, también se ha descrito la participación de una lipasa que es codificada por los CTL cuando estos son estimulados con IL-4 (28).

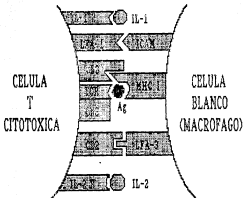


Figura 2. Reconocimiento del antígeno por el linfocito T citotóxico (CTL). La célula citotóxica es activada por mediadores solubles como la interleucina 1 (IL-1) proveniente de un macrófago activado y la interleucina 2 (IL-2) proveniente de un linfocito T cooperador. Una vez activada, esta célula reconoce el 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 CD8 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. (Cooper modificado de: Arthur Weiss, 1989. T Lymphocyte activation. In: Fundamental Immunology, Second Edition, Paul, W.E. ed. Garth Press, N.Y. U.S.A. pp. 300.

Estos compuestos parece que llevan a cabo el "golpe final" 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 ocasionando la lisis y muerte de la célula (15). Se ha encontrado, sin embargo, que también puede llevarse a cabo la citotoxicidad en ausencia de los compuestos solubles secretados por el CTL (16). Se cree que el mecanismo que se lleva a cabo es una acetilina generada por un intercambio de señales a nivel de las receptoras de ambas membranas (17).

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 granulos citoplasmáticos que contienen a la perforina y otras enzimas lisosómicas (18). Estos resultados sugieren que los compuestos citotóxicos no son expulsados al medio externo, sino que son trasladados a través del contacto íntimo entre la membrana de los granulos citoplasmáticos con la membrana de la célula blanco, con lo que se asegura la unicelularidad de los compuestos letales hacia la célula infectada.

Independientemente del mecanismo que se efectúa, el CTL escapa de la lisis celular y entonces puede participar en una nueva interacción letal (18).

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 clones de memoria que confieren inmunidad celular para infecciones posteriores. Es que esto

que en el desarrollo de vacunas contra las bacterias intracelulares, se busquen antígenos que puedan establecer una inmunidad celular prolongada y que además carezcan de los riesgos de una reacción alérgica, como cuando se inyecta con la bacteria muerta o inactivada.

Vacunas actualmente en uso.

Existen dos vacunas contra la fiebre tifoidea. La elaborada a partir de bacterias inactivadas por acetona y la proveniente de bacterias inactivadas por calor (28). Estas vacunas tienen el inconveniente de causar una serie de reacciones secundarias como fiebre, malestar general o dolor local, debido a la presencia de lipopolisacárido, por lo que resultan imprácticas para su utilización amplia en salud pública (43).

Actualmente se encuentra disponible en el comercio una vacuna oral elaborada a base de bacterias atenuadas de *S. typhi* Trüta, deficiente en α -DOP-galactosa epimerasa (26). Los inconvenientes de esta vacuna son su alto costo de producción y la falta de una protección realmente efectiva y duradera en regiones donde la fiebre tifoidea es endémica (77).

Desarrollo de nuevas vacunas.

Han sido estudiados diversos antígenos de la superficie de *Salmonella typhi* como probables candidatos a vacunas contra la fiebre tifoidea. Entre ellos está el antígeno somático O₃ el cual induce títulos altos de anticuerpos tanto en animales de experimentación como en personas con fiebre tifoidea; sin embargo,

ellos no correlacionaron con un estado de inmunidad (34). De igual forma el antígeno flagelar B no es capaz de inducir inmunidad protectora (35).

Por otra parte, recientemente Robbins y Robbins desarrollaron una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir del antígeno H (8). Esta vacuna actualmente preparada por el Instituto Pasteur ha sido evaluada en estudios de campo en Nepal (9) y Africa del Sur (36). Los reportes preliminares de los estudios muestran una eficacia de 72 y 84% respectivamente. Una desventaja de esta vacuna es que como el polisacárido es un antígeno T-independiente, no genera respuesta inmune celular ni se desarrollan efectivamente células de memoria para inmunizaciones o retos posteriores (36).

Los antígenos proteínicos ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de mayor afinidad y favorecer una respuesta inmune celular (13,36). Esta, además de generar una inmunidad mas prolongada, es crucial en la defensa contra patógenos intracelulares, como S. typhi, Mycobacterium tuberculosis y Listeria monocytogenes entre otros (34).

Las porinas son proteínas de la membrana externa (PHE) de bacterias gram-negativas cuyo potencial como inmunógenos protectores se ha analizado en estudios previos. Así, se ha demostrado que la inmunización con PHE de Neisseria meningitidis y N. gonorrhoeae confiere protección contra la infección por la bacteria relevante (9,36).

Estudios subsiguientes han demostrado que la inmunización con FMC derivadas de otras bacterias gram-negativas, como Shigella (Flexner) (2) y Pseudomonas aeruginosa (21) también confieren protección contra la infección en animales experimentales. Por otro lado, las FMC obtenidas de una cepa rugosa de S. typhimurium confieren protección contra la infección por dicha bacteria en ratones (37). También el suero hiperinmune contra FMC obtenido en conejos, confiere protección pasiva contra S. typhimurium a ratones no inmunizados (38).

Recientemente también se han utilizado a las FMC de bacterias gram-negativas para conjugadas a polisacáridos y de este modo generar una vacuna que es capaz de generar inmunidad celular y dar respuestas aumentadas en subsiguientes inmunizaciones, como es en el caso de la prevención contra Haemophilus influenzae (42).

Empiezo de adyuvantes.

El advenimiento de nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas a partir de la síntesis química de péptidos predichos como moléculas de T o B (53), mediante el empleo de algoritmos específicos programados en computadores (48), ha generado la necesidad de potenciar las características antigénicas de estos productos mediante la conjugación química (50) o bien mediante la administración conjunta con adyuvantes (79).

De los adyuvantes desarrollados a la fecha, solo se permite la aplicación en humanos del Hidróxido de aluminio y de los liposomas, siendo el primero muy lejos de lo ideal (24).

Los liposomas son estructuras esféricas multicelulares que semejan una membrana celular. Esta característica les permite viajar a través de los tejidos, llevando en su interior principios activos que son vertidos al llegar a la célula blanco por un mecanismo de fusión de membranas (24). La composición anfipática de los liposomas permite, en principio, la incorporación de cualquier sustancia en solución, por lo que han sido ampliamente empleados como vehículos de transporte de sales en diversas áreas como la farmacología, cosmetología, sermasi, microfisiología e inmunología. En esta última disciplina se ha observado la participación de los liposomas como adyuvantes tanto de la rama humoral (3) como de la rama celular (62).

En base a estos antecedentes, se decidió comenzar un estudio acerca del papel que juegan las proteínas de S. typhi en la inducción de inmunidad, cuando estas se encuentran incorporadas a liposomas.

Y. MATERIALES Y METODOS

Equipo

1. Centrífuga Sorvall RC5C, Instrument Duder.
2. Espectrofotómetro Beckman DU - 7.
3. Sonificador Lab-Line.
4. Ultracentrífuga Beckman LB-4.
5. Sistema de electrodíalisis Lób.
6. Cámara de cultivo celular, Forma Scientific modelo 3157.
7. Contador semiautomático Mini-Rack II.
8. Contador Beckman LS 5801.
9. Incubador Shaker.
10. Cámara de flujo laminar.

Cepa bacteriana.

La cepa virulenta Salmonella typhi 9,12,110 se aisló originalmente de un paciente con fiebre tifoidea.

Ratones.

Inicialmente se obtuvieron ratones de la cepa abierta MR del National Institute of Health, y ratones similares CB781/6 de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine). Ambas cepas se han mantenido en el sistema del laboratorio de investigación del INH.

Cultivo de bacterias.

Las bacterias empleadas para la obtención de porinas se crecieron durante 8 h a 37°C a 250 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio sintético A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y

0.5% de glicosa. Posteriormente las bacterias se liocharon, en fase de crecimiento logaritmico, por centrifugación a 1000 g durante 10 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.

Aislamiento de porinas.

