

14  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

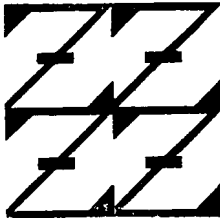
MAPEO DE DOS EPITOPOS DE LA  
PORINA Omp C de *Salmonella typhi*

T E S I S

Que para obtener el Título de  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

p r e s e n t a

VICENTA CAZARES DOMINGUEZ



México, D. F.

1994

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.

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; bajo la tutoría del M. en C. Jorge F. Paniagua Solís.**

Agradezco sinceramente al Dr. Armando Isibasi Araujo, el haberme brindado la oportunidad de realizar éste trabajo en su laboratorio.

A Jorge F. Paniagua Solís por su apoyo y comprensión para llegar a una culminación exitosa de este trabajo de tesis.

Al Dr. Vianney Ortíz le agradezco el haberme considerado una persona digna de su confianza y el haberme brindado su amistad.

Deseo expresar mi gratitud a mis compañeros y amigos de laboratorio por su ayuda durante mi estancia en el laboratorio.

**Con mucho amor dedico este  
trabajo a mis padres.**

Con admiración ...

A los hombres comprometidos consigo mismo, conscientes de su naturaleza, situación y potencial, en búsqueda continua de nuevos retos y excelencia, que les permitan sentirse satisfechos en las diferentes etapas y actividades de su vida.

Con respeto ...

A los hombres que intuyen su naturaleza y su potencial, pero que carecen de capacidad de decisión para salir de su cautiverio.

Y con esperanza ...

A los hombres con espíritu y actitud de dependencia, que desconocen su naturaleza y su potencial y viven en el mar de la insatisfacción y de la mediocridad.

## CONTENIDO

I.	RESUMEN.	1
II.	INTRODUCCION.	2
III.	FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.	13
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	15
V.	OBJETIVOS.	16
VI.	HIPOTESIS.	17
VII.	MATERIAL Y METODOS.	18
VIII.	RESULTADOS.	28
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS.	38
X.	CONCLUSIONES .	46
XI.	PERSPECTIVAS.	47
XII.	BIBLIOGRAFIA.	48
XIII.	APENDICE.	57

## PRINCIPALES ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina (por sus siglas en Inglés).
<b>CPH</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno.
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal Media
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido.
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida.
<b>Fab</b>	Fragmento de las Inmunoglobulinas que se une al Antígeno.
<b>FACS</b>	Análisis por Citometría de Flujo (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína.
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina.
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M.
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G.
<b>KDa</b>	Kilodaltones.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido.
<b>NIH</b>	Cepa de Ratones de los Institutos Nacionales de Salud de U.S.A. (por sus siglas en inglés).
<b>NP-40</b>	Nonidet P-40.
<b>Omp</b>	Proteína de Membrana Externa (por sus siglas en Inglés).
<b>Omp C</b>	Proteína de Membrana Externa Inducible a Concentraciones Elevadas de Sales y Temperaturas Altas.
<b>rOmp C</b>	Porina Recombinante.
<b>Omp F</b>	Proteína de Membrana Externa Inducible a Bajas concentraciones de Sales y Temperaturas También Bajas.
<b>OPD</b>	Orto-fenilendiamina.
<b>PMEs</b>	Proteínas de Membrana Externa.
<b>PCGENE</b>	Paquete Computacional de Programas que Analizan Secuencias de Proteínas y Ácidos Nucleicos.
<b>PBS</b>	Buffer de Fosfatos Salino (por sus siglas en Inglés).
<b>PBS-T</b>	Buffer de Fosfatos Salino con Tween-20.
<b>PhO E</b>	Proteína de Membrana Externa Inducible a Concentraciones Bajas de Fosfatos.
<b>PI</b>	Punto Isoeléctrico.
<b>PNC</b>	Papel de Nitrocelulosa.
<b>PPO</b>	2,5 Diphenyloxazole.
<b>SAC</b>	Suspensión de <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan.
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio.
<b>TCR</b>	Receptor para el Antígeno de Células T.



## I.- RESUMEN

Con el objeto de identificar regiones antigénicas de la porina *Omp C* de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, la secuencia de ésta se analizó mediante algoritmos de predicción de epitopos para linfocitos B. Se seleccionaron dos regiones 246-254 y 285-303, por presentar características reportadas como típicas de los epitopos reconocidos por linfocitos B y posteriormente se sintetizaron en fase sólida.

