

302927  
3  
ES



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

ESCUELA QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

ANALISIS COMPARATIVO DE DOS METODOS PARA  
LA OBTENCION DE PORINAS DE Salmonella typhi  
9, 12 Vi:d.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**MARIA ELIGIA JUAREZ TORRES**

MEXICO, D F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
ug	microgramo
ul	microlitro
DL50	dosis letal 50
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
BSA	Albumina sérica bovina
pI	Punto isoeléctrico
LES	Lipopolisacárido
PME	Proteínas de membrana externa
PNC	Papel de nitrocelulosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Kd	Kilodaltones
SNR	Suero normal de ratón

# I N D I C E:

	Pag
I INTRODUCCION .....	1
II OBJETIVOS .....	2
III GENERALIDADES	
- Fiebre tifoidea .....	3
- <u>Salmonella typhi</u> .....	6
- Porinas .....	9
- Antigenicidad de las porinas .....	11
- Diagnostico .....	12
- Vacunas de celulas muertas .....	13
- Vacunas elaboradas a partir de cepas atenuadas de <u>Salmonelle typhi</u> .....	15
- Vacunas experimentales .....	18
- Vacunas elaboradas a partir de fracciones de S. typhi...	19
- Proteinas de membrana externa .....	21
- Clasificación de las proteínas de membrana externa ...	23
- Isoelectroenfoque .....	25
- Gradiente de pH .....	26
- Sintesis de anfolitos transportadores .....	27
- Anfolitos transportadores .....	28
IV METODOS .....	31
V RESULTADOS .....	43
VI DISCUSION DE RESULTADOS .....	59
VII CONCLUSIONES .....	63
VIII BIBLIOGRAFIA .....	64

## I INTRODUCCION:

La primera evidencia, en relación al cuadro clínico de la fiebre tifoidea, se le atribuye a Thomas Willis en 1659 (3); Jenner en 1850, describió que las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos, eran específicos de la fiebre tifoidea. (9); William Budd, en 1856 determinó que la fiebre tifoidea se transmitía a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas con materia fecal, proveniente de individuos enfermos (10).

En 1880, Eberth logró aislar el bacilo tifoídico en ganglios linfáticos mesentéricos e hígado de pacientes con fiebre tifoidea. Pfeiffer y Kolle en el mismo año demostraron que el suero de pacientes convalecientes protegía a los cobayos contra dosis letales de bacilo tifoídico y, Widal en 1895 describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (9).

## II OBJETIVO GENERAL:

Obtener porinas de Salmonella typhi mediante la separación preparativa de proteínas de membrana externa en un gradiente de pH.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estandarización de la técnica de isoelectroenfoque empleando un equipo Rotaphor Preparative, marca Bio Rad (Rotafor).
- Obtener y Caracterizar porinas de Salmonella typhi con un alto grado de pureza.
- Comparar por métodos inmunoquímicos la calidad de las porinas.
- Evaluar la obtención de porinas por isoelectroenfoque y compararla con la técnica de Nikaido.

### III GENERALIDADES

#### - FIEBRE TIFOIDEA.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión masiva de Salmonelle typhi. El cuadro clínico se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal, que frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen hemorragia intestinal y perforación. Aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de endotoxina (11). La tasa de letalidad es alrededor del 1%, pero en casos complicados puede ascender hasta el 30% (12).

La infección se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria, ya que este microorganismo afecta solo al ser humano y no hay reservorios animales; el elemento más importante de la cadena de transmisión es el portador asintomático.

Salmonella typhi penetra al organismo por vía oral, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, penetra a la membra-

na basal intestinal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por macrófagos y transportada a los linfáticos regionales donde se multiplica activamente, tiene una fase de bacteremia, se distribuye en el sistema fagocítico mononuclear donde se reproduce y es liberada nuevamente al sistema circulatorio (8).

La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares en el interior de los cuales es capaz de proliferar (8) fig 1

Esta enfermedad continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos países industrializados. Se estiman 12 millones de casos anuales con una incidencia de 500 casos/100,000 habitantes en Africa y Asia.

En la región de las Américas alrededor de 1990, se presentaron 89,591 casos aproximadamente, que dan una incidencia de 20.8 casos/100,000 habitantes, la incidencia a llegado a ser hasta de 150 casos/100,000 habitantes en Chile. En México se reportaron 11,078 casos en 1987, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes (13).



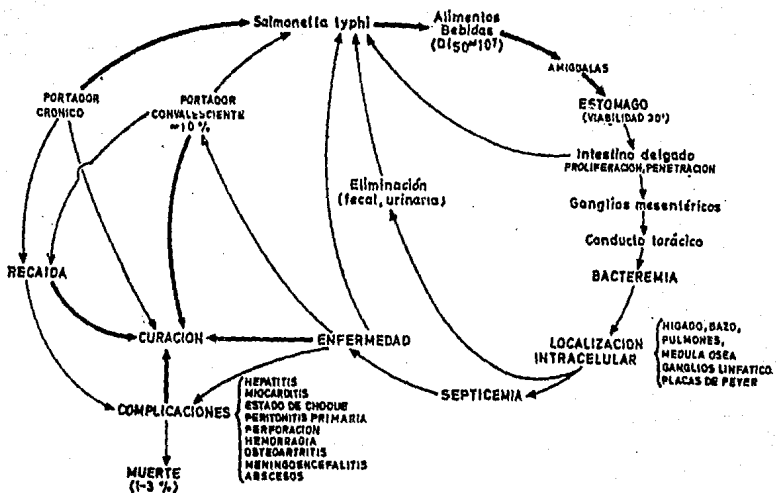


Figura 1: Esquema de penetración de Salmonella typhi al organismo

- Salmonella typhi .

Es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, tribu Salmonellae y especie typhi, Gram negativo, móvil, mide dos a tres  $\mu$ m citofílico, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos, descarboxilan la lisina y ornitina (36).

Tiene una estructura antigénica de superficie que incluye el antígeno "H" o flagelar y el antígeno somático "O" que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica, de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, Salmonella typhi pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9, 12, los flagelos contienen el antígeno "d" y en la superficie se encuentra el antígeno "Vi"; el cual es de naturaleza sacarídica, forma parte de la membrana externa y es indicador de virulencia. La fórmula 9, 12, Vi:d denota a Salmonella typhi en forma abreviada (37, 38)

Otros componentes de antigenicidad poco estudiada forman parte de la membrana externa, la lipoproteína de Braun y las porinas (39, 40), (fig. 2)

En el estudio de la fiebre tifoidea, el problema radica en que S. typhi es patógena sólo en el humano y en chimpancés (41), lo que impide o hace costosa la realización in vivo de estudios de protección. El modelo experimental aceptado para el estudio comparativo de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad, es el ratón infectado por Salmonella typhimurium (42).

La desventaja de dicho modelo es que la cepa infectante difiere de la patógena natural del humano; sin embargo para determinar la eficacia protectora de las vacunas anti-tifoídicas, se emplea el modelo murino, usando inyecciones intraperitoneal de Salmonella typhi suspendida en mucina (43).

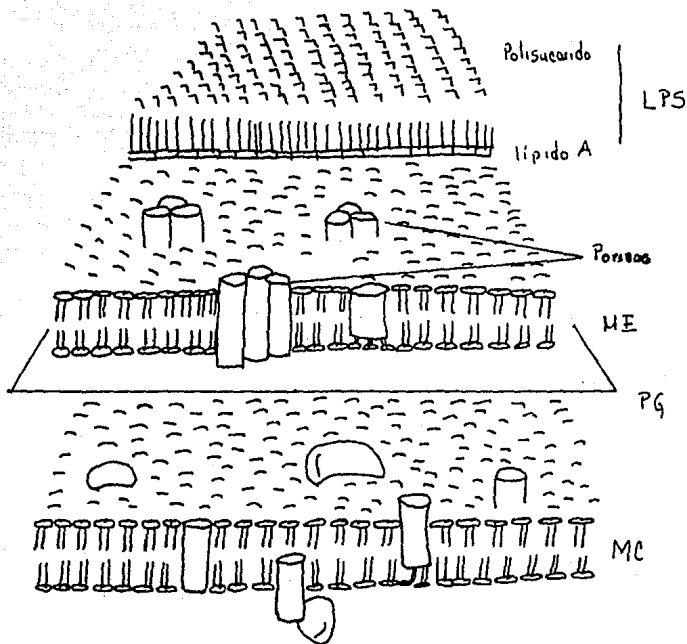


Figure 2: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

Abreviaturas: LPS: Lipopolisacárido; ME: Membrana externa, PG: Peptidoglicano; MC: Membrana citoplasmática; PP: Proteínas periplásmicas.

## PORINAS.

Las porinas son proteínas de peso molecular de 31,000 a 43,000 daltones, se encuentran asociados estrechamente a la peptidoglicana y al LPS de forma no covalente. Además reciben el nombre de porinas porque se arreglan en forma regular en la membrana externa formando trímeros, (figura 3) que forman poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias GRAM-NEGATIVAS. (67, 68).