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Mikala (54). Las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logaritmico se ajustaron a una densidad optica de 1.0 a 800 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (L6000 Ultratip Labsonic apatex sonotator) en periodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad optica a 0.3. Despues de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 1000 g/10 min, la envoltura celular se solvó por ultracentrifugación a 100 000 g/30 min a 20°C, se solubiló en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado SDS al 2% y se incubó 30 min a 37°C; posteriormente se ultracentrifugó y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contenia peptidoglucasa, de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella solubilizadas con Tris—50 mM, pH 7.7 que contenia SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y β -mercapto etanol al 0.05%; despues de un periodo de incubación de 2 h a 37°C, se ultracentrifugó a 100 000 g/30 min a 25°C y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sepharyl 5-200 (60 cm x 2.8 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 ml/h. Se recuperó la fracción que fluyó inmediatamente despues del volumen vacío, detectada por absorción a 280 nm. Para reali-

luar la columna, se lavó con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel.

Determinación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas en las preparaciones de porinas purificadas, se realizó de acuerdo al método de Lowry (45) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co.).

Determinación de contaminación de porinas con LPS.

La cantidad de LPS contenido en las preparaciones de porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto-3-mencopirúvico (KDO) de acuerdo al método de Karkhanav (33), empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.).

Electroforesis de proteínas en gels de poliacrilamida con dodecilo sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de porinas se realizó según la técnica de Laemmli en una unidad electroforética para gels verticales en placa (LBB Instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos (39). El gel separador contenía 11.7 % de acrilamida, 2.5 % de bis-acrilamida, 0.19 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.12% de bis-acrilamida, 0.1 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125M pH 8.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2 %, β -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005 %.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 10 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1 % en 0.3. Posteriormente las telas se lavaron durante 1 h en una solución de agua de Desmasez P-250 al 0.25 % en metanol-agua (45:10:45). Se descoloraron empleando una solución de metanol-acido ascórbico-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fue transparente.

Obtención de liposomas e incorporación de porinas.

Se elaboraron liposomas a través de una modificación a la técnica descrita por Ches y Gajdos en 1961 (25). Se disolvieron 10 mg de fosfatidil colina (Sigma Col) y 7 mg de Colesterol (Sigma Col) en 2 ml de cloroformo. El solvente orgánico se evapora totalmente mediante el flujo de nitrógeno gaseoso. Posteriormente se adicionaron 3 ml de agua que contienen 2 mg de porinas de *S. Typhi* (9,12) obtenidas por el método de Rikalo. La solución se agitó suavemente y se dejó equilibrar durante 2 horas, para luego someterla en un baño de hielo a 100 % durante 1 minuto (Lab. de Ultratipo Lobsonic System Sonicator). Las porinas incorporadas a los liposomas se separaron de las porinas no incorporadas por ultracentrifugación (Beckman Inc) con gradientes de sacarosa (17%, 33% y 60%) en PBS, en un rotor de ángulo libre (SW65 Ti) a 25 000 rpm, durante 20 horas, a 22°C. Los liposomas se resuspendieron en la interfase de sacarosa al 33% y PBS; se resuspendieron en el mismo amortiguador y se conservaron a -4°C hasta su uso. Como testeo se elaboraron liposomas sin porinas.

Determinación de la dosis letal al 50% (DL₅₀).

Los cultivos bacterianos cosechados en la fase de crecimiento logarítmico se resuspendieron a una concentración de 10^8 bacterias/ml (0.5 de Abs. a 540 nm) a partir de esta suspensión y empleando un factor de dilución constante se prepararon las siguientes concentraciones:

	0.1 ppm	0.02, 0.01	
1	500	500	bacl./ml
2	500	500	bacl./ml
3	500	500	bacl./ml
4	500	500	bacl./ml
5	500	500	bacl./ml
6	500	500	bacl./ml

Se inocularon 0.5 ml de las bacterias resuspendidas en mucina (mucina gástrica de conejo al 3% en solución salina estéril) i.e. a grupos de 10 ratones HR de 10 a 20 g de peso. Como grupo testigo se emplearon ratones inoculados con 0.5 ml de mucina. La sobrevivencia se registró a los tres días después del parto. La DL₅₀ se determinó de acuerdo al método de Reed y Muench (10):

$$DL_{50} = \text{antilog} \log \text{ del } \%50 = DPC$$

log del $\%50$ = logaritmo de la dilución inmediata superior a la dilución que mata al 50% de la población.

DPC = distancia proporcional corregida.

DPC = (log factor de dilución)(DF)

DF = distancia proporcional.

$$DF = \frac{500 - \%50}{\%50 - \%0}$$

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

100% = dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

Obtención de esplenocitos de ratón.

Se inmunizaron ratones de la cepa C57Bl/6 (p.e. el día 0 con 30 μ g de porinas o liposomas de porinas, usando como antígeno ratones no inmunizados. El día 7 se sacrificaron por incisión cervical y se les extrae el bazo. Posteriormente se tumba el bazo en una solución estéril de Hank's y se procedió a centrifugar a 1000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y las células se resuspendieron en 1 ml de solución de cloruro de amonio 0.16 M para romper los eritrocitos; se agitó suavemente durante 5 minutos y se adicionaron otros 10 ml de Hank's (Sigma Co). La suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones y los esplenocitos se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI 1640 (Sigma Co) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). La viabilidad se determina empleando una solución de azul tripano y la suspensión se diluye con RPMI 1640 hasta tener una concentración de 2 millones de células/ml.

Estimulación de células linfoides por porinas.

Se aplicaron 100 μ l de la suspensión de esplenocitos en pares de placas de microtitulo de 96 pozos de fondo plano (Corning) y se agregaron 50 μ g/ml de antígeno (liposomas de porinas, liposomas sales o porinas) por triplicado, ajustando el volumen final del pozo a 200 μ l. Se incluyeron como testigo negativo células sin

ningún estímulo y como células viables en presencia de Concana-
lina A (Sigma Co.). Las células se cultivaron a 37°C a 5% de CO₂
en atmósfera húmeda durante cinco días. Dieciocho horas antes de
terminar el cultivo se agregó 1 µCi de timidina tritiada (HTO)
(Amersham) por vial. Las células se transfirieron a papel de fibra
de vidrio mediante un cosechador automatizado (Mini-Hatch III,
y la incorporación del material radioactivo se determinó en un
contador B (Beckman Inc).

Evaluación de la protección activa.

Para este ensayo, grupos de 10 ratones NIH (peso de 13-15 g)
se inmunizaron dos veces i.v. con diez días de intervalo entre
cada inmunización, con 5 a 30 µg de liposomas de porfirina o liposomas
solos, o con 10 µg de porfirina en PBS pH 7.4. Diez días des-
pués de la última inmunización, los ratones se retaron i.p. con 20
o 500 µg de *S. typhi* suspendida en 5% de mucina. Los grupos
control consistieron en 10 ratones a los que se les inyectó i.v.
0.5 ml de solución salina fisiológica, con 5% de mucina. Como
control se realizaron diluciones de las dosis de bacteria en
solución salina fisiológica y se determinó la cuenta viable en
agar nutritivo.

VI. RESULTADOS.

1.- Purificación de Píeinas.

La figura 3 muestra el perfil cromatográfico de exclusión molecular de las PNC de *S. typhi*. La fracción obtenida inmediatamente después del volumen de exclusión corresponde a las pínas, que en su forma nativa presentan un peso molecular aproximado de 120 kd. La concentración proteica en esta muestra fue determinada por el método de Lowry (45). En la contaminación con LPS resultó menor del 1%, determinado por el método de Kunitz (33).

2.- SDS-PAGE.

El corrimiento electroforético de las pínas de *Salmonella typhi* (figura 4) muestra dos proteínas con pesos moleculares alrededor de 36 a 41 kd.

3.- Determinación de la DL₅₀.

La DL₅₀ de *S. typhi* fue determinada por triplicado, y aplicando a los datos el tratamiento estadístico propuesto por Reed y Muench (46). Así, la DL₅₀ resultante fue de 20000 bacterias/ml.

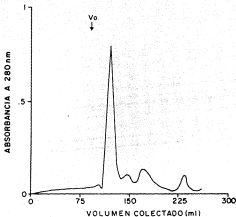


Figura 3. Cromatograma de porinas purificadas por el método de Møllekær (47). El primer pico corresponde a las porinas en su forma trimerica. Los otros picos hacen referencia a las otras H₂O. El símbolo V_0 indica el volumen vacío de la columna.