Con estos péptidos se inmunizaron ratones y se obtuvieron anticuerpos dirigidos contra estas regiones. Se titularon los sueros en ensayos de ELISA usando como antígeno a la porina *rOmp C*, el reconocimiento de estos anticuerpos hacia la porina nativa, nos permiten afirmar que los péptidos elegidos constituyen determinantes antigénicos expuestos en la porina. Después se analizó la capacidad de estos anticuerpos para reconocer a la bacteria completa, el análisis por citometría de flujo demostró que estas regiones se localizan en la superficie de la bacteria, por lo tanto son reconocidas por linfocitos B. Y para determinar si los anticuerpos anti-péptido son capaces de hacer un reconocimiento diferencial entre PMEs, se llevaron a cabo ensayos de ELISA con PMEs de diferentes cepas de *Salmonella* y *Escherichia*, así como un ensayo de inmunoprecipitación. En ambos estudios se encontró que los sueros policlonales no son capaces de distinguir entre *Salmonella* y *Escherichia*, debido a la similitud que existe entre las PMEs de ambas cepas y a la policlonalidad del mismo.

Se concluye que los péptidos 246-254 y 285-303 están expuestos en la porina y en la superficie de la bacteria, lo que permite afirmar que son epitopos de B, que podrían jugar un papel importante en el control de la infección, mediada por complemento.

## II.-INTRODUCCION

### Porinas

Las porinas son las principales proteínas de membrana externa de las bacterias Gram negativas, éstas proteínas con pesos moleculares de 38 a 40 KDa, se ensamblan como trímeros y forman poros o canales que permiten la difusión facilitada de pequeñas moléculas hidrofílicas al interior de la bacteria (36).

Las porinas identificadas en *Escherichia coli* y en *Salmonella typhimurium*, son Omp C, Omp F y Pho E, mientras que Omp D, al parecer es exclusiva de *Salmonella typhimurium*. De acuerdo a su secuencia nucleotídica estas cuatro porinas presentan una homología de hasta el 69%, lo que sugiere un origen ancestral común y explica sus similitudes en peso molecular, punto isoeléctrico y papel biológico y solo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos. La estructura de las porinas presentan una gran estabilidad en presencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), y las sales biliares, son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas (35,36).

### Estructura de las porinas.

Dentro de la familia de porinas de *Escherichia* y *Salmonella*, las más estudiadas son Omp F y Pho E de *Escherichia coli*, pero debido a su gran homología se considera que la

estructura de las otras porinas es muy similar y se sabe que están formadas por tres monómeros idénticos de forma cilíndrica semejante a un barril (12).

El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio, su composición de aminoácidos indica una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45% , con un punto isoelectrico de alrededor de 4.5. Los estudios cristalográficos más recientes realizados en Omp F y Pho E, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril  $\beta$  formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas  $\alpha$  hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras  $\beta$  de manera Pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja  $\beta$ -16 y el extremo amino de la hoja  $\beta$ 1 (12).

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal. La entrada del poro está restringida por las asas largas y disperejas que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 Å a 19 Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15 x 22 Å, y está definida por las vueltas  $\beta$ . El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas, y por tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros (12).

Los monómeros de las porinas se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa y formar trímeros (6). Contrariamente a lo que antes se pensaba, los canales no se fusionan entre sí, sino que permanecen separados a lo largo del trímero por una distancia de aproximadamente 35 Å (12).

La principal contribución a la formación del trímero es el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas B 1-5 y B 16, donde los diez residuos carboxilo de la región B 16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y estabilidad de las porinas (10,49).

#### Expresión y función de las porinas.

Las porinas se encuentran en la superficie de la bacteria en cantidad relativamente elevada, pueden estar expresadas con más de 100 000 copias por célula, por lo que constituyen una de las proteínas más abundantes en términos de masa (35,36).

Las condiciones de crecimiento, como la osmolaridad y la temperatura, regulan la expresión de las porinas. En un medio de cultivo común (que contenga fuentes de carbono, nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales), solo Omp F, Omp C y Omp D se producen; ya que pho E únicamente se expresa bajo condiciones de escasez de fosfatos (38,26). La expresión de Omp F se reprime por la temperatura y la osmolaridad elevadas, por lo que algunas cepas prácticamente no sintetizan esta proteína a 37° C ni en presencia

de aproximadamente 0.9% de NaCl. Por el contrario, la expresión de Omp C, se ve favorecida con niveles elevados de sales (36). Tabla 1

La fisiología de las porinas como canales posiblemente se justifica como un medio de supervivencia de las bacterias en el ambiente del hospedero, rico en sales biliares. De manera que las porinas son ideales para repeler estos compuestos hidrofóbicos cargados negativamente (36).