La composición de estas proteínas así como el número y movilidad electroforética, varía dependiendo de la cepa de origen. Las porinas son polipéptidos de 336 residuos en promedio, su composición de aminoácidos indican una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45% (69, 70) y, presentan un punto isoelectrico de 4.8 La fisiología de las porinas como canales posiblemente se justifica como un medio de supervivencia de las bacterias en el medio ambiente del hospedero, rico en detergentes como las sales biliares.

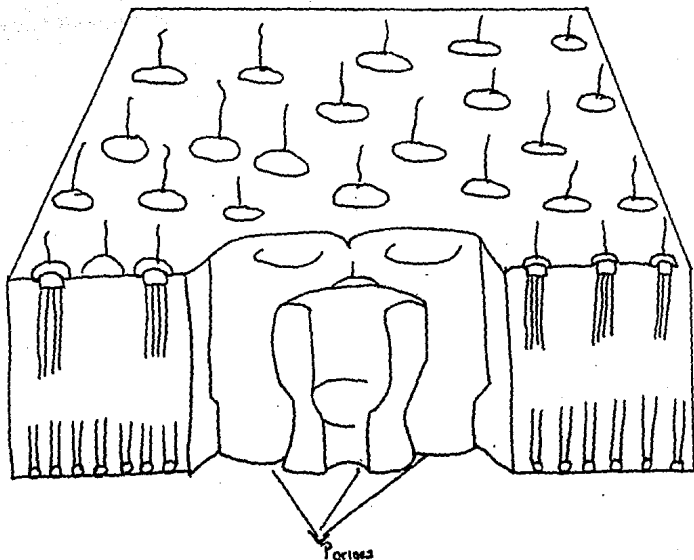


Figura 3: Modelo estructural de la porina

## ANTIGENICIDAD DE LAS PORINAS.

Las porinas de Salmonella typhi han sido poco estudiadas, sin embargo, se cuenta con suficiente evidencia que desempeñan un papel importante en el desarrollo de inmunidad contra esta bacteria:

1.- Los pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda produjeron anticuerpos de clase IgM y, en la fase de convalecencia mostraron anticuerpos de clase IgG, estos dirigidos contra porinas (64)

2.- La administración de vacuna antitifoídica oral induce la producción de anticuerpos anti-porinas, en tanto que la vacuna parenteral no lo hace (64, 65, 66).

3.- La inmunización con cantidades de 5 µg de porinas de Salmonella typhi, confiere protección al 80% de los ratones NIH (57, 66)

4.- Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de S. typhi confirieron una protección del 60% al reto con 20DL50 de la bacteria homóloga (66).

## DIAGNOSTICO.

El cultivo de S. typhi, en la sangre, ha sido considerado como la prueba definitiva para el diagnóstico; el aislamiento en las heces, en orina o en la bilis son pruebas menos convincentes.

Hemocultivo: La sangre del enfermo cultivada en el medio difásico de Ruiz-Castellada permite el aislamiento del germen en más de 80% de los casos, si la sangre se extrae durante el pico febril.

Coprocultivo. Es positivo desde el final de la primera semana en la enfermedad natural y en las inoculaciones experimentales algunos sujetos comienzan a eliminar Salmonella desde el primer día.

Mielocultivo: Ofrece las mayores oportunidades de éxito en el aislamiento de S. typhi en el medio Mendoza y logra más del 90% resultados positivos.

Serología: La reacción de Widal tiene una sensibilidad del 80% y, solo nos indica el diagnóstico; pero no sirve para el pronóstico o para guiar el tratamiento ni para predecir las recaídas o complicaciones.

Biometría hemática: Los hallazgos útiles son leucopenia (menos de 5000 leucocitos/mm), ausencia de eosinófilos y los niveles de hemoglobina tienden a ser bajos.



## VACUNAS DE SALMONELLA TYPHI.

Vacunas de células muertas.

En 1886 se realizó la primera inmunización experimental contra la infección por Salmonella typhi. Frankel y Simmons lograron proteger a conejos inyectándoles dosis de bacteria viva.

Posteriormente Bauner y Peiber reportaron resultados semejantes en ratones. Más tarde, Klivkovich demostró que los bacilos muertos también son capaces de inducir protección. En ese año Wright en Inglaterra y Pfeiffer y Kolle en Alemania en 1897 decidieron administrar bacterias inactivadas en humanos con el objetivo de generar protección. La vacuna de Pfeiffer, se preparaba en medio sólido, con la bacteria muerta por calor y fenol.

La utilización masiva de estas vacunas resultó exitosa, pues la morbilidad por fiebre tifoidea disminuyó al aplicarse en individuos de la India, Egipto, Italia y Sudafrica. Además estos individuos vacunados que adquirieron la enfermedad presentaron cuadros clínicos menos severos (63). El uso de las vacunas tifoídicas elaboradas con bacterias muertas continuó durante décadas. Sin embargo, no era posible comparar la eficacia de las diferentes preparaciones, debido a que no había modelos experimentales en primates.

Debido a lo mencionado anteriormente, en 1955, la Organización Mundial de la Salud (OMS), promovió la realización de estudios de campo, para determinar la eficacia de las vacunas preparadas por células enteras de Salmonella typhi: inactivadas con acetona (vacuna K), confirió mayor protección y más duradera. La inactivada con calor y fenol (vacuna L), mostró eficacia intermedia, y la inactivada con alcohol fue la menos efectiva. Algunos investigadores han atribuido la propiedad protectora más eficiente de la vacuna inactivada con acetona a su mayor contenido de antígeno (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Sin embargo, estas vacunas parenterales tienen diversos inconvenientes pues producen reacciones secundarias importantes, debido a que contienen endotoxina, por lo que no se recomienda emplearla en forma rutinaria (14, 15).

- Vacunas elaboradas a partir de cepas atenuadas de Salmonella typhi.

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 mutante de Salmonella typhi dependiente de estreptomycin (16), y aunque a principios de los setentas mostró ser segura y efectiva (17, 18), se abandonó su estudio debido a que no confirió protección cuando se utilizaron microorganismos liofilizados reconstituidos (18). La otra es una cepa deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa designada por Germánier como Ty21a (19).

- Salmonella typhi Ty21a

La cepa de Salmonella typhi Ty21a, fué desarrollada por Germánier y Furer en 1975, tiene una mutación en el gene galE que causa una deficiencia en la enzima UDP-4-galactosa epimerasa.

En un ensayo controlado realizado con bicarbonato de sodio, no presentó reacciones colaterales y logró inducir protección en el 95% de la población estudiada. La forma de administración utilizada en ese estudio era impráctica para la aplicación rutinaria de la vacuna, por lo que se evaluaron diferentes

formulaciones (20, 21, 22), tratando de incrementar la eficacia de la vacuna mediante una presentación liofilizada para ser disuelta en una solución amortiguadora que neutraliza el ácido gástrico. Con esta formulación se están realizando pruebas de campo en Indonesia y Chile.

En el comercio existe una vacuna llamada Vivotif realizada por el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas y que emplea la cepa Ty21a de Salmonella typhi (23).

Contraindicaciones: La vacuna atenuada Ty21a no debe ser empleada en personas inmunocomprometidas, incluyendo aquellas que se sabe estén infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana.

-Vacuna parenteral hecha a base de Polisacárido Capsular Vi.

El polisacárido "Vi" es un homopolímero lineal de ácido alfa, 1,4,2- deoxi-2-N-acetilgalacturónico que cubre la bacteria como un antígeno capsular y que se ha relacionado con la virulencia. Aunque varios investigadores han demostrado la falta de correlación entre los anticuerpos anti-Vi y un estado inmune protector, otros estudios revelan que el antígeno "Vi" por si solo es capaz de inducir protección (24,25, 26). En 1934 Felix y Pitt informaron la presencia tanto de dicho an-

ígeno en cepas de Salmonella typhi aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, como la de sus anticuerpos homólogos en el suero de estas personas (27).

Wong en los años 70 demostró en un modelo murino que la mayor efectividad de la vacuna inactivada por acetona sobre la inactivada por calor-fenol se debe al mayor contenido de antígeno "Vi" en la primera. Más tarde, el mismo investigador logró purificar el antígeno "Vi" sin desnaturización y demostró que continuaba siendo inmunogénico y seguro.

En 1984, Robbins y Robbins lograron preparar dos lotes de antígeno "Vi". Ambos resultaron buenos inmunógenos; sin embargo, uno de ellos generó reacciones adversas, debido a su contenido de lipopolisacárido contaminante. El lote que se obtuvo a través del Instituto Merieux, en Francia, se utilizó para realizar pruebas de campo en Nepal y en Sudáfrica. Se administró una sola dosis (25 µg) de antígeno "Vi" por vía parenteral que indujo títulos elevados de anticuerpos anti "Vi" y mostró una eficacia del 70% (28, 29).

El inconveniente de esta vacuna es que por su naturaleza polisacáridica se comporta como antígeno T-independiente y por tanto no induce memoria.

Debido a esto se ha sugerido conjugarlo químicamente a proteínas para conferirle características de antígenos proteicos, los cuales a diferencia de los polisacáridos, inducen respuesta más prolongada con anticuerpos de mayor afinidad y favorecen la respuesta inmune celular (30).

- Vacunas experimentales:

*Salmonella typhi* 541Ty y 543Ty.