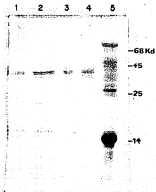


Figura 4. Corrimiento electroforético en condiciones reductoras de las perinas. En el carril 5 se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a: Albúmina bovina (68 Kd), Ovalbúmina (45 Kd), Anhidrasa carbónica (25 Kd) y Lisozima (14 Kd). Las perinas tienen un peso molecular aproximado entre 36 y 41 Kd (carriles 3 y 4). Las PHE se muestran en los carriles 1 y 2.

4.- Estimulación de esplenocitos de ratón C57BL/6.

La incorporación del material radiactivo a los esplenocitos se graficó en cuentas por minuto, para cada ratón, comparando los diversos antígenos que se utilizaron como control del experimento. De este modo el término CCL de las gráficas 5, 6 y 7 se refieren a los esplenocitos sin ningún estímulo, esto es, representan los fondos del experimento. El solo control que se mantuvo fue el de la estimulación con liposomas solos, obteniéndose valores menores al de las células sin antígeno.

En la gráfica de la figura 7 se muestran los datos del ratón testigo (no inoculado). La escala que se maneja en esta gráfica es la misma que en las dos anteriores, para facilitar la comparación de los datos.

Los valores más altos se obtuvieron para el caso del ratón inoculado con porinas incorporadas a liposomas y estimulado in situ con el mismo antígeno.

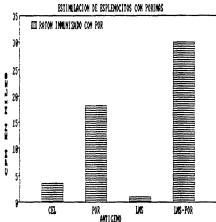


Figura 5. Gráfica de la estimulación de esplenocitos de ratón C57BL/6 inmunizado con 30 µg de porinas el día cero y sacrificado el día 7. CEL = control de células sin antígeno; POR = células estimuladas con porinas; LPS = células estimuladas con liposomas; LPS-POR = células estimuladas con liposomas-porinas.

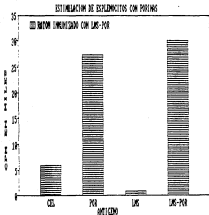


Figura 6. Grafica de la estimulación de esplenocitos de ratón C57BL/6 inmunizado con 20 μ g de liposomas de porinas el día cero y sacrificado el día 7. CEL = control de células en anti-germo; POR = células estimuladas con porinas; LPS = células estimuladas con liposomas; LPS-POR = células estimuladas con liposomas-porinas.

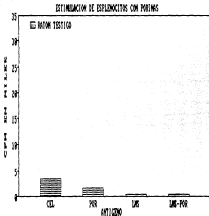


Figura 7. Grafica de la estimulación de esplenocitos de ratón testigo (no inmunizado). CEL = control de células con antígeno; POR = células estimuladas con painas; LPS = células estimuladas con liposomas; LPS-POR = células estimuladas con liposomas-painas.

5.- Ensayos de protección activa.

La mejor protección se obtuvo cuando se inmunizaron a las ratonas con porinas. Para el caso de los liposomas, el mejor resultado se obtuvo cuando se inmunizó con 5 μ g de antígeno (figura 8). Cuando la cantidad de proteína incorporada en liposomas fue mayor en el esquema de inmunización (20 μ g) la protección disminuyó considerablemente, tanto para el reto con 20 DL₅₀ (20%) como para el reto con 500 DL₅₀ (30%) (datos no mostrados en la gráfica).

Como control se retaron a ratonas testigo inmunizadas con 200 μ l de PBS o con diversas concentraciones de liposomas con las mismas dosis de bacteria. En todos los casos, el porcentaje de mortandad fue del 100 % (datos no mostrados en la gráfica).

Para verificar que la solución de vacuna no se encontraba contaminada, se inmunizaron l.p. a ratonas testigo. El porcentaje de sobrevivencia fue del 100 % (datos no mostrados).

PROTECCION ACTIVA CON LIPOSOMAS DE PEROMYS

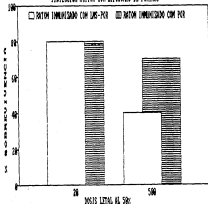


Figura 8. Gráfica del porcentaje de sobrevivencia a los 3 días de reto de grupos de ratones MH inmunizados los días 0 y 10 y retados el día 20 con 20 o 500 dosis letales medias de *Salmonella typhi* 9,17,102 en solución de mucina gástrica de cerdo. LMS-POR = ratones inmunizados con 0 µg de liposomas-porinas; POR = ratones inmunizados con 10 µg de primas.

VII. DISCUSION DE RESULTADOS.

El control epidemiológico de la fiebre tifoidea depende, entre otros aspectos, del mejoramiento de la infraestructura sanitaria, del saneamiento básico y del manejo adecuado de alimentos. Para esto es necesario no sólo mejorar el nivel económico de la población, sino también elevar su nivel de educación para la salud. Debido a la dificultad que implica el logro de estos objetivos y a pesar de sus imperfecciones técnicas, las vacunas constituyen siendo una alternativa en la lucha contra la fiebre tifoidea.

Salmonella typhi es un patógeno exclusivo del hombre (19). Para los ensayos de protección contra el resaca de la bacteria se empleó el modelo marino, un modelo que tiene el inconveniente de no ser el hospedero natural de la bacteria. Por esta razón, la suspensión de las bacterias para las dosis retales, se realizó en leche, una sustancia que retarda la acción tóxica de los macrófagos, lo que permite evaluar de forma más efectiva la acción de S. typhi en el ratón (20). Otro modelo que se ha empleado consiste en retar a los ratones con su patógeno natural S. typhi murium, responsable de la salmonelosis murina (20). Este modelo, sin embargo, tiene la desventaja de emplear una cepa diferente de salmonela.

Siendo la cepa abierta una de las más fáciles de producir y mantener bajo las condiciones de nuestro laboratorio y siendo necesaria una cavidad relativamente grande de ratones para los ensayos de

protección, se decidió emplearla para estos experimentos. Sin embargo, los ensayos inmunológicos con células implican modelos más finos y controlados, por lo que se hace indispensable el uso de cepas híbridas de ratones. Actualmente se sabe que el control de la fase temprana de la infección por salmonela en ratones híbridos depende no solamente del tipo de la dosis, sino también del alelo que poseen en su locus "iIy" en el cromosoma I, de tal manera que los ratones que son homocigotos para el alelo iIy^B son incapaces de prevenir la rápida multiplicación de la bacteria in vivo y sucumben a bajas dosis parenterales de cefo. En contraste, la multiplicación de la salmonela en el sistema fagocítico mononuclear de ratones homocigotos para el alelo iIy^F se encuentra restringida, requiriéndose mayor cantidad de dosis para producir los mismos efectos (26). Con base en estos antecedentes, se decidió emplear una cepa híbrida susceptible a la salmonela como C57BL/6 (H-2^b, iIy^B, LPK^B) para los ensayos de activación celular.

Las péptidas en su forma nativa constituyen trómeros de alto peso molecular, lo que facilita su purificación por cromatografía de exclusión molecular, ya que pueden ser detectadas en el primer pico al término del volumen vacío (figura 3). El corrimiento electroforético en condiciones reductoras permite la visualización de la purificación de las péptidas al observarse las bandas correspondientes a los monómeros, sin la interferencia de las otras PM_n (figura 4).

Hay que hacer mención de que la cantidad de permas incorporadas a los liposomas se tuvo que calcular en base a la diferencia de la concentración de proteínas, determinada por el método de Lowry, en las citras fracciones del gradiente de sacarosa, ya que se encontró que aunque los lípidos se adsorben a 200 nm como las proteínas, si contiene turbidez interferiendo por consiguiente con la determinación. De este modo se calculó que el procedimiento llevado a cabo tuvo una eficiencia del 90%. Resultados similares se han reportado para la incorporación de Lamb, una proteína de E. coli involucrada en la difusión pasiva de solutos (48).