Al realizar estudios *in vitro* en los que se reconstituyen las porinas en membranas lipídicas, se ha demostrado que las porinas de *Escherichia coli* son permeables a trisacáridos y tetrapéptidos, lo cual implica que permiten el paso de nutrientes y iones a través de la membrana externa de la bacteria (6).

No hay información que muestre la especificidad del poro hacia los solutos, sino que aparentemente son las propiedades fisicoquímicas de los solutos las que determinan su velocidad de difusión a través de la porina, siendo tres las principales: a) el tamaño, b) la carga eléctrica y c) la hidrofobicidad del soluto.

#### Inmunogenicidad de las porinas de *Salmonella typhi*

La estructura de las porinas de *Salmonella typhi* no ha sido estudiada, sin embargo, se cuenta con suficientes evidencias para decir que desempeñan un papel importante en la

inducción de una respuesta inmune contra la fiebre tifoidea (9,12,21,22,24,37).

Isibasi y colaboradores, empleando un modelo murino han demostrado que la inmunización con un complejo de proteínas de membrana externa (PMEs) de *Salmonella typhi*, induce una respuesta inmune protectora, contra el reto de la bacteria homóloga hasta con 1000 DL<sub>50</sub>, en cambio esta protección disminuye al retar con *Salmonella typhimurium* en las mismas condiciones (24).

Se demostró que un suero anti-proteínas de membrana externa (PMEs) de *Salmonella typhi*, empleado para inducir protección pasiva en ratones, reconoció con mayor intensidad a las porinas de las diferentes cepas de *Salmonella* utilizadas en un ensayo de inmunoelectrotransferencia. Este hecho evidenció que las porinas podrían ser los antígenos responsables de la inducción de protección (24).

El empleo de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d confirió una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub> en el modelo murino mientras que los anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido no indujeron protección (39).

Las porinas de *Salmonella typhi* son también inmunogénicas en el humano. Esto se demostró, al evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes con fiebre tifoidea en fase convaleciente, se encontraron anticuerpos de clase IgG dirigidos contra ellas (37). De igual

modo, la administración de la vacuna antitifoídica oral indujo la producción de anticuerpos anti-porinas en los sujetos estudiados (9).

Se demostró que las porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* son capaces de inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos de ratones NIH inmunizados con PMEs de *Salmonella typhi*, y más aún, que la respuesta a las porinas de *Salmonella typhi* no se debió a la presencia de LPS (19).

Posteriormente la inmunización con cantidades tan pequeñas como 10  $\mu$ g de porinas purificadas de *Salmonella typhi*, confirió protección al 90% de los ratones NIH retados con 500 DL<sub>50</sub> de la misma bacteria. En cambio no se indujo protección al reto con *Salmonella typhimurium* en las mismas condiciones, lo cual demuestra una respuesta especie-específica hacia las porinas (22).

Con el fin de continuar el estudio del papel inmunológico de las porinas en la respuesta inmune contra la infección por *Salmonella typhi* en el modelo murino, se inició la identificación mediante algoritmos de predicción de epitopos de las regiones antigénicas reconocibles por linfocitos B, en la porina Omp C de *Salmonella typhi*.

**Tabla 1. Características de las porinas de:  
a) *Escherichia coli* y b) *Salmonella typhimurium* (12,36)**

PORINA	Receptor a Fagos o Colicinas	Peso Molecular KDa	Diámetro Aproximado (nm)	Regulación de la Síntesis
Omp F	a) Tul a, T2, TP1, TP2	32.7	1.2	Reprimida por alta osmolaridad
	b) TP5, Col A	39.3	1.2	
C	a) Tul b, Mel PA2,434,SSI, TP5, TP6	36.0	1.1	Desreprimida por alta osmolaridad
	b) PH42, PH105 PH221	39.8	1.3	
Omp D	a) No tiene b) PH31, PH42, PH51	No tiene 38.0	No tiene 1.3	Dependiente de AMPc
Pho E	a) TC23, TC45	36.8	1.2	Desreprimida por escasez de fosfatos.
	b) No identif.	36.0	1.2	

### Epitopos.

La antigenicidad de una proteína reside en una parte restringida de la molécula conocida como determinante antigénico o epitopo. Esta región está accesible en la superficie de la molécula y es reconocida por los paratopos o sitios de unión específica de una molécula de anticuerpo. Los paratopos están presentes en los extremos de cada uno de los Fab de los anticuerpos y consisten en regiones hipervariables de residuos que se unen al antígeno (42).