Las cepas de *Salmonella typhi* 541Ty y 543Ty fueron desarrolladas por Stocker en 1981, induciendo deleciones en dos genes separados de manera similar a lo anteriormente reportado en *Salmonella typhimurium*. La deleción en el gene *aro A* induce una dependencia por aminoácidos aromáticos, incluyendo los ácidos p-aminobenzóico y 2-4-dihidroxibenzóico, que no son metabolitos de las células de mamíferos. La alteración del *purA* genera un requerimiento por adenina. Estas mutaciones causan la dependencia nutricional de la bacteria por metabolitos que no se encuentran en los tejidos de los mamíferos, por lo que no son capaces de sobrevivir en ellos.

Después de administrar, a voluntarios la cepa 541Ty de *Salmonella typhi* en una sola dosis con bicarbonato, se recuperó

bacterias en las heces de la mayoría de los vacunados, pero en ninguno se aisló del hemocultivo. La vacuna generó respuesta inmune celular específica. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos contra antígeno "O". "H" o "Vi" fué débil por lo que se consideró que las dos mutaciones causan sobreatenuación de la bacteria: por lo que, se han tratado de desarrollar cepas bacterianas que contengan una sola mutación.

-Vacunas elaboradas a partir de fracciones de Salmonella typhi

Las investigaciones encaminadas a identificar antígenos de S. typhi relacionados directamente con la protección, han sido numerosas; la mayoría se han dirigido hacia el estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático "O", el flagelar "H", el capsular "Vi" y las proteínas de membrana externa.

- Antígeno somático, flagelar y fracciones ribosomales.

Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O" constituido por el lipopolisacárido (LPS), jugaba un papel importante en la inducción de la inmunidad protectora.

Sin embargo, una vacuna a base del oligosacrido de repetición del LPS, a pesar de estar conjugado a proteínas, generó escasa protección en el modelo murino (8).

El antígeno flagelar "H" tampoco parece estar relacionado directamente con la inmunidad protectora, pues Tully y Cols. en 1962, demostraron que los anticuerpos contra los flagelos, no tienen efecto protector, pues al inmunizar chimpances con una cepa rugosa de S. typhi lograron inducir títulos altos de anticuerpos contra el antígeno "H", pero no evitaron la infección con la bacteria (31). Anderson en 1968, encontró que mutantes de S. typhi sin flagelos generan el mismo grado de protección en ratones (9).

En 1970, Vennemen y Cols. reportaron que las fracciones ribosomales de Salmonella typhimurium generaban protección contra la bacteria virulenta en el ratón (10). Posteriormente Molinari y Cols. obtuvieron resultados similares con las fracciones ribosomales de S. typhimurium y de S. typhi (12, 13).

El efecto protector de estas fracciones se acreditó a diferentes antígenos: al ARN ribosomal (10), a las proteínas ribosomales (32); o a la combinación de ambos (33); sin embargo, estos antígenos se encontraban contaminados con LPS y



Proteínas de membrana externa (PME) (34, 35).

#### PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME).

Las bacterias gram-negativas poseen la membrana citoplasmática y, la pentidoglicana y una membrana externa que actúa como barrera entre el medio ambiente y ella misma. Las funciones de la membrana, es que permite la entrada de nutrientes e impide la entrada de sustancias tóxicas, sales biliares y enzimas digestivas, así como un número importante de antibióticos (44).

La membrana externa de las bacterias gram-negativas difiere de la citoplasmática por contener un componente lipopolisacárido y menor cantidad de fosfolípidos y proteínas (fig 2)

En los últimos años las proteínas de membrana externa de las bacterias gram negativas han cobrado gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el 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, la cual fue llevada a cabo por Schanitz (45,46) y por Osborn (47). lo que indujo su estudio.

Las proteínas que más se han estudiado, son las de E. coli y Salmonella typhimurium y se sabe que el número de las proteínas de membrana externa son variable y dependen de la información genética de la bacteria y su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo y, temperatura (43).

Las evidencias de que las proteínas de membrana externa están expuestas al medio externo llevó a investigar su eficacia como inmunógenos protectores.

Fresch y cols, encontraron que las proteínas de membrana externa de Neisseria meningitidis grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaba a conejos (30). Estudios subsecuentes han demostrado que la inmunización con proteínas de membrana externa derivados de otras bacterias gram-negativas, como Haemophilus influenza (50), Shigella flexneri (51) y Pseudomonas aeruginosa (52) también confieren protección contra la infección en animales experimentales (49), y en pacientes se han detectado anticuerpos que reconocen a las proteínas de membrana externa tanto en fase aguda como en fase convaleciente.

Por otro lado, Kussai y cols, demostraron que las porinas extraídas de Salmonella typhimurium protegen al ratón. El

mismo efecto se obtuvo utilizando anticuerpos específicos (53, 54). Así mismo los antígenos proteicos ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de mayor afinidad así como de generar una inmunidad más prolongada (55, 40).

Isibesi y cols, estudiaron la capacidad de las proteínas de membrana externa de Salmonella typhi 9,12, Vi:d de conferir protección al ratón contra el reto de la bacteria viva (56). Demostraron que tanto las proteínas de membrana externa de Salmonella typhi, como el suero de conejo anti-PME inducen en el ratón un estado de inmunidad protectora (57).

#### - CLASIFICACION DE LAS PME.

Las proteínas se clasifican de acuerdo a su abundancia en la membrana, en proteínas principales y proteínas menores (59, 50).

#### PROTEINAS PRINCIPALES:

- Las proteínas matrices o porinas, que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana (58)
- Las proteínas modificables por calor que actúa como receptor

de colicinas y lagos (60).

- La lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcionalidad de la membrana (61 , 62).

#### LAS PROTEINAS MENORES.

Intervienen como acarreadores en el transporte activo de sustancias de alto peso molecular y, están relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana que tiene actividad de fosfolipasa A (62, 63).

fig 2

## ISOELECTROENFOQUE.

La técnica de isoelectroenfoque es una electroforesis, en la cual la separación se efectúa utilizando un gradiente de pH y no a un pH constante, este gradiente es establecido entre los dos electrodos y es estabilizado por transportadores anfólicos. En esta técnica las proteínas emigran hasta que se alinean por sí mismas en su punto isoelectrico (pI), en tal punto una proteína no posee carga ya la suma de sus cargas positivas y negativas es cero y luego entonces se concentran en este punto y suspende la migración. El isoelectroenfoque presenta alta resolución, en la cual los componentes difieren por 0.001 de unidad de pH.

Las proteínas tienen cargas positivas y negativas, pero en su punto isoelectrico (pI) su carga es cero ya que además los grupos terminales están cargados eléctricamente. ( $\text{NH}^+$  y  $\text{COO}^-$ ).

Estas proteínas contienen aminoácidos diamínicos y dicarboxílicos, que se disocian en :

- 1.- Los grupos ácidos pierden protones y se cargan negativamente.
- 2.- Los grupos básicos, que por ganancia de protones se cargan positivamente.

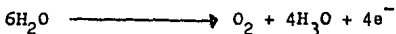
Todos estos grupos, llamados ionogénicos, contribuyen a las reacciones ácido-base de las proteínas y a las propiedades eléctricas de estas moléculas (75, 76, 77).

#### GRADIENTE DE pH.

La característica importante es que el ánodo llega a estar en forma natural ácido y el cátodo se convierte en alcalino, bajo la influencia de una corriente eléctrica (75).

Reacciones que tienen lugar en los electrodos.

Reacción del ánodo:



Reacción de cátodo:



El gradiente de pH origina a:

- La producción continua de iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{OH}^-$  en los electrodos.
- La presencia de anfólitos sintéticos transportadores cada uno con sus pI's espaciados adecuadamente, con los cuales se forma el gradiente.(77).

## SINTESIS DE ANFOLITOS TRANSPORTADORES.

Svensson fue quien desarrolló la técnica de isoelectroenfoque, así como de definir los requerimientos esenciales de un anfólito transportador, pero no encontró el anfólito conveniente, ya que la mayoría de los aminoácidos fueron no apropiados. El experimentó con varios péptidos sintéticos y proteínas hidrolizadas, aun así los problemas persistieron.

Posteriormente Vesterberg quien estuvo trabajando con Svensson unió residuos de ácidos carboxílicos a poliaminas de polietileno, para hacer los primeros anfólitos transportadores, Este procedimiento fue utilizado deliberadamente para realizar diferentes anfólitos de amplio rango sintetizándolos por medio de la copolimerización de aminas seleccionadas (79, 80).

### Estructura de los anfólitos.

Uno de los factores en el incremento de el número de sustancias anfóteras diferentes es por el uso de isomerismo estérico, así como el uso de compuestos ramificados y cíclicos los cuales se forman. La estructura hipotética de un anfólito se muestra en la figura 4.