En cuanto al comportamiento de los liposomas, se ha encontrado que es de especial interés los efectos de los fluidos biológicos con los que los liposomas entran primero en contacto, así como el tiempo en que son transportados y distribuidos del sitio de administración a los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear. En ambos casos, el comportamiento de los liposomas está determinado por sus características estructurales (24). El método con el que se elaboraran los liposomas favorece la incorporación de las moléculas en el interior de las compartimentas hidrofílicas de las vesículas de lípidos; sin embargo, parte de las proteínas también quedan adsorbidas sobre la superficie de los liposomas, con lo cual algunas moléculas de las permas permanecen expuestas (lo que permite un reconocimiento más rápido por parte de los anticuerpos), mientras que otras permanecen en el interior, para el mejor procesamiento del antígeno (49).

Para poder visualizar mejor la capacidad inmunoprotéica de los liposomas *in vitro* se graficaron de manera comparativa los índices de estimulación de las células del ratón inmunizado con portinas o con liposomas-portinas y estimuladas *in vitro* con el mismo antígeno. Estos índices se obtuvieron al dividir el promedio de cuentas por minuto del ratón inmune, entre las cuentas por minuto del ratón testigo (Figura 4). Como puede observarse en esta gráfica el índice de estimulación correspondiente a los liposomas-portinas es tres veces más grande que el de las portinas solas. Es probable que al inmunizar con los liposomas-portinas (p. las células encargadas de procesar el antígeno (macrófagos), sean las primeras que entran en contacto con los liposomas, los cuales contienen varias portinas en su interior, de modo tal que se pueden presentar grandes cantidades de portinas procesadas a las células inmunocompetentes, y que a esto se deba la alta activación celular. Por otra parte, la captura de los liposomas por estas células fagocíticas y otras que normalmente no interactúan con el antígeno *in vivo* se ve favorecida por la presencia de ligandos específicos (como anticuerpos y ciertas glicoproteínas y glicolípidos) en la membrana de los liposomas (24). Independientemente de si la captura es mediada o no a través de opsoninas u otros ligandos, ocurre la endocitosis de los liposomas, aunque también puede estar involucrado un proceso de fusión de membranas, con lo que las portinas contenidas en los liposomas se liberarían al interior del citoplasma, donde serían procesadas en el interior de vesículas ácidas para liberar péptidos capaces de unirse a moléculas de clase II del MHC y ser presentadas a las células T CD4⁺ (27).

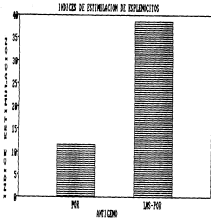


Figura 9. Grafico comparativo de los indices de estimulación de esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados el día 0 con 30 µg de perlas (PGE) o con 30 µg de liposomas-perlas (LMS-PGE) y estimados *in vivo* con el mismo antígeno el día 7.

De este modo, los linfocitos T cooperadores activados por los liposomas de porinas procesadas, en asociación con el MAC II en la superficie del macrófago serían capaces de liberar linfocitos que fueran capaces de activar tanto a las CTL para que llevaran a cabo la citotoxicidad de las células infectadas, como a los linfocitos B para que estos pasaran a formar células plasmáticas productoras de anticuerpos (Figura 10).

Anteriormente la activación de las células CD4⁺ por antígenos bacterianos se consideraba como incompatible con el sistema de que la fagocitosis sola permitía el procesamiento en el contexto de moléculas de clase II, sin embargo, se ha encontrado que muchos patógenos intracelulares son transportados de los compartimientos endosomales hacia los citoplasmáticos, donde pueden ganar el acceso a moléculas de clase II y ser presentadas en el contexto de estas a los CTL (34). De esta forma, la citotoxicidad podría llevarse a cabo de una manera más directa.

Por otra parte, se podría explicar la detención de la bacteremia por el hecho de que los linfocitos B de memoria reconocieran a las porinas en su forma nativa, caso en el que en la superficie de la membrana de S. typhi, dada la similitud con la estructura de las liposomas y que de esta forma, con la participación de los factores solubles secretados por los linfocitos cooperadores, se produce una respuesta rápida de secreción de anticuerpos.

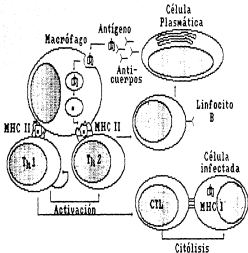


Figura 30. Activación antigénica-específica de los linfocitos. El macrófago toma al antígeno observado con anticuerpos preformados y lo fagocita para presentarlo en asociación a moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) a los linfocitos T cooperadores (T_H); estos son activados por la IL-1 del macrófago para liberar las otras interleucinas. La IL-2 activa al linfocito T citotóxico (CTL) para que elimine la citólisis de las células infectadas, mientras que las IL-4, 5 y 6 activan al linfocito B para que madure a célula plasmática productora de anticuerpos. (Modificado de Male, G. 1986. The immune response. En: Immunology. An illustrated outline. Huxley, D. ed. H. Mosby/Gower. Londres, U.K. pg. 40).

Recientemente se ha descrito una linfona poblada de linfocitos T que en su mayoría es CD4⁺ y CD8⁻ que se caracteriza por presentar un TCR con cadenas gamma/delta, en lugar de las tradicionales alfa/beta. Estudios con *Mycobacterium tuberculosis* han demostrado su participación en la respuesta inmune que se monta contra la bacteria (34). Es probable entonces, que en la infección por *S. typhi* los linfocitos T gamma/delta también intervengan en la fase efectiva de la.

Actualmente se sabe que la infección con la bacteria o la interacción con las células celulares, no confiere una protección del 100 % (43). Sin embargo, ensayos con las proteínas solubles parecen conferir mayor protección en el modelo murino (30,38). Asimismo, se ha demostrado que las vías de procesamiento de un mismo antígeno, en el contexto del MHC pueden variar dependiendo de las características que rodean a este (62,70). De esta forma, se puede formular una hipótesis que explique los resultados obtenidos en la presente tesis: cuando las proteínas se encuentran asociadas a membranas lipídicas, ya sea en liposomas o en la membrana externa de la bacteria, su procesamiento por los macrófagos murinos y presentación a las células inmunocompetentes, activaría preferentemente a los T_H. Con la cual se puede obtener una alta producción celular de citoquinas que se correlacionará con un estado de protección. Por otra parte, las proteínas solubles serían capaces de activar en el contexto de MHC I a los CTL, de modo tal que la respuesta inmune celular podría actuar efectivamente en los mecanismos de defensa contra la bacteria. Esta hipótesis puede ser evaluada mediante otros experimentos, donde se determinen los

factores solubles secretados por las células invasoras. En los
 los mecanismos de presentación de los péptidos solubles o incorpo-
 rados a membranas lipídicas.

Finalmente hay que mencionar que aunque algunos vacunos ya han
 han desarrollado y mostrado su eficacia en el control y erradica-
 ción de paratuberculosis como la vacuna, no es factible esperar
 resultados espectaculares en un futuro cercano en la elaboración
 de otras vacunas (7,38). Para lograr productos que generen inmu-
 nidad efectiva, será necesario comprender con profundidad los meca-
 nismos patogénicos, es como la naturaleza de la respuesta inmune
 que se monta en contra de los microorganismos responsables de las
 enfermedades.

VIII. CONCLUSIONES.

1. El método de Miesco permite purificar las porinas de las células procariotas de membrana exterior con solo una contaminación del 0.1% de endotoxina.

2. Al incorporar las porinas a membranas lipídicas, estas son capaces de estimular en vitro macrófagos de ratón empujados con el mismo antígeno o solo con las porinas.

3. Las porinas de *Salmonella typhi* V,12,VIII incorporadas liposomales, confieren inmunidad activa en ratones contra el patógeno de la bacteria parental en ausencia de cualquier agente de carga.

IX. APENDICE 1.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

- Medio mineral de sales "A".

Fosfato de calcio dibásico (Baker)	7.0 g/l
Fosfato de calcio monobásico (Baker)	3.0 g/l
Cloruro de sodio (Baker)	0.5 g/l
Sulfato de amonio (Baker)	1.0 g/l
Sulfato de magnesio (Baker)	0.1 g/l

El medio se esteriliza a 15 lb de presión, 15 minutos, a 120 °C. Posteriormente se agregaron 20 ml de nicotina al 1% (Hercol), 20 ml de leucina (Sigma) y 20 ml de extracto de levadura al 2% (Difco), componentes que previamente habían sido esterilizados a 20 lb de presión, 30 minutos.