Con base en el estudio de un gran número de regiones identificadas en diversas proteínas, se ha podido establecer que:

1.- Los epitopos reconocidos por linfocitos T necesitan que el antígeno sea procesado por una célula presentadora de antígeno (CPA), y lo reconoce en el contexto de moléculas de histocompatibilidad. El linfocito T realiza este reconocimiento a través de su receptor de membrana TCR. Actualmente Rammensee (15,16,45) ha demostrado la presencia de patrones denominados **motifs** en las secuencias reconocidas en la molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad del ratón y generalmente corresponden de 8 a 9 aminoácidos, de la misma manera también se han reportado las secuencias para la molécula de clase II (29,44) siendo de 15 a 16 aminoácidos. En ambos casos éstas secuencias corresponden a un haplotipo determinado.

2.- Los epitopos reconocidos por linfocitos B consisten en aminoácidos que pueden o no ser contiguos en la secuencia, pero que se encuentran unidos en la superficie de la proteína debido al plegamiento de la cadena polipeptídica (52).

## Métodos de predicción de epitopos.

### - Algoritmos de predicción.

Los algoritmos de predicción se han utilizado principalmente para dilucidar la estructura secundaria y terciaria de proteínas partiendo de su secuencia de aminoácidos. Estos han tenido más éxito para las proteínas globulares. Sin embargo, en el caso de proteínas transmembranales, la limitante es que muy pocas de éstas han sido cristalizadas y analizadas por difracción de rayos X (17,49,13).

Para la búsqueda de cualquier estructura en una proteína, hélices hojas plegadas, o en nuestro caso sitios antigénicos, se deben conocer las funciones y objetivos de los algoritmos y a la par considerar los datos experimentales y características de la secuencia en estudio. Esto nos permitirá elegir el método adecuado aplicable al caso de predicción (17).

A continuación se señalan algunas de las características generales de los sistemas de predicción: (8,18,32,33):

1.- Buscan una propiedad estructural o figura que se relacione con el sitio antigénico. En este sentido la predicción de sitios de células T a partir de una secuencia, es más adecuada que para la de epitopos de B si consideramos que los sitios reconocidos por linfocitos T siempre son fragmentos del antígeno, péptidos, asociados a una molécula del

complejo principal de histocompatibilidad en la superficie de una célula presentadora. Lo cual no involucra el reconocimiento de alguna conformación espacial como en el caso de epitopos de B que reconocen al antígeno en su forma nativa.

2.- Evalúan la significancia estadística de la correlación entre esta propiedad y el sitio de estudio. Es decir, para ser útil en predicción no debe aparecer muy frecuentemente en toda la secuencia.

3.- La evaluación del algoritmo se realiza comparando los sitios antigénicos predichos con los sitios reportados como inmunodominantes en una base de datos.

Se ha empleado una variedad de técnicas para la búsqueda de estos sitios antigénicos dentro de las proteínas. Entre ellas las más utilizadas han sido la fragmentación química o enzimática de la proteína, la clonación de fragmentos genéticos, y la elaboración de péptidos sintéticos. Recientemente, con la introducción de los métodos que permiten la síntesis simultánea de muchas secuencias cortas, los péptidos sintéticos se han empleado como el medio primario para la identificación de los epitopos (46).

Una estrategia para el mapeo de epitopos puede ser la de sintetizar varios péptidos con secuencias traslapadas que en total abarquen la secuencia completa de la proteína. Sin embargo, esto resulta demasiado costoso y laborioso, por lo que otra alternativa es la síntesis de péptidos seleccionados mediante una predicción de epitopos.

En la actualidad se cuenta con diversos programas computacionales elaborados a partir de estudios y modelos matemáticos, los cuales permiten establecer predicciones de las regiones de la proteína que puedan ser antigénicas.