## ANFOLITOS TRANSPORTADORES.

Las características para tener un anfólito de buena calidad son:

- Alta capacidad reguladora en sus puntos isoeléctricos: Esto significa que deben ser capaces de establecer las características del gradiente de pH, aun en presencia de concentraciones altas de muestra, ya que todos los anfólitos tienen una capacidad reguladora alrededor de sus pI's. Que la capacidad reguladora se conserve en todo el gradiente de pH ya que en regiones con una capacidad reguladora baja afectaría la estabilidad del gradiente y se obtendría una baja resolución. (78, 81).
- La conductividad debe ser apreciable a través de todo el gradiente de pH generado por la mezcla de anfólitos, ya que una conductividad baja en un punto provocará una diferencia de potencial, así como el incremento de temperatura en determinadas zonas, teniendo como consecuencia la desnaturalización de las proteínas (31, 32).
- El peso molecular de los anfólitos transportadores tendrán pesos moleculares en la región de 300-1000 d. Especies con pesos moleculares bajos tienen capacidades reguladoras bajas, mientras que aquellas de peso molecular alto pueden difícilmente moverse y no formarse adecuadamente el gradiente de pH.



Los anfólitos transportadores nunca deberen interactuar con los componentes de la muestra; tampoco ser tóxicos ni carcinógenos (79, 80).

Diferencia en utilizar anfólitos o proteínas transportadores.

- Las proteínas a causa de su tamaño relativamente grande tienen un coeficiente de difusión mucho más bajo que los anfólitos transportadores.

- La capacidad reguladora es mucho más baja para las proteínas transportadores y, como consecuencia, la movilidad de la proteína es baja, así como su concentración (83).



#### IV METODOS

##### IDENTIFICACION DE LA BACTERIA:

Con el fin de confirmar o desechar la sospecha de otro microorganismo que no fuera S. typhi se identifica la bacteria a través de métodos específicos de cultivo y Bioquímicos; estos son.

- Agar hierro y triple azúcar (TSI).

mezcla de peptonas .....	2.0g
Cloruro de sodio .....	0.5g
Lactosa .....	1.0g
Sacarosa .....	1.0g
Dextrosa .....	0.1g
Sulfato de amonio férrico .....	0.02g
Tiosulfato de sodio .....	0.02g
Rojo fenol .....	0.0025g
Agar .....	1.3g
Agua destilada .....	1000ml
pH final después de esterilizar $7.3 \pm 0.2$	

Poner aproximadamente 10 ml del medio licuado en cada tubo y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 libras durante 15 minutos.

Después de esterilizar los tubos, se enfrían en posición inclinada.

- Agar de hierro y lisina (LIA)

Peptona de cerne .....	0.5g
Extracto de levadura .....	0.3g
D-glucosa .....	0.1g
L-lisina monoclorhidrato .....	1.0g
Tiosulfato de sodio .....	0.004g
Amonio y hierro citrato .....	0.005g
Purpura de bromocresol .....	0.002g
Agar .....	1.25g
Agua destilada .....	100 ml

pH final después de la esterilización  $6.7^{\pm} 0.1$

Poner aproximadamente 10 ml de medio licuado a cada tubo y esterilizar en el autoclave  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 libras, 15 minutos.

Después de esterilizar, los tubos se enfrían en posición inclinada.

- Agar citrato de Simmons

Amonio dihidrógenofosfato .....	0.1g
Potasio hidrógenofosfato .....	0.1g
Cloruro de sodio .....	0.5g
Sulfato de magnesio .....	0.002g
Azul de bromotimol .....	0.008g
Agar.....	1.2g
Agua destilada .....	100ml

pH final después de la esterilización  $6.9^{\pm} 0.1$

Poner aproximadamente 10 ml de medio licuado a cada tubo y esterilizar, después de lo cual los tubos se enfrían en posición inclinada.

- Medio MIO

Extracto de levadura .....	0.3g
Peptona de gelatina .....	1.0g
Peptona de caseína .....	1.0g
L-ornitina .....	0.5g
Dextrosa .....	0.1g
Agar .....	0.2g
Púrpura de bromocresol .....	0.002g
Agua destilada .....	100 ml

pH después de la esterilización  $6.5 \pm 0.2$

Poner 10 ml del medio licuado a cada tubo y esterilizar, después de lo cual se enfrían en posición vertical.

CULTIVO DE LA BACTERIA:

Salmonella typhi se siembra en placas de agar BHI (infusión cerebro corazón) y se deja crecer durante 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ , se toman ocho inóculos con asa bacteriológica, y se depositan en ocho matraces de 125ml; cada uno de estos contiene 50 ml de medio mínimo A. Después de un tiempo de crecimiento de 13 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , se divide cada inóculo en partes iguales y se agregan a garrafones que contienen 1.5 lt de medio mínimo A, complementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa; los garrafones se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación de 200 rpm

durante 8 horas, deteniendo el crecimiento en fase logarítmica hasta obtener una densidad óptica de 190 unidades Klett (Espectrofotómetro Beckman DU-7). Posteriormente se centrifuga a 4000 rpm/20 minutos hasta obtener una pastilla.

#### OBTENCION DE PORINAS.

Las porinas de S. typhi son purificadas por una modificación del método de Nikaido (70). La pastilla obtenida se resuspende en amortiguador de tris-HCl (hidroximetil amino metano) 0.1M pH 7.4 hasta obtener una densidad óptica de 1 a 660nm (espectrofotómetro Beckman DU-7), la bacteria, colocada en un baño de hielo, se rompe por ultrasonido por periodos de 1 minuto por tres minutos de descenso (Lab-line-Ultratip Labsonic System) hasta obtener una densidad de 0.4 a una longitud de onda de 660 nm.

El lisado así obtenido, se trata con las enzimas DNasa y RNasa se incuba durante 30 minutos en un baño para disminuir la viscosidad y eliminar los ácidos nucleicos.

Se conservan las membranas por Ultracentrifugación (Ultracentrifuge rotors All Beckman preparative). a 35000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se solubilizan en tris 0.1M, pH 7.7

SDS (dodecil sulfato de sodio) al 2%, se incuba a 32°C durante 30 minutos, posteriormente se Ultracentrifuga a 45000 rpm durante 30 minutos a 20°C y el sedimento se somete a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contiene pentidoglicana, de donde se extraen las proteínas unidas a ella, solubilizándolas con tris 50mM, NaCl 0.4M y 2-mercaptoetanol 0.05%, se incuba durante 2 horas a 37°C y se ultracentrifuga a 20000 rpm durante 1 hora a 20°C, obteniéndose en el sobrenadante las porinas.

#### PURIFICACION DE FORINAS.

El sobrenadante resultante se pasa a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm por 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co) con un flujo de 4ml/hr. Se recolectan las fracciones, detectándose la presencia de proteínas a 280 nm. La cantidad de muestra colocada es de 8 ml y se recuperan fracciones de 3 ml en un colector, para que no exista un margen de error mayor; las correspondientes porinas se dializan contra NaCl 0.1M. Para reutilizar la columna, se lava con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel, la columna se lava con HCl 10 mM y NaCl 10 mM.

## OBTENCIÓN DE PORINAS POR ISOELECTROENFOQUE

La obtención de porinas de acuerdo a su pI (punto isoelectrico) se lleva a cabo utilizando un equipo (Rotaphor de cell preparative Bio Rad), se forma el gradiente utilizando una solución al 2% de anfotinas (Bio Rad) del rango de 3.5-10, solo se inyecta 20 ml de esta solución, durante 1 hora se aplica una corriente (Model 3000 Xi Computer Controlled) cuyos límites utilizados son de 3000 Volts, 300 mA y 12 Watts, después de formar el gradiente, se aplica 30 ml de la bacteria sonicada, con 0.4g de (3-(3-Cloleamidopropil)diethylamonio-1-propenosulfato) CHAPS, para la solubilización de las proteínas. La corriente aplicada para la separación de las proteínas fue mencionado anteriormente durante un tiempo de 6 horas; las fracciones recolectadas y se les determinó su pH (pH Corning scientific instruments).



## ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

La electroforesis en gel de poliacrilamida permite el análisis y la separación de mezclas de proteínas debido a la transferencia del gel, su alta resolución y su reproducibilidad.

La separación en la electroforesis depende de la carga, tamaño y forma de las moléculas y es posible separar por diferentes intervalos de peso molecular al variar la concentración del gel.

La electroforesis en condiciones reductoras, SDS-PAGE, somete a las proteínas a la acción del 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro y simultáneamente se tratan con el detergente aniónico SDS (dodecil sulfato de sodio), que reduce las cadenas polivalentes y las carga negativamente, así la separación únicamente depende del tamaño y es posible determinar el peso molecular de las muestras comparando su movilidad con el de marcadores de peso molecular conocido.

Las proteínas se caracterizan de acuerdo a su movilidad electroforética, tanto de proteínas obtenidas por el método de Nikaido como de isoelectroenfoque; en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Midget Electrophoresis Unit LKB) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos,

de acuerdo al método de Lemmli (71).

Se utiliza como amortiguador de muestra Tris 0.125M pH6.8, que contiene SDS al 2%, 2-mercaptoetanol al 1%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. El gel superior contiene 2.5% de acrilamida, 0.8% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS y Tris-HCl 0.5M pH 6.8. El gel separador contiene 15% de acrilamida, 0.8% de bis-acrilamida, 1.6% de SDS y 7.5% Tris-HCl 1.5M pH 8.8.

El corrimiento electroforético se lleva cabo durante 3 horas, empleando 15 mA por placa y como amortiguador de corrimiento se utiliza Tris 0.3%, glicina 1.4%, SDS al 0.1%, pH 8.3.