- Agar nutritivo.

extracto de carne (Difco)	3.00 g
pectina (Ciba)	5.00 g
agar (Difco)	15.0 g
agua destilada cdb	1.00 lb

Disolver calentando y esterilizar a 15 lb de presión, 15 minutos.

- Amortiguador de Fosfatos - Salvo pH 7.4

cloruro de sodio (Hercol)	0.10 g
Fosfato mono de potasio (Baker)	2.70 g
Fosfato dibásico de sodio (Baker)	0.40 g
agua destilada	1000 ml

- Tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, SLS 0.2%

tris (Sigma)	6.05 g/l
EDTA (Sigma)	1.06 g/l
SLS (Sigma)	2.00 g/l

- Acrilamida

acrilamida (Biorad)	10.0 g
N - N - bismetileno acrilamida (Biorad)	0.80 g

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

- Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris (Sigma)	18.15 g
--------------	---------

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

- Amortiguador Tris-HCl 0.3 M pH 6.8

Tris (Sigma)	6.00	g
Agujar el pH con HCl 2 M y ajustar a 6.8		
destilada a 100 ml.		

- Amortiguador de muraina.

Tris-HCl pH 6.8	75.0	ml
SDS al 10 %	2.00	ml
agua de bromocresol al 1 % (Sigma)	0.10	ml
glicerol (Merk)	10.0	ml
β -mercaptoetanol (Sigma)	0.00	ml

- Amortiguador de concentración electrolítica

Tris (Sigma)	3.00	g
glicina (Sigma)	14.4	g
SDS (Sigma)	1.00	g

Ajustar a 1000 ml con agua destilada y desionada.

- Solución reactiva de Coomassie

metanol al 50 % (Merck)	454.0	ml
ácido acético (Merk)	46.00	ml
anal. de Coomassie (Sigma)	0.20	g

Agitar durante 1 hora y filtrar en papel Whatman 41.

- Solución desionante para anal. de Coomassie.

metanol (Merck)	50.0	ml
ácido acético (Merk)	25.0	ml
agua destilada	975.0	ml

- L-Glutamina 2 mM

L-glutamina	0.292	g
RBS pH 7.4	10.0	ml

- β -Mercaptoetanol 5×10^{-5} M

β -mercaptoetanol (Merck)	35.0	μ l
solución salina isotónica	10.0	ml

- Gentamicina 10 μ g/ml

gentamicina (Merck)	10.0	μ g
agua destilada	1.00	ml

- Medio de cultivo celular (RPM)

RPM 1640	90.0	ml
----------	------	----

Buena Fecal bovina	10.0	ml
L-Glutamina 2 mM	1.00	ml
Penicilina	100	u/ml
Streptomina 10 ug/ml	10.0	ul
β -Mercaptoetanol $5 \times 10^{-5}M$	0.10	ml

Microrreactor en condiciones estériles y mantener a una temperatura de - 4°C. Cuando se emplea el método, se incubó a 37°C para no matar a las células.

- Cloruro de amonio

cloruro de amonio 0.1M	10.0	ml
tris-HCl 0.17 M pH 7.45	10.0	ml

- Concentratina A

concentratina A	10.0	ug
agua destilada	1.00	ml

- Azul tripuro al 0.2%

azul tripuro	0.20	g
agua destilada	100	ml

- hepes 10 mM

hepes	1.00	g
agua destilada	1.00	ml

- Solucion de mucina

mucina bovina de origen (Sigma Co.)	1.00	g
cloruro de sodio	0.85	g
agua destilada	100	ml

La solución de mucina se pasteuriza a 100°C de presión durante 10 minutos.

- Determinación de proteínas.

0.10 a) Solución patrón de proteínas: Albumina sérica bovina al

- b) Carbonato de sodio al 2% (solución alcalina).
 c) Tartrato de sosa y potasio al 2%.
 d) Sulfato de cobre pentahidratado al 1%.
 e) Reactivo de Folin-Ciocalteu.

- Determinación de LPS.

- a) Solución patrón: 100 t mg/ml.
 b) Acido sulfúrico 9.2 N.
 c) Acido peroxídico 0.04 N.
 d) Arsénico de sosa al 0.6%.
 e) Dimetil sulfóxido.

E. ANEXOS - II.

GLOSARIO DE ACRONIMOS Y TERMINOS EMPLEADOS.

Los términos se describen dentro del contexto de la tesis. Algunos de ellos precisan otras actividades pero no se incluyen.

Adyuvante. Cualquier sustancia o mezcla de sustancias, que potencia la respuesta inmune hacia el antígeno con el que se administra.

AMPs. Monofosfato de adenosa cíclico. Sustancia que interviene en la estimulación de las neuronas para producir fibrina, cuando el macrófago es estimulado por el LPS.

Antígeno H. Antígeno flagelar de las bacterias gram-negativas. Se llama así debido a que presenta el antígeno H denominado "d", que interviene como factor de virulencia.

Antígeno O. Antígeno somático de las bacterias gram-negativas que se encuentra en el tercio final del LPS. El tipo de bacterias que presentan los antígenos O y H que corresponden al polisorbato constituido por unidades de lipopolisacáridos y polisacáridos.

Antígeno Y. Antígeno capsular de ciertas bacterias gram-negativas. Es un antígeno formado de ácido 2-6-acetil-3-oxo este lacturónico. Es factor de virulencia de las bacterias y siempre se encuentra en la β tipo aislada de polisorbato con fibrina fibrada. La determinación de anticuerpos anti-Y pueden ayudar a la detección de los portadores asintomáticos.

APC. Células presentadoras de antígeno. Se caracterizan por expresar en su membrana moléculas clase I y II del MHC. Este grupo incluye a las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, mastocitos, células dendríticas, células de Kupfer, células H, células alveolares, células de Langhans, etc.), a las linfocitos B y bajo ciertas circunstancias a los linfocitos T.

APS. Resultado de amino. Actúa como catalizador de la polimerización de la α -glucosilasa en la elaboración de geles para electrodialisis.

B. Linfocitos B. Células de origen linfático provenientes de la médula ósea que se caracterizan por presentar moléculas de anticuerpo en su superficie. Pueden madurar a células plasmáticas por la acción de la IL-4, IL-5 y IL-6.

Betulina. Proteína catiónica del suero que puede ser liberada por plaquetas. Actúa como agente bactericida para la mayoría de las bacterias gram-positivas.

CSb. Proteína del complemento que puede opsonizar cualquier superficie por la que tenga afinidad, activando de esta manera la vía alterna del complemento.

CD4. Proteína del complemento que actúa como agente quimio-atractivo de neutrófilos y macrófagos. Favorece la contracción del músculo liso, la permeabilidad celular y la desgranulación de los mastocitos.

CD9. Proteína del complemento que actúa en la fase final de lisis, al polimerizar sobre la superficie de la célula blanco.

CD2. Marcador de células T. Interviene en la adhesión celular pues pertenece al LFA-3 en la célula coherente.

CD3. Complejo molecular de 3 cadenas que se encuentra asociado al TCR.

CD4. Marcador en células T cooperadoras. Con el TCR interviene en el reconocimiento del antígeno en el contexto de MHC II.

CD8. Marcador de células T citotóxicas. Con el TCR interviene en el reconocimiento del antígeno en el contexto de MHC I.

Células plasmáticas. Son células productoras de anticuerpos, que provienen de la activación de linfocitos B por el antígeno y los factores solubles de los T_H .

Con A. Concanavalina A. Lectina derivada del Trébol que actúa como mitógeno de células T.

CTL. Linfocitos T citotóxicos. Expresan el marcador CD8 pero no el CD4. Intervienen en la lisis de células infectadas por virus o bacterias, así como en el rechazo de tejidos. Pueden producir IFN- γ e IL-2.

Defensinas. Proteínas líticas que se encuentran en los gránulos de los neutrófilos y que intervienen en la eliminación de ciertas bacterias intracelulares.

DL50. Dosis letal media. En el contexto de este trabajo, representa al número de bacterias (S. typhi) suspendidas en solución gástrica de cerdo, calculadas por el método de Reed y Muench, necesarias para matar al 50% de los ratones cuando se les administra ip.