Por otro lado se ha descrito, que entre las características más importantes de los epitopos para inducir la respuesta inmune de la célula B, se encuentran las de ser las secuencias más expuestas en la superficie de la proteína, ser altamente hidrofílicas, cargadas y flexibles. Para establecer las predicciones de epitopos reconocibles por células B se tienen varios programas. El programa ANTIGEN (5), asigna un valor de hidrofiliidad a cada aminoácido de la proteína, de acuerdo a la escala de Levitt (20), y tomando fragmentos de seis aminoácidos, promedia sus valores. Así analiza regiones superpuestas a lo largo de toda la secuencia y selecciona la región más hidrofílica como un probable determinante antigénico. FLEXPPO, basa sus predicciones en el modelo de flexibilidad o movilidad de los antígenos, estudiado por Karpluz y Schulz. Con base en estudios de resonancia magnética nuclear y análisis cristalográficos a muy alta resolución, se determinaron coeficientes de agitación térmica (valores Debye-Waller), que representan el desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio determinado de posiciones (27). Tomando en cuenta el factor Debye-Waller para el carbono alfa de los aminoácidos, el algoritmo selecciona aquellas regiones a lo largo de la secuencia, que muestren los valores de movilidad más elevados (5).

### III.- FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa, causada por la ingestión e invasión masiva de *Salmonella typhi*. Se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia (28).

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

Esta enfermedad continúa siendo un problema de salud pública 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 América 20.8 casos/100,000 habitantes y en México 13.64 casos/100,000 habitantes (1).

En la actualidad la vacuna autorizada por la OMS, elaborada a partir de la bacteria completa, no es eficaz ya que presenta reacciones secundarias por la presencia de endotoxina, no induce memoria y su período de protección es corto (30). Por tal motivo es necesario obtener una nueva vacuna, que no presente efectos colaterales adversos y la

protección generada sea de larga duración.

Isibasi y colaboradores, empleando un modelo murino, han demostrado que la inmunización con un complejo de proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* y dentro de ellas las denominadas porinas (PM entre 38 y 42 KDa) inducen una respuesta inmune protectora, contra el reto de la bacteria homóloga, hasta con 500 DL<sub>50</sub>. Por lo que se propuso, que el mecanismo efector, en el control de la infección, es la activación del complemento por su vía clásica, la cual es disparada por la presencia de los anticuerpos anti-porinas, sobre la superficie de la bacteria (37).

Las porinas están presentes en la membrana de las bacterias Gram-negativas y son: Omp C, Omp D, Omp F y pho E. Para el caso de *Salmonella typhi*, la porina más estudiada es la denominada Omp C, de la cual se conoce el gen que codifica para su síntesis (41), así mismo se sabe que esta proteína participa parcialmente en la inducción de protección (23), por lo cual en el laboratorio, se decidió utilizarla como modelo para estudiar los mecanismos involucrados en el control de la infección.

#### IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La porina Omp C de *Salmonella typhi* es una molécula compleja y por lo tanto constituida de muchos epitopos, de los cuales algunos están expuestos en la superficie de la bacteria y son reconocidos por linfocitos B.

Con la finalidad de identificar, dichas regiones expuestas de la porina Omp C, se decidió realizar un mapeo de epitopos. Para iniciar el trabajo se predijeron las regiones potencialmente expuestas de la proteína (39) y en este trabajo se analizan las regiones comprendidas entre los aminoácidos 246-254 y 285-303; utilizando péptidos sintéticos acoplados a resina y sueros policlonales derivados de la inmunización con los mismos.

## V.- OBJETIVOS.

### Objetivo General

Mapear dos epitopos, para linfocitos B, de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, que sean potencialmente antigénicos.

### Objetivos Particulares.

-Caracterizar proteínas de membrana externa (PMEs) y porinas de diferentes especies de *Salmonella* y *Escherichia*.

-Sintetizar las regiones 246-254 y 285-303 de la porina Omp C.

-Obtener un suero hiperinmune dirigido contra las regiones 246-254 y 285-303.

-Analizar la capacidad de los anticuerpos anti-peptido para reconocer a la porina sobre la bacteria completa.

-Analizar si estos anticuerpos policlonales son capaces de realizar un reconocimiento diferencial entre especies de *Salmonella* y *Escherichia*.



## VI.- HIPOTESIS

Los epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi* (246-254) y (285-303), seleccionados mediante un programa computacional, son regiones expuestas en la superficie de la bacteria y van a ser reconocidas por los anticuerpos generados contra esos epitopos. De la misma manera estos anticuerpos reconocerán a la proteína nativa y a la bacteria completa.