Posteriormente, los gales se tiñen durante 30 minutos en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñen empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (30:7:63), hasta que el fondo del gel sea transparente.

#### CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

La cuantificación del contenido de proteínas tanto de norinas obtenidas por el método de Nikaido (58, 70) como las de iso-electroenfoue, se realiza de acuerdo al método de Lowry (39) empleando albumina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co).

La cuantificación colorimétrica de proteínas se lleva a cabo empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. La intensidad de color en la reacción es directamente proporcional a la concentración de proteínas, se sugiere el rango de 10 a 250  $\mu\text{g}$  de proteína para establecer la curva. El estándar utilizado es albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 1mg/ml.

La curva se obtiene siguiendo el protocolo de la tabla.

Contenido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA 1mg/ml	0	0	.01	.02	.03	.05	.1	.15	.20	.25
NaCl 0.85% (ml)	.4	.4	.39	.38	.37	.35	.30	.25	.20	.15
Reactivo A (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Folin (ml)	.2	.2	.2	.2	.2	.2	.2	.2	.2	.2

Después de agregar los reactivos se agita la mezcla de cada tubo en un vortex, se sugiere un lapso de 30 minutos para desarrollar color. Se determina la densidad óptica de las mezclas reagentes a 500 nm.

La curva se realiza por duplicado con el fin de observar el margen de error.

Los reactivos utilizados en la preparación de esta curva son:

Reactivo A1:

Tetraato de sodio dihidratado al 2%.

Reactivo A2:

Sulfato de cobre pentahidratado al 1%.

Reactivo A3.

Carbonato de sodio al 2% en hidroxido de sodio al 0.1N.

Reactivo A (solución stock).

El reactivo A es una mezcla de 3 soluciones stock (A1, A2 , y A3). las cuales se combinan inmediatamente antes de ser utilizados.

#### INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La electrotransferencia de las porinas de los geles de nitrocelulosa (PNC), se lleva acabo durante 2 horas a 160 Volts en un equipo (Mini Vertical Gel Electrophoresis). Se emplea como amortiguador para la transferencia glicina 192mM, metanol 20% en tris 20 mM, pH 8.3 (72).

Transcurrido el tiempo y para comprobar que la transferencia se lleva acabo, el papel de nitrocelulosa (PNC) se tñe con

rojo de Ponceau durante 3 minutos, verificada la transferencia se lava con agua destilada para eliminar el rojo de Ponceau y posteriormente el papel de nitrocelulosa (PNC) se bloquea con PBS pH 7.4, que contiene NaCl 0.8%, fosfato de sodio monobásico 0.04% y, fosfato de sodio dibásico 0.27% en leche al 5% durante 24 horas posteriormente se realizan lavados exhaustivos con PBS-Tween 0.01% El papel de nitrocelulosa se incuba (Controlled environment incubator Shaker), por 2 horas a 37°C con el suero problema, posteriormente se lava con PBS-Tween seis lavados y se incuba 2 horas a 37°C con la dilución de antisuero de cabra conjugado con peroxidasa con anti-Ig(s) de ratón. Una vez terminado el tiempo de incubación, se lava 4 veces con PBS-tween y 4 veces con PBS, para posteriormente colocar el sustrato (4cloro-naftol2mM, peróxido de hidrogeno 0.08% en PBS).

## ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SÓLIDA (ELISA).

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-porinas, en el suero de ratones, se emplea el método de ELISA, de acuerdo al método descrito por Engvall (74).

Se recubren placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co). con 100  $\mu$ l/pozo de soluciones de 100  $\mu$ l/ml, 50 $\mu$ l/ml, 25 $\mu$ l/ml, 12.5 $\mu$ l/ml, 6.25 $\mu$ l/ml, 3.125 $\mu$ l/ml, 1.5 $\mu$ l/ml y , 0.78 $\mu$ l/ml de porinas tanto de Nikrido como de isoelectroenfocue, en amortiguador de carbonatos (carbonato-bicarbonato de sodio pH 9.6) a 2 horas a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se lava 4 veces con PBS-tween al 0.1% y se llenan los pozos con solución de bloqueo (PBS- leche al 5%) y se deja 1 hora a 37°C, luego, se agregan 100  $\mu$ l de los sueros problema y se incuba la placa 1 hora a 37°C, después de 6 lavados con PBS-tween se agregan 100  $\mu$ l del conjugado (anti-suero de cabra conjugado con peroxidasa anti IgG), y se incuba la placa 1 hora a 37°C, después de 3 lavados con PBS-tween se agregan 100  $\mu$ l de solución de sustrato (o-fenildiamina, peróxido de hidrogeno en amortiguador de citratos pH 5.6) y a los 10 minutos la reacción se detiene agregando 1 gota de ácido sulfúrico 2.5N. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (ELISA Reader).

## V RESULTADOS:

### IDENTIFICACION DE LA CEPA.

La Salmonella typhi empleada para este trabajo tuvo las siguientes características:

- En agar hierro y triple azúcar (TSI) fué

lactosa (-)

sacarosa (-)

glucosa (+)      H<sub>2</sub>S (+).

- En agar hierro y lisina (LIA) fué

Lisina (+)

H<sub>2</sub>S (+),

- En citrato de Simmons fué (-) y

- En medio MIO.

Movilidad (+)

Indol (-)

Ornitina descarboxilasa (-)

## PURIFICACION DE PORINAS.

La obtención de porinas mediante la técnica de Nikaido (58) se fundamenta en el hecho de que las porinas se encuentran unidas por enlaces no iónicos a la peptidoglicana, por lo cual se pueden separar utilizando un amortiguador que contiene SDS y NaCl.

Las porinas así obtenidas se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-200.

En la figura 5 se muestra el perfil cromatográfico obtenido de la columna de Sephacryl S-200. En este se observa que la fracción proteica eluyó inmediatamente después del espacio muerto y, que los puntos más altos de lectura a 230 nm de la elución contenían las porinas en forma de trímeros (114 Kd a 123 Kd).

## PORINAS OBTENIDAS POR ISOELECTROENFOQUE.

La obtención de porinas se fundamenta en el hecho de la separación de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) utilizando; las fracciones recolectadas a los cuiles se les midió su pH, y éstos nos indicó que las porinas presentan un pH de 4.8. La figura 6 muestra el isoelectroenfoque de la muestra analizada.



# ELUCION DE PORINAS

## Sephacryl S-200

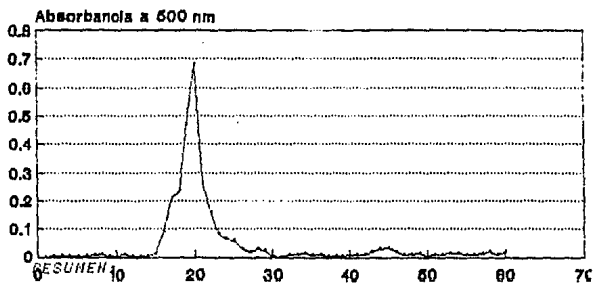


Figure 5: Cromatograma de elución de porinas

El pico corresponde a las porinas purificadas en su forma nativa, entre las fracciones 18 a 20.

# ISOELECTROENFOQUE

## Utilizando anfolinas 3.5-10

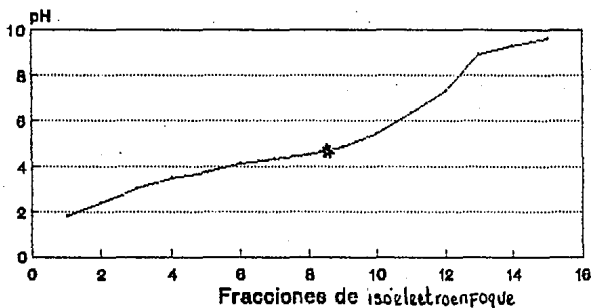


Figura 6: Muestra el gradiente formado por el rotarhor, en el cual el pH de 4.3 corresponden a las porinas.

## ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.

El corrimiento electroforético de las porinas en geles de acrilamida, es consistente con lo reportado, ya que de acuerdo a la figura 7 se muestra que a través de los distintos pasos de la técnica de Nikaido hasta su purificación; y la obtención por isoelectroenfoque fig 3, se encontraron entre 33 a 41 Kd (kilodaltones).

La comparación de la obtención de porinas por los dos métodos se encuentra en la figura 9, y como se puede observar las porinas obtenidas por los dos métodos presentan el mismo corrimiento electroforético.

## CONCENTRACION DE PORINAS POR EL METODO DE LOWRY.

La figura 10 muestra la curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) utilizada para determinar la concentración de las porinas obtenidas por los dos métodos, y usando la regresión lineal se determinó la concentración de las proteínas obtenidas por el método de Nikaido las cuales fueron de 1.9 mg/ml, 2mg/ml y 1.75 mg/ml respectivamente.

La figura 11 nos muestra otra curva estándar de BSA, la cual se utilizó para, calcular la concentración de las porinas

obtenidas por isoelectroenfoque; éstas fueron de 1mg/ml.