DTA. Sal sódica del ácido délico diácido tetraacético. Agente quelante que favorece la separación de las proteínas de la peptidoglicano de la bacteria.

Epitopos. Regiones específicas del antígeno hacia las cuales se dirige la respuesta inmune. También conocidos como determinantes antigénicos.

Esplenocitos. Nombre que se le da al conjunto de células que se encuentran en el bazo. Constituidos principalmente por linfocitos T, linfocitos B y macrófagos.

Fc. Fracción cristalizante de las inmunoglobulinas. Su reconocimiento a nivel de receptores de membranas favorece la fagocitosis (opsonización).

Golpe letal. Se refiere a la fase final de la lisis de una célula blanco por una célula efectora (CTL, NK, T, CD4, TCR gamma/delta, etc.).

HTAg. Proteína inducida, multivalente marcada que se incorpora como base estructurada para la síntesis de DNA durante la división celular.

Hela. Línea celular proveniente del epitelio del carcinoma de cerviz humano. Únicamente marcadas por lo que se emplea en estudios de infección e invasión por bacterias intracelulares.

MEPEB. Sol soluble del ácido 4-(2-hidroxipentil)-1-piperazino-etanolamínico. Se emplea para seleccionar amorfoblastos que son compatibles con sistemas celulares *in vitro*.

Ip. Intraperitonealmente. Hace mención de que se emplea esta vía para la inoculación del biológico o reactivo.

ICAM (CD54). Molécula intercelular de adhesión. Interviene en las funciones de adhesión celular, a través del reconocimiento del LFA-1 (CD11a/18) en la célula huésped.

IPB-m. Interferón gamma. Hormona producida por los T_{H1} y CTL. Estimula al macrófago para que exprese mayor cantidad de MHC II y para favorecer la destrucción de la bacteria intracelular. También interviene como agente antiviral.

Ig. Inmunoglobulina. Glicoproteína globular que reconoce al antígeno y se aglutina (anticoagula). Existen cinco clases: G, A, M, D y E. A su vez, se presentan ciertas subclases.

IL-1. Interleucina 1. Hormona producida por los macrófagos, responsable de activar a los linfocitos T para que produzcan IL-2 y al momento para que se produzca la fiebre.

IL-2. Interleucina 2. Hormona producida en su mayoría por los T_{H1}. Actúa como factor de proliferación de células T. Interviene en la estimulación de células B para su maduración en células plasmáticas. Potencia la actividad de las células efectoras.

IL-3. Interleucina 3. Hormona producida por ambas poblaciones de linfocitos T cooperadores. Actúa como hormona hematopoyética en la médula ósea.

IL-4. Interleucina 4. Hormona producida por los T_{H2} y los mastocitos. Interviene en la activación de linfocitos B para que estos proliferen y posteriormente maduren. Interviene en la activación del macrófago, para que elimine a la bacteria intracelular. Incrementa la expresión de MHC II y receptores Fc para la lisis en

los linfocitos B activados. Favorece la expresión de su propio receptor en linfocitos T y B. Participa en la maduración de los linfocitos marinos.

IL-5. Interleucina 5. Hormona producida por los T_H2 . Favorece la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas. Induce la producción de IgM.

IL-6. Interleucina 6. Hormona producida por las T_H1 . Favorece la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas. Interviene en la activación del macrófago, para que elimine a la bacteria intracelular.

IL-7. Interleucina 7. Hormona producida por células estromales de médula ósea. Induce la proliferación de linfocitos y linfocitos T maduros.

IL-8. Interleucina 8. Hormona producida por linfocitos T activados y macrófagos. Actúa como factor quimioatrayente de neutrófilos e inhibe la adhesión de estos al endotelio.

Ity. Locus del sistema del ratón que se encuentra en el cromosoma 1. Determina la susceptibilidad (o a resistencia) de las diferentes cepas sintéticas a *S. typhimurium* en la fase temprana de la infección por esta bacteria.

M. Alotilones. Unidad que se emplea como parámetro de peso molecular en las macromoléculas. Un dalton es el equivalente al peso molecular de un átomo de hidrógeno.

OD₆₀₀. Ácido 2-(1- α -D-manosuctuonico. Constituye parte del núcleo del LPS. Su determinación permite cuantificar la contaminación de productos bacterianos con endotoxina.

Lactoferrina. Proteína que se encuentra en los gránulos de los neutrófilos. Su función es la de capturar al hierro para privar de este elemento esencial a las bacterias.

LFA-1 (CD11a/18). Antígeno funcional de leucocitos 1. Interviene en la adhesión celular a través del reconocimiento de ICAM en la célula opuesta.

LFA-3 (CD58). Antígeno funcional de leucocitos 3. Interviene en la adhesión celular a través del reconocimiento de CD2 en la célula opuesta.

Linfocinas. Son hormonas producidas por linfocitos. Incluyen la mayoría de las interleucinas, el IFN- γ y el TNF- α .

Liposomas. Estructuras esféricas multilaminares constituidas por lípidos anfipáticos en medios acuosos, que pueden contener en su interior tanto moléculas hidrofílicas, como lipofílicas.

Lisozima. Proteína catiónica que se encuentra en la mayoría de las secreciones y que se origina en los lisosomas. Actúa como agente bactericida de bacterias gram-positivas, al interferir el enlace entre la N-acetilglucosamina con el ácido N-acetil murámico en la peptidoglicano de la bacteria.

LPS. Lipopolisacárido. Constituye la endotoxina de las bacterias gram-negativas. Tiene diversos efectos biológicos incluyendo la inducción de fiebre, hipertensión arterial, cambios en la sueta leucocitaria, estimulación adicional de linfocitos B, etc. Esta constituye por tres fracciones; el lípido A (que es responsable de los efectos biológicos), el núcleo y el polisacárido (que le da la especificidad a la bacteria). En los ratones existe un locus que codifica para la respuesta mitogénica de los linfocitos B al LPS; los ratones homocigotos para el alelo "0" no responden, mientras que los heterocigotos u homocigotos para el alelo "n" responden de manera normal.

MAC. Complejo de ataque a la membrana. Se encuentra constituido por los componentes C5b, C6, C7, C8 y C9 polimérica que atraviesa la membrana de la célula blanco, con lo que el cambio de presión osmótica produce la lisis celular.

MDCC. Línea celular proveniente del epitelio de riñón de perro. Constituye modelos por lo que se emplea en estudios de infección e invasión por bacterias intracelulares.

MHC. Complejo principal de histocompatibilidad. En el humano se denomina HLA y en el ratón H-2.

MHC I. Moléculas de histocompatibilidad clase I. Son codificadas por los locus H-2B y H-2D en el ratón, y por los locus HLA-B, C y A en el humano. Son expresadas por casi todas las células nucleadas, caracterizan los antígenos responsables del rechazo de tejidos en los trasplantes, y son reconocidas por el CD8 de los CTL.

MHC II. Moléculas de histocompatibilidad clase II. Son codificadas por los locus H-2I-A e I-E en el ratón y por los locus HLA-Dp, Dq y Dr en el humano. Son expresadas solamente por las APC. Son reconocidas por el CD4 de las células cooperadoras.

Mieloperoxidasa. Enzima que se encuentra en los gránulos azurófilos de los leucocitos. Cataliza la peroxidación de los microorganismos intracelulares.

Monocinas. Químicas producidas por los macrófagos y monocitos. Incluyen a la IL-1 y 6, al IFN- α y β y al TNF- α .

Noradrenalina. Neurotransmisor α -adrenérgico que actúa a nivel de hipotálamo incrementando la producción de AMPc, responsable a su vez, del aumento de la temperatura corporal por la acción de la IL-1.

Opsonización. Proceso por el cual se favorece la fagocitosis de un antígeno. (a menudo por células que se unen a la superficie del antígeno (oposinas) como anticuerpos y ciertas componentes del complemento).

PBS. Amortiguador de fosfatos-salina. Sus soluciones son compatibles con sistemas celulares in vitro.

Peptidoglicano. Polímero complejo que se encuentra en la pared celular de las bacterias. En ella se encuentran insertadas las PNC y el LPG. Esta constituida por una columna compuesta por N-acetil glucosamina alternando con el ácido N-acetil murámico un conjunto de cadenas laterales tetraacépticas idénticas y un conjunto de puentes peptídicos transversos idénticos.