## VII.- MATERIAL Y METODOS.

### Métodos bacteriológicos.

#### - Cepas Bacterianas.

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea. *Salmonella typhi* O 901, *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pSt13 (expresa rOmp C), *Escherichia coli* UH302, *Escherichia coli* UH302/pSt13 (expresa rOmp C) y *Staphylococcus aureus*.

#### - Cultivo de Bacterias.

Las bacterias empleadas para la obtención de PMEs se cultivaron en agitación a 200 rpm durante 8 horas, a 37°C en medio Luria. Posteriormente las bacterias se cosecharon, en fase de crecimiento logarítmica, por centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de PBS pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

### Métodos bioquímicos.

#### - Aislamiento de PME.

La obtención de PMEs de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman (47,48), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmica se ajustaron a una densidad óptica de 1.2 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación (VIBRA CELL) a 180 watts, por periodos de 2 minutos en baño de hielo hasta disminuir la absorbancia a 0.2. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, ésta se centrifugó a 7000 rpm, durante 15 minutos, del sobrenadante se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a 35 000 rpm 45 minutos a 4°C (L8 80 Beckman Instruments, Inc), la pastilla se solubilizó con tritón X-100 al 2% en Hepes 0.01 M pH 7.4. La fracción insoluble en tritón X-100 (membrana externa y peptidoglicana) se sedimentó por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas y para lograr la extracción de las PMEs se resuspendió en Tris-HCl pH 7.2 que contenía tritón X-100 al 2% y 5 mM de EDTA, se incubó durante 10 minutos a 37°C y posteriormente se ultracentrifugó a 35 000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Las PMEs se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -20°C hasta que se utilizaron.

### Métodos analíticos.

#### - Cuantificación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas; se realizó de acuerdo al método de Lowry (31) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co).

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

La SDS-PAGE (11) de PME se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.5% de acrilamida, .3% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0,13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

El corrimiento electroforético se llevó acabo empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente los geles se tiñeron durante dos horas, en una solución de azul de Coomassie

R-250 al 0.25% en metanol ácido acético-agua (45:10:45). Se decoloraron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel quedó transparente.

- Ensayo inmunoenzimático en fase sólida: ELISA.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-péptidos en los sueros de ratón se empleó el método de ELISA (14). Para ello, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.), con 10 µg/ml de porinas purificadas de *Salmonella typhi* y 30 µg/ml de las diferentes PME's obtenidas. (*Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, *Salmonella typhi* O 901, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* UH302, *Escherichia coli* DH5α y *Escherichia coli* UH302/pst13), en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio pH 9.5), 2 horas a 37°C y después a 4°C toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se lavó 5 veces con PBS-T [Tween-20 al 0.01% en PBS (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M pH 7.6)], y se llenaron los pozos con solución de bloqueo (PBS-leche al 5%), se incubaron 3 horas a 37°C, posteriormente se adicionaron 100 µl de los sueros a diferentes diluciones desde 1:50 hasta 1:3200, y se incubó la placa durante 3 horas a 37°C, después de 5 lavados con PBS-T se agregaron 100 µl de conjugado (Inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo o ratón conjugadas a peroxidasa, Sigma Co.) se incubó la placa 2 horas a 37°C después se lavó 10 veces con PBS-T para posteriormente agregar 100 µl de solución de sustrato orto-fenilendiamina (OPD) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en amortiguador de citratos pH 5.6, y a los 30 minutos la reacción se detuvo agregando una gota de ácido

sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2.5 N. Los pozos se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II Dynatec).

### Inmunoprecipitación

- Marcaje de la bacteria.

Se cultivaron toda la noche en medio Luria (1% triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl, pH 7.5) las bacterias: *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d y *Escherichia coli* K12. Después se hizo una dilución de los cultivos hasta obtener una densidad óptica de 0.1 - 0.2 a 600 nm en 5 ml de medio M9 (0.6%  $\text{NaHPO}_4$ , 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5% NaCl, 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  1 M, glucosa al 20% y  $\text{CaCl}_2$  pH 7.4), incubándose a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 y entonces se adicionaron 100  $\mu\text{Ci}$  a cada cultivo de  $\text{S}^{35}$ - Metionina y se incubaron 30 minutos a 37°C con aereación, posteriormente se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos y se lavaron 2 veces con solución salina isotónica, resuspendiendo la pastilla en medio Birni I (glucosa 50 mM, Tris HCl pH 8, 25 mM y EDTA 10 mM.) 10% p/v y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, nuevamente