La bacteria utilizada perteneció al mismo lote y se partió de:

75g de bacteria  
en peso húmedo

→ SONICADO →

7.5 lt

→ 7 lt para  
Nikaido

→ 0.5lt para iso-  
electroenfoque

CUADRO COMPARATIVO EN LA OBTENCION DE PORINAS POR LOS DOS  
METODOS BIOQUIMICOS.

Muestra	Concentración	Volumen	Cantidad	Tiempo
Porinas de Nikaido	1.91mg/ml	9ml	17.19mg	4 días
	2 mg/ml	10 ml	20 mg	
	1.75 mg/ml	5 ml	<u>8.75 mg</u> 45.94 mg	
Porinas de isoelectro- enfoco	1 mg/ml	13 ml	13mg/ml	6 horas

ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN PAPEL DE NITROCELULOSA.

La transferencia de las porinas a papel de nitrocelulosa al ser revelado con suero de ratón anti-porinas presentó una sola banda que correspondió a un peso molecular aproximado de 38 Kd (kilodaltones) Figura 12. El resultado fue el mismo para las porinas obtenidas tanto por el método de Nikaido como por isoelectroenfoco.

## EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE PORINAS POR ELISA.

Para comprobar la inmunogenicidad de las porinas, en el modelo murino se decidió determinar el nivel de anticuerpos contra ellas a través del ensayo inmunoenzimático, y como puede verse en la figura 13 y 14 se encontró que los títulos anti-porinas eran los mismos para las proteínas obtenidas por los dos métodos.

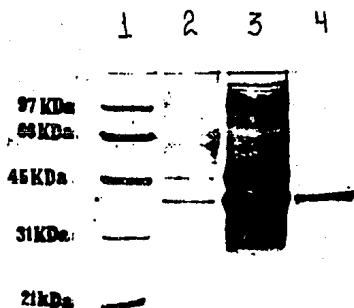


Figura 7: Corrimiento electroforético de las porinas en condiciones reductoras.

- 1.- Pesos moleculares: 97 fosforilasa, 66 albúmina serica, 45 albúmina, 31 anhidrasa carbonica, 21 tripsinógeno, 14 lisozima.
- 2.- Bacteria sonicada.
- 3.- Porinas sin purificar
- 4.- Porinas purificadas.

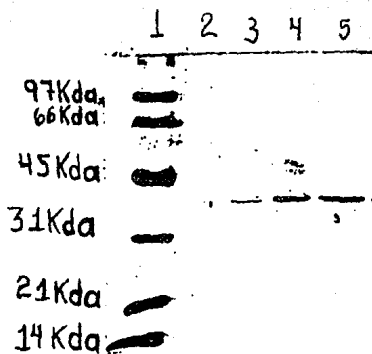


Figura 8: Corrimiento electroforético de porinas

- 1.- Pesos moleculares(mencionados anteriormente).  
 2,3,4 y 5 .- Porinas obtenidas por el método de iso-  
 electroenfoque, colocando diferentes diluciones las  
 cuales son de 10µg/ml, 20µg/ml ,30µg/ml y 50µg/ml



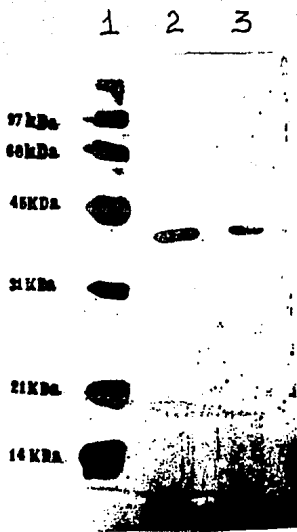


Figure 9: Corrimiento electroforético.

1.- Pesos moleculares (mencionados anteriormente)

2.- Porinas obtenidas por el método de  
Nikaido.

3.- Porinas obtenidas por isoelectroenfoque.

## CURVA DE LOWRY

### Porinas obtenidas por Nikaido

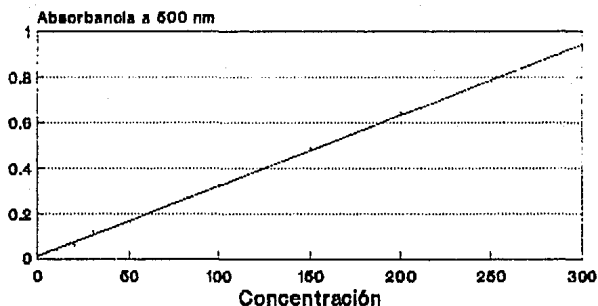


Figura 10: Muestra la curva estándar para determinar la concentración de las porinas obtenidas por el método de Nikaido.

# CURVA DE LOWRY

Porinas obtenidas por isoelectroenfoque

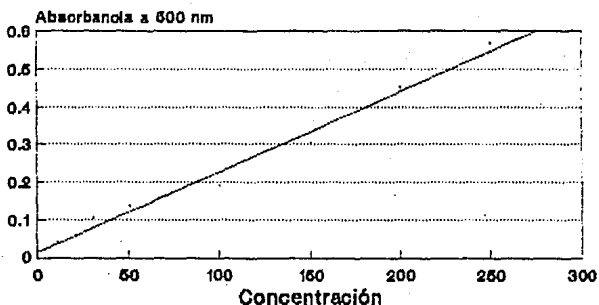


Figura 11: Muestra la curva estender para determinar la concentración de las porinas obtenidas por isoelectroenfoque

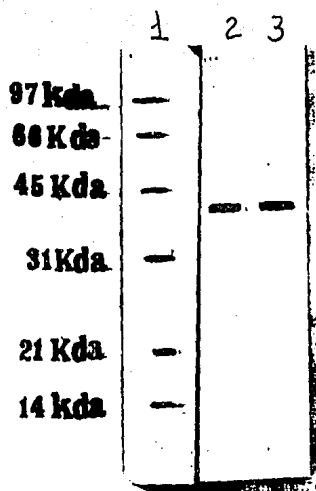


Figura 12: Muestra la electrotransferencia de las porinas a papel de nitrocelulosa, revelado con suero de ratón anti-porinas.

- 1.- Pesos moleculares.
- 2.- Porinas obtenidas por el método de Nikaido.
- 3.- Porinas obtenidas por el método de isoelectroenfoque.

# ELISA

## Suero de ratón anti-porinas

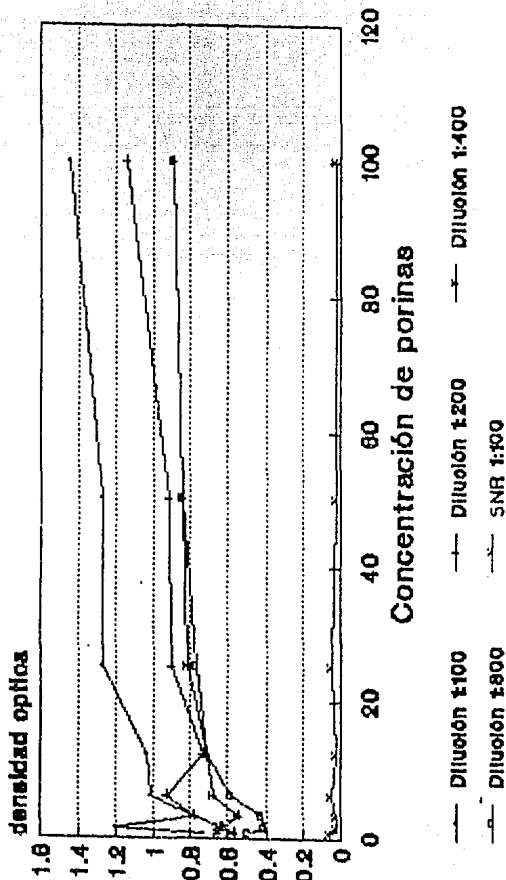


Figura 13: Muestra la titulación de anticuerpos anti-porinas, utilizando como antigeno las porinas obtenidas por el método de NIKAIIDO

Porinas de NIKAIIDO

# ELISA

## Suero de ratón anti-porinas

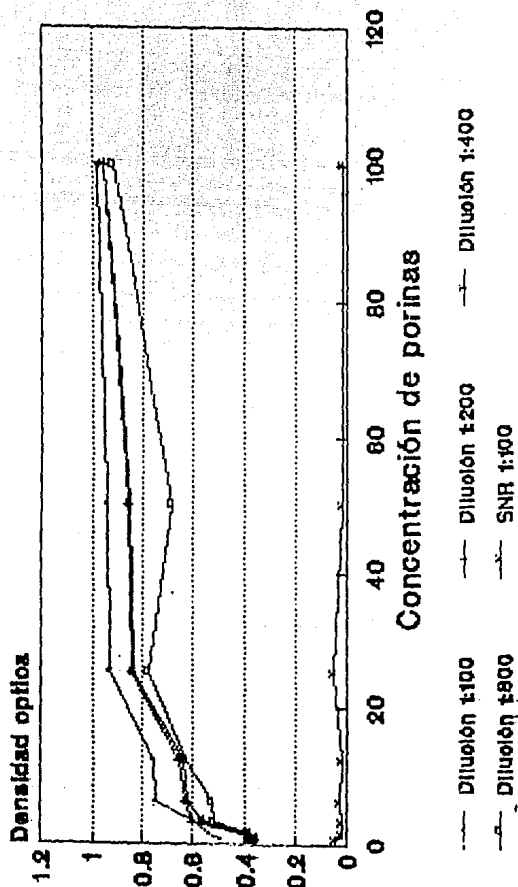


Figura 14: Muestra la titulación de anticuerpos anti-porinas, utilizando como antígeno porinas obtenidos por el método de radioelectroforesis.