Periferina. Polímero proteínico de características semejantes al CP polimérico. Interviene en la lisis específica por las células efectoras.

PNC. Proteínas de membrana externa. En las bacterias gram-negativas suelen dividirse en mayores o principales y menores. Las portan pertenecen al primer grupo.

Porinas. Son proteínas triméricas de aproximadamente 70 kD, que se encuentran en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Su expresión depende de las condiciones osmóticas del medio en que crece la bacteria. Intervienen en la difusión pasiva de ciertas solutas.

Prostaglandinas. Son metabolitos del ciclooxigenasa del ácido araquidónico que intervienen en los fenómenos de inflamación. Facilita la contracción del músculo liso y la permeabilidad celular. Intervienen en la producción de fiebre por la acción de la IL-1.

SDS-PAGE. Geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Se emplea para el corrimiento de geles de electroforesis.

TCR alfa/beta. Receptor de células T con cadenas alfa y beta. Responsable de reconocer el antígeno procesado en el contexto del MHC en la APC.

TCR gamma/delta. Receptor de células T con cadenas gamma y delta. En su mayoría esta población carece de los marcadores CD4 y CD8.

TEM8. N,N,N',N'-tetrametil etilén diamino. Junto con el APS actúa como catalizador de la polimerización de la acrilamida en la elaboración de geles de electroforesis.

T_H1. Células cooperadoras murinas pertenecientes a la población 1. Reconocen el antígeno en el contexto de MHC II. Producen IL-2 y 3, IFN- γ y TNF- β . Están involucradas en las reacciones de hipersensibilidad tardía.

T_H2. Células cooperadoras, mismas pertenecientes a la población 7. Reaccionan al antígeno en el contexto de MHC II. Producen IL-3, 4, 5 y 6. Sus linfocinas intervienen en la activación de las linfocitas B para que proliferen y maduren a células plasmáticas.

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa. Hormona producida por el macrófago también conocida como cachectina. Interviene en la estimulación de macrófagos eficientes para que eliminen a la bacteria intracelular. Esta involucrada en la lista de células tumorales.

TNF- β . Factor de necrosis tumoral beta. Hormona producida por el T_H1 también conocida como linfocina. Esta involucrada en la lista de células tumorales.

Tiro. Tri-iodo-L-tiro-sina metano. Sus soluciones acuoso-alcoholes son muy estables a cambios de pH, pero son incompatibles con sistemas celulares in vitro.

Volumen vacío. Es el volumen en ml de etuyente recolectado, necesario para recorrer la columna de cromatografía. Se determina por el corrimiento de un compuesto colorido de alto peso molecular como el azul de metileno.

II. BIBLIOGRAFIA.

1. Acharya, D.L., Lowe, C.L., Thapa, M., Gurubacharya, Y.L., Shrestha, H.R., Basit, D., Cades, M., Schull, G., Armand, J., Gupta, D.R., Trollfors, B., Cramton, T., Schwenken, B. & Robbins, J.B. 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the *V. capsulae* polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. *J. Trop. Med.* 317:109-1104.
2. Adams, G., Malory, D., Witekowska & Pamanowska, T. 1980. Protection against *Escherichia coli* infection induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. infect. immun. 25:837-852.
3. Allison, A. & Groves, G. 1974. Lysosomes as immunological adjuvants. *Nature* 252:292.
4. Bangham, A.O. 1978. Properties and uses of lipid vesicles: an overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 300:3-7.
5. Bell, S.J. 1984. Cell adhesion. Competition between non-specific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* 46:1001-1008.
6. Berke, G. 1980. Functions and mechanisms of lymphocytes induced by cytotoxic T lymphocytes and Natural Killer cells. In: Fundamental Immunology, second edition, Paul, W.E. ed. New York, U.S.A. pp. 729-768.
7. Bloom, B.R. 1989. vaccines for the Third World. *Nature* 342:105.
8. Brubaker, R.B. 1985. Mechanisms of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:21-56.
9. Buchanan, T., Pearce, W., Scholnick, G. & Arts, R. 1977. Protection against infection with *S. gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pill. *J. Infect. Dis.* 136:132-137.
10. Carter, P. & Collins, F. 1974. The role of enteric infection in normal man. *J. Trop. Med.* 33:109-120.
11. Cheung, R.W., Colon, S.H. & Gray, H.H. 1982. Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumor and macrophages. *J. Immunol.* 129:2262-2268.
12. Collins, F.M. 1969. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice pretreated with living or espil alcohol-killed vaccines. *J. Bacteriol.* 97:667-676.
13. Eisen, H.H. & Siskind, G.W. 1969. Variations in affinity of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 8: 998-1006.

14. Fells, A. y Pitt, E.H. 1958. The pathogenic and immunogenic activities of Salmonella typhi in relation to its antigenic constituents. J. Hyg. 48:77-110.
15. Parlane, J. y Allison, A.C. 1974. Observations on the mechanism by which T lymphocytes exert cytotoxic effects. Nature 250:673-675.
16. Fields, P.J., Grolman, C.A. y Neffron, F. 1969. A Salmonella locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. Science 74:1059-1062.
17. Finlay, B.B., Sumner, R. y Falow, S. 1988. Penetration of Salmonella through a polarized madib-darby canine kidney epithelial cell monolayer. J. Cell Biol. 101:221-230.
18. Finlay, B.B. y Falow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev. 210-230.
19. Gaines, G., Sorini, A. y Tolly, J. 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of Salmonella typhi in chinchilla tissue following oral challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological responses. J. Infect. Dis. 118:293-308.
20. Germann, R. y Furer, E. 1975. Isolation and characterization of S. typhi gal E mutant Ty 25a: A candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131:553-558.
21. Gilliland, M.C., Parker, H.G., Matthews, J.W. y Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein f (porin) preparation of Escherichia coli as a protective vaccine in mice. Infect. Immun. 44:49-54.
22. Golstein, P. 1987. Cytolytic T cell mediated. Nature 327:6.
23. Golstein, P., Svedner, L.A.J. y Wigzell, H. 1977. Cell mediated specific in vitro cytotoxicity. I. Detection of receptor-bearing lymphocytes. J. Exp. Med. 134:1385-1402.
24. Gregoriadis, E. 1980. Immunological adjuvants: A role for liposomes. Immunol. Today 1:169-177.
25. Greenwith, P., Gao, B., Madack, E.F. y Hengartner, H. 1987. Cellular localization of perforin 1 in murine cloned cytotoxic lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes. J. Immunol. 138: 2749-2752.
26. Greenby, H.J., Maday, R., Wong, H., Das, S.P., Bluestone, J.A., Schatz, 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.

27. Harding, G.V. y Unanue, J.R. 1988. Antigen processing and intracellular Ia. Possible roles of endocytosis and protein synthesis in Ia function. *J. Immunol.* 142:12-19.
28. Hobbs, B.C. 1961. Public health significance of Salmonella carriers in livestock and birds. *J. Appl. Bacteriol.* 24:346-352.
29. Hornes, S.G., Dupont, H.L., Dawkins, A.T., Snyder, H.J. y Woodward, T.E. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. *Symposia Series in Immunobiological Standardization.* 15:143-150.
30. Isibasi, A., Drilo, V., Vargas, H., Parlagas, J., Gonzalez, C., Moreno, J. y Kumate, J. 1988. Protection against Salmonella typhi infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from Salmonella typhi 9.12d.9. *Infect. Immun.* 56:2953-2958.
31. Janda, S.M., Richardson, L.A. y Uhlen, D. 1981. The invasion of HeLa cells by Salmonella typhimurium: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *J. Gen. Microbiol.* 127:251-260.
32. Jordan, M.S. 1989. Impediments to the development of additional vaccines: vaccines against important diseases that will not be available in the next decade. *Rev. Infect. Dis.* 11 (supp 3): 803-812.
33. Karthaus, F., Zeffner, J., Jackson, J. y Davis, B. 1978. A new improved microassay to determine 2-ceto-3-deoxy octonate in lipopolysaccharide in gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85:595-601.
34. Kaufmann, S.H.C., Hess, H.C., Kaga, T., Steinhilf, W., Wand-Hurtlebenger, A., Gattili, A.J., Fleisch, I. y Schrott, B. 1989. Effector T cells in bacterial infections. En: *Progress in Immunology III. Proceedings of the 7th International Congress of Immunology.* Hershara, F. et al eds. Springer-Verlag, WFA, pp. 963-970.
35. Kuzman, K.P., Koorhof, H.J., Silbertsson, S.T., Robbins, J.B., Schreier, R., Schulz, D., Cedes, M., Armand, J. and the Vaccination Advisory Committee. 1987. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 11: 1155-1159.
36. Kumate, J. 1970. Inmunidad, infección y vacunas. 2a edición, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, p. 327-347.
37. Kuzsi, B., Nurmink, M., Saras, H. y Mäkelä, P.M. 1985. Immunization with major outer membrane protein spore preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 54:328-332.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