## VI DISCUSION DE RESULTADOS:

Uno de los problemas importantes para obtener porinas en grandes cantidades es que se obtienen en baja concentración, en un tiempo largo y un alto costo.

En este trabajo se propone utilizar dos métodos para obtener las porinas; y a través de los resultados escoger aquel que de mayor rendimiento, en poco tiempo y sea de bajo costo.

Antes de iniciar el trabajo fue necesario confirmar que la bacteria utilizada era realmente Salmonella typhi y que no estaba contaminada con alguna otra bacteria.

Para esto se tuvieron que realizar pruebas bioquímicas, que demostraron que era la bacteria a utilizar.

Es de particular importancia purificar y caracterizar las porinas que se van a utilizar, pues en ocasiones los métodos más rápidos no necesariamente dan mayor rendimiento y pureza.

Por el método de Nikaido se obtienen las porinas en su estado nativo, ya que las proteínas se extraen utilizando métodos no drásticos.

El patrón de elución de las porinas a través de la exclusión molecular fue semejante en todos los casos que se realizó;

lo que permite decir que es reproducible, además se encontraban entre las fracciones 13 a 20; por lo que se podría separar de otras moléculas.

Con el fin de caracterizarlas, las técnicas inmunoquímicas empleadas confirmaron que estamos obteniendo porinas pues los datos encontrados concordaban con los reportados previamente.

Con la técnica de isoelectroenfoque se pudo realizar la separación de las porinas de acuerdo a su pH, el cual fue de 4.8; lo que permitió separarlas de otras proteínas presentes en la bacteria sonicada.

Un problema de esta técnica es que se debe tener ciertas condiciones específicas, pues a veces por razones de manipuleo, no se forma el gradiente de pH, dando como resultado una inadecuada separación o desnaturalización de las proteínas.

Es importante pues que la concentración, el voltaje y temperatura sean los adecuados. Por otro lado el detergente debe solubilizar bien las proteínas ya que en isoelectroenfoque se obtienen precipitadas.

La gráfica del gradiente de pH nos muestra que hubo una adecuada formación del mismo, pues están continuos.



El patrón electroforético de las porinas de *Salmonella typhi* aisladas por los dos métodos presentaban un peso molecular de 39Kd a 41Kd, y no había contaminación con otras proteínas. Esto se corroboró al hacer la comprobación por medio de electroforesis en gel, obteniéndose los distintos pesos que involucran la técnica de Nixido, pues se confirmó que las porinas estuvieron purificadas solo después de pasarlas por columna.

Con el fin de determinar la concentración de las porinas obtenidas por los dos métodos, y poder así comparar por cual se obtienen en mayor concentración, se utilizó la técnica de Lowry.

Haciendo uso de la técnica de ELISA y de inmunoelectrotransferencia se comprobó que las porinas de Salmonella typhi son reconocidas por anticuerpos específicos; el ELISA fue la técnica más sensible ya que reconoce mínimas cantidades de antígeno.

Con los datos finales podemos demostrar que el método de separación por isoelectroenfoque es el mejor, pues se encontró que las desventajas de la técnica de Nixido fueron las siguientes;

- Se obtienen porinas en un tiempo más largo y<sup>o</sup> que incluye varios pasos.
- Las porinas se encuentran contaminadas con otras proteínas y es necesario purificarlas por exclusión molecular y
- La concentración de las mismas es relativamente baja

Las ventajas que muestra la técnica de isoelectroenfoque fueron :

- Que se obtienen en menor tiempo.
- La concentración es relativamente alta comparandola con la técnica de Nikaido.
- No es necesario purificarlas, pues debido a la característica de su punto isoelectrico son facilmente separadas de otras proteínas.

## VII CONCLUSIONES:

Después de analizar los dos métodos que se emplearon para obtener porinas con un alto grado de pureza, se propone que la técnica mejor es la de isoelectroenfoque, ya que se obtienen porinas a partir de menor cantidad de bacteria sonificada, en un tiempo más corto, la concentración es más alta, por lo que es menos costosa.

Gracias a este método se podrá continuar los siguientes estudios en el desarrollo de una vacuna contra la fiebre tifoidea a base de porinas de Salmonella typhi

## VIII BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Typhoid panel, U.K. Department of technical Cooperation. A controlled field trial of acetone-killed and inactivated and heatphenol-inactivated typhoid vaccines in British Guiana. Bull. WHO 1964. 30:631-634.
- 2.- Polish Typhoid Committee. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and controlled field trial in Poland. Bull WHO. 1965. 32:15-27.
- 3.- Matsui, K. and Ari, T. Specificity of Salmonella Porin as an Eliciting Antigen for Cell-Mediated Immunity (CMI) Reaction in Murine Salmonellosis. Microbiol. Immunol. 1989 33:1063-1067.
- 4.- Hejfec, L.B et al. A Controlled field trial and laboratory study of five- typhoid vaccines in the URSS. Bull WHO. 1966. 30:321-339.
- 5.- Levine, K.M., Ferrecio, C., Black, R.E.; Tacket, C.O., Germanier, R. and the Chilean typhoid Comite. Progress in vaccines against typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 1989. 11:5552-5567.
- 6.- Cvjetanovic, B. and Venum, K. the present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines.

Bull. WHO. 1965. 32:29-36.

7.- Perez, K.A y Cabrera, R. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Rev. Sal. Páb. de Méx 1974.

8.- Hornick, R.B; Greisman, S.E.; Woodward, T.E.; Dupont, H.L Drawkings, A.T. and Snyder, W.J. 1970. Typhoid fever pathogenesis and immunological control. N. Engl. J. Med 283:686-691.

9.- Sandford, G.R. 1979. Infectious diseases. Ed Burgess Pub. Co. U.S.A. pp 55-130.

10.- Kumate, J. 1979. Inmunidad, Inmunización y Vacunas, Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, pp. 227-247.

11.- Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other Salmonella infections. Ed. E y S. Livingston, L.T.D., London. pp. 4-9.

12.- Anuario estadístico 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S. 1988.

13.- Molinari, J, and Lerralde, C. Acquired Immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. Rev. lat. Amer. Microbiol. 1974. 16: 189-197.

14.- Joo, I. Present status and perspectives of vaccination against typhoid fever. International Conference on the Application of Vaccines Against Viral, Rickettsial and Bacterial

Disease of Man, Washington, D.C. Fpn Am. Health Orgpn. Sci.

Publ. 1970. 226:339-341.

15.- Hornick, R.B., Dupont, H.L., Dawkins, A.T., Snyder, M.J. and Wood ARD, T.E. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Symposia Series in Immunobiological standardization. 1968.

16.- Reitman, M. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. J. Infect. Dis. 1967. 117: 101-107.

17.- Dupont, H.L., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P. and Woodward, T.E. Immunity in typhoid fever: evaluation of live streptomycin- dependent vaccine. Antimicrob. Agents. Chemother. 1970. 1971:236.

18.- Levine, M.M., Dupont, H.L. Hornick, R.B., et al Attenuated streptomycin- dependent *Salmonella typhi* oral vaccine potential deleterious effects of liohilization. J. Infect Dis 1976. 133:24.

19.- Germainier, R. and Furer, E. Isolation and Characterization of *S. typhi galE* mutant Ty21a: candidate strain for live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 1975. 131:553-558.

20.- Germainier, R. Typhoid fever. In Bacterial vaccines. Ed Germainier, R. Academic Press. 1984. pp 137-165.

- 21.- Germanier, R. situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Bol. of Sant. Panam. 1977. 82:300-311.
- 22.- Wahdan, L.I., Serie, C. Cerisier. y . Sallam, S. and Germanier, R. Controlled field trial of live Salmonella typhi. Three years results. J. Infect. Dis 1982. 145:292-293.
- 23.- Centers for disease control. typhoid Immunization. Recommendations of the Immunization.- Practices Advisory Committee Morbidity and Mortality Weekly Report. 39:1-5. Atlanta, Georgia, USA. 1990.
- 24.- Robbins, J.D. and Robbins, J.B. Re-examination the immunopathogenic role of capsular polysaccharide (Vi antigen) of Salmonella typhi. J. Infect. Dis. 1984. 150:436-449.
- 25.- SZU, S.C., Stone, A.L., Robbins, J.D., Schneerson, R. y Robbins, J.B. Vi capsular polysaccharide- protein conjugates for prevention of typhoid fever. J. Exp Med 1987.
- 26.- Warren, J. W. and Hornik, R. Immunization against typhoid fever. Ann. Rev. Med. 1979. 30:457-472.
- 27.- Felix, A.; Krikorin, K.S. and Reitler, R. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J. Hyg. 1935. 35:421-427.
- 28.- Acharya, I.L.; Lowe C.L.; Thapa, R.; Gurubhacharya, V. L;

Shrestha, K.; Bect, D.; Cadoz, M.; Schulz, D.; Armand, J. Bry-  
le, D.A. Trollifors, B.; Cramton, P.; Scheerson, R. and Ro-  
bbins, J. B. Prevention of typhoid fever in Welo with the Vi  
capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary re-  
port. N. Engl. J. Med. 1987. 317:1101-1104.

29.- Klugman, K.P.; Koornhof, H.J.; Gilbertson, I.T.; Robbins  
J.B.; Schnerson, R.; Schultz, D.; Cadoz, M.; Armand, J. and  
The vaccination advisory committee protective activity of Vi  
capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. Lancet  
. 1987. 11:1165-1169.

30.- Eisen, H.N. y Siskind, G.W. Variations in affinities of  
antibodies during the immune response. Biochemistry 1969.  
3:996-1008.

31.- Tully, J.G., Gaines, S. and Tigertt, L.D. Studies on in-  
fection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role  
of H antigen in protection. J. Infect. Dis. 1963. 112:113-  
124.

32.- Johnson, W. Ribosomal vaccines. I. Immunogenicity of ri-  
bosomal fraction isolated from *Salmonella typhimurium* and  
*Yersinia pestis*. Infect. Immun. 1972. 5:947-952.

33.- Smith, R.A. y Biegly, M.J. Ribonucleic acid protein frac-  
tions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immuno-  
gen. Infect. Immun. 1972. 6: 373-383.



- 34.- Einsenstein, T.K. Evidence for antigen as the antigenic in ribosomal vaccines prepared from Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 1975. 12 :364-367.
- 35.- Misfeldt, M.L. and Johnson, W. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 1976. 14:652-659.
- 36.- Misfeldt, M.L. and Johnson, W. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from Salmonella typhimurium. Infect Immun. 1977. 17:93-104.
- 37.- Germanier, R.1936. The live oral typhoid vaccine Ty21a: Recent field trial results. Scavo International Conference on Bacterial Vaccines and local Immunity. Siena, Italy, pp10-12.
- 38.- Daniels, F.M. Scheerson, R. Egen, W.M. Szu.S.C. y Robbins, J.B. 1989. Characterization of the Salmonella paratyphi C Vi polysaccharide Infect Immun 57: 3159-3164.
- 39.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the follin phenol reagent J. Biol chem. 193:265-275.
- 40.- UNANUE, E.R. Antigen. presenting function of the macrophage. Annu. Rev Immunol. 1984. 2: 395-428.
- 41.- Gaines, S.A.; Sprinz, A. y Tully, J. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of Salmonella typhi in chimpanzee tissue following oral

- challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological lesions. J. Infect. Dis. 1968. 118: 239-306.
- 42.- O'Brien, J.D. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1986. 124:37.
- 43.- Spaun, J. Studies on the immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. Bull. WHO. 1964. 31:793-799.
- 44.- Kumate, J. Fiebre tifoidea. En Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del hospital Infantil de México. 1980.
- 45.- Osborn, M.J.; Gender, J.E.; Parisi, E, y Carson, J. 1972. Mechanism and assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247:3962-3974.
- 46.- Schnaitman, C.A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia Coli* by triton X-100. J. Bacteriol. 109:545-552.
- 47.- Miura, T, and Mizushima, S. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of *Escherichia coli* K-12. Biochim. Biophys. Acta. 1968. 150: 159-161.

- 48.- Lugtenberg, B, y Van Alphen, L. Molecular architecture and functioning of outer membrane of Escherichia coli and other gram-negative bacteria. Biochem. Biophys. Acta. 1983. 737:51-115.
- 49.- Kussi, N. Nurminen, M.; Saxen, H. Valtonen, M. y Makela, P.H. Immunization with major outer membrane protein (porin). preparations in Experimental Infect. Immun. 1981. 34: 328-332
- 50.- Guling, P.A., McCracken, G.H., Frich, C.F., Johnston, K.H y Hensen, E.J. Antibody response of infants to cell surface exposed outer membrane proteins of Haemophilus influenzae type b after systemic Haemophilus disease. Infect Immun. 1982. 37: 32-38.
- 51.- Adamus, G., Mulczka, M. Witkoska, D. y Romonowska, E. protection against Keratoconjunctivitis shigella induced by immunization with outer membrane proteins of shigella sp. Infect Immun. 1980. 30:321-324.
- 52.- Gilleland, H.E., Parker, M.G. Matthews, J.W. y Berg, R.D. Use of purified outer membrane protein F (porin). preparation of Pseudomonas aeruginosa as a protective vaccine in mice'. Infect. Immun. 1984. 44:49-54.
- 53.- Kussi, N., Nurminen, M.; Saxen, H.; Valtonen, M. y Makela, P.H. Immunization with major outer membrane proteins in expe-

- rimental Salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 1979. 25:857-862
- 54.- Kussi, N.; Hurmien, M. Saxon, H. y Makela, E.H. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Salmonellosis; Effect of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1981. 34: 323-332.
- 55.- Eisen, H.N. y Siskind, G.W. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 1969. 3: 996-1003.
- 56.- Isibasi, I., Ortiz, V., Vargas, M., Panisagua, 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, 12, Vi:d Infection. *Immun.* 56:2953-2959.
- 57.- Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Panisagua, J., Pelayo, R., Mui, M., Gonzalez, C.R., Garcia, J.A. Y Kumate, J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine*. Enviado a publicación.
- 58.- Nikaido, H. y Vaara, M. 1985. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. rev.* 49:1-32.
- 59.- Mendrel, R.E. y Zollinger, W.D. 1989. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural

infection of vaccination. Infect. Immun. 57:1590-1598.

60.- Datta, J.B., Arden, B. y Henning, U. 1977. Major protein of *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J. Bacteriol. 128:321-329.

61.- Schweizer, M. y Henning, U. 1977. Action of major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 108: 553-563.

62.- Di Rienzo, J.M., Nakamura, K. e Inouye, M. 1987. The outer membrane proteins of gram negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. Annu. Rev. Biochem. 47: 431-532.

63.- Ortíz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E. y Kumate, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27: 1640-1645.

64.- Rosenbusch, J.P. 1987. Three Dimensional Structure of Membrane proteins. En: Mseyori Inouye (Eds). Bacterial outer membranes as model systems. John Wiley and Sons. USA. 142 -162

65.- Panisagua- Solís, J.F. 1990. Aislamiento y caracterización de porinas de *Salmonella typhi* capaces de inducir inmunidad protectora en un modelo murino. Tesis Maestría en Ciencias Biomédicas - Inmunología.- Facultad de Medicina, U.N.A.M. México D.F.

- 66.- Isibasi A, Ortiz V, Moreno J, Paniagua J, Vargas M, Gonzalez C, y Kumate J. 1988. The role of outer membrane proteins from Gram negative as vaccine with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against. S. Typhi porins. En: Corredo LE, Todd LE, Packer L y Jaz J eds. Cell Function and disease. Plenum Press, N.Y., U.S.A. pp 281-292.
- 67.- Hancock, R.E.W. 1987. Role of porins in outer membrane permeability. J. bacteriol. 169:929-933.
- 68.- Hoop, T.F. y Woods, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824.
- 69.- Reitman, M. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent Salmonella typhosa. J. Infect. Dis 1967. 117:101-107
- 70.- Nikaido, H, y Veera, M. 1987. Outer Membrane. En: Neidhardt f.c. (Ed). Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, d.c. 7-22.
- 71.- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-635.
72. Towbin H.T. Strehlin, T. Gordon J. 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets

procedure and some applications. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
76:4350-4354.

73.-Schnitman, G.A. 1970. Examination of protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriol. 104:882-889.

74.-Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry 8:874-879.

75.-Svensson, H. Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. Acta. Chem. Scand. 15-(1961) 325-341.

76.-Svensson, H. Isoelectric fractionation and characterization of Ampholines in natural pH gradients. II Buffering capacity and conductance of isoinic ampholytes. Acta Chem Scand 16 (1962) 456-466.

77.-Svensson, H. Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. III Description of apparatus for electrolysis in columns stabilized by density gradients and direct determination of isoelectric points. Arch. Biochem. Biophys. Suppl (1962) 132-136.

- 78.-Fredriksson, S. On the temperature dependence of isoelectric points of proteins with special reference to isoelectric focusing. In "Electrofocusing and Isoelectrophoresis". Berlin and New York, 1977, pp71-83.
- 79.-Vesterberg, O. Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes. *Acta. Chem. Scand.* 23 (1969) 2653-2666.
- 30.-Williams, K. W., Soderberg, L. A carrier ampholyte for isoelectric focusing. International Laboratory No. 1979.
- 81.-Laas, P. Olsson, I., Soderberg, L. High-voltage isoelectric focusing with Pharmalyte; Field strength and temperature distribution zone sharpening, isoelectric spectra and pI determinations. *Anal. Biochem.* 101 (1980) 449-461.
- 82.-Cassimopoulos, N. Isoelectric focusing: Fundamental aspects. *Separation Science* 10 (1975) 55-76.
- 83.-Righetti, P.G., Tudor, G., EK, K. Isoelectric points and molecular weights of proteins. A new table. *J. Chromatogr.* 220 (1981) 115-194.