38. Rossi, R., Nurminen, M., Saven, R., & Hattivallonen, 1979. Outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25:857-862.
39. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
40. Lanfaverchia, A. 1985. Antigen-specific interaction between B and T cells. *Nature* 314:537-539.
41. Lanzavecchia, A., Kobayashi, E., Gregory, T., Bernini, F., & Abrignani, S. 1985. T cells can present antigens such as HIV gp24 targeted to their own surface molecules. *Nature* 314:530-532.
42. Lepp, J.A., Granoff, P.D., & Granoff, D.M. 1987. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-Malassezia megaloides outer membrane protein conjugate vaccine in 2- to 6-month-old infants. *Pediatrics* 80:283-287.
43. Levine, M.M., Ferruccio, C., Black, E. R., Tacket, D. C., Gorbenter, R. and Chilean Typhoid Committee. 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.*, 9: (Suppl 3) 552-567.
44. Liu, S.L., Cook, T., Hara, H., Matsui, E., & Yabuuchi, E. 1985. Infectivity as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect. Immun.* 53:1947-1973.
45. Loery, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
46. Luckas, M., & Woods, H. 1980. Specificity of diffusion channels produced by lambda phage receptor protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1667-1671.
47. Häkkinen, R.J., Rov, H., Saven, R., Valtonen, M., & Salonen, V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. *Immunol. Lett.* 19:217-222.
48. Margalit, H., Sussan, J.L., Cornille, J.J., Geese, R.B., DeLisi, C., & Berzofsky, J.A. 1985. Prediction of immunodominant helper T cell antigen sites from the primary sequence. *J. Immunol.* 135:2213-2229.
49. Mitchison, N.A. 1989. Ia genes in the mouse. In: Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7th International Congress of Immunology. Melnick, J. et al eds. Springer-Verlag, NYA pp. 845-852.
50. Hodorikowski, M.C., & Parviziana, C.M. 1984. Bactericidal activity of fractionated granule contents from human polymorphonuclear leucocytes: role of nuclear membrane lipid. *Infect. Immun.* 32:868-874.

52. Mochizuki, H.C. y Saitonagi, J.T. 1979. Serological ability of fractionated granule contents from human polymorphonuclear leucocytes: Antigenism of granule cationic proteins by lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 29:697-699.
53. Mosier, D.E. y Subbara, B. 1982. Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol. Today* 3:217-222.
54. Rossmann, T.F., Chermak, H., Reed, R.W., Gledin, H.A. y Coffman, A.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and associated proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.
54. Hoidal, H. 1983. Proteins forming large vesicles form bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods in Enzymology* 97:83-109.
55. O'Brien, A.D. 1986. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with Salmonella typhimurium. *Comp. Top. Microbiol. Immunol.* 24:37-48.
56. O'Brien, A.D. y Metcalf, C.S. 1982. Control of early Salmonella-resistant mice does not require functional T lymphocytes. *J. Immunol.* 129:1348-1351.
57. Pasternack, H.B., Vercel, G.R., Liu, H.A. y Diem, R.B. 1988. Serine esterase is cytolytic T lymphocytes. *Nature* 322:740-743.
58. Paternoga, M.E., Amador, P., Clavijo, P., Morano, A., Guzman, F., Romero, P., Tascón, P., Franga, A., Morilla, L.A., Bonzan, G. y Trujillo, G. 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with annual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 332:158-161.
59. Peters, R.J., Geuze, H.J., van der Born, H.A. y Borst, J. 1990. A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Today* 11:28-32.
60. Reed, L.J. y Huensch, H.A. 1938. A simple method of estimating 10% percent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
61. Robbins, J.D. y Robbins, J.B. 1984. Re-examination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of Salmonella typhi. *J. Infect. Dis.* 150:438-449.
62. Reed, R.W., Luescher, J.F. y Granoff, J.R. 1986. Prosopigins enhance the binding of peptides to class II major histocompatibility molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:725-729.
63. Saxes, H. 1964. Mechanism of the protective action of anti-Salmonella IgM in experimental mouse salmonellosis. *J. Gen. Microbiol.* 130:2277-2283.

64. Schwartz, E.H. 1987. Immune response (I_H) genes of the murine major histocompatibility complex. *Adv. Immunol.* 30:31-109.
65. Sessa, O. & Weissmann, D. 1970. Incorporation of tryptophan into liposomes. A model for structure-linked latency. *J. Biol. Chem.* 245:3295-3301.
66. Shea, F. & Sabatini, D. 1981. Immune response mediated by liposome-associated protein antigens. I. Potentiation of the plaque-forming cell response. *Immunology* 45:349-355.
67. Shimizu, A., Kikuchi, T., Ishida, T. & Haseg, T. Structure and function of liposomes and their receptors. *En. Progress in Immunology VII, Proceedings of the 7th International Congress of Immunology*. Helchers, F. et al. eds. Springer-Verlag, BFA, pp. 601-612.
68. Sips, H.J. & Hamers, H.A. 1981. Mechanism of the bactericidal action of lysozyme-oligos: increased permeability of the *Escherichia coli* cell envelope. *Infect. Immun.* 33:11-16.
69. Spain, 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. W.H.O.* 31: 793-798.
70. Swartzler, H.T., Morrison, L.A., Brackley, V.L. & Graziadei, T.J. 1984. Recognition of pre-processed endogenous antigens by class I but not class II MHC-restricted T cells. *Nature* 312: 180-182.
71. Takeuchi, A. 1987. Electron microscopic studies of experimental *Salmonella* infection I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* 50:109-138.
72. Taylor, P.W. 1983. Bactericidal and bacteriostatic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47:68-83.
73. Terns, G., Takasawa, N. & Sitkovsky, M.Y. 1987. Antigen-receptor regulated exocytosis of cytotoxic granules may not be required for target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 330:72-74.
74. Takasawa, N., Nathan, C.F. 1984. Enzymatic basis of macrophage activation. Kinetic analysis of superoxide production in isolates of resident and activated mouse peritoneal macrophages and granulocytes. *J. Biol. Chem.* 259:6300-6310.
75. Tully, J.G., Gaines, S. & Tigert, W.D. 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV. Role of H antigens in protection. *J. Infect. Dis.* 112:116-124.
76. Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2:339-426.

77. Mandan, H., Seric, C., Corlaier, R., Sallam, S. y Germann, R. 1982. Oral vaccine against typhoid: five years results. *J. Infect. Dis.* 145:229-233.
78. Wang, L.J. y Frash, C.J. 1984. Development of a Neisseria meningitidis group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 48:408-414.
79. Warren, H., Vogel, F. y Chedd, L. 1969. Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.* 7:369-388.
80. Weinsberg, G.A. y Granoff, D.H. 1988. Polysaccharide-protein conjugate vaccines for the prevention of Haemophilus influenzae type b disease. *J. Pediatr.* 113:620-631.
81. Weiss, A. 1989. T lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*, second edition, Paul, W.E. edit. New York, U.S.A. pp. 359-384.
82. Yabuuchi, I., Kudo, H. y Enai, T. 1988. Invasiveness of Salmonella typhi strains in HeLa S3 monolayer cells. *Microbiol. Immunol.* 30:1213-1224.
83. Zagury, D., Bernard, J., Thurness, H., Feldman, H. y Berke, C. 1975. Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T lymphocytes. Conjugation, killing and recycling at the single cell level. *Eur. J. Immunol.* 5:616-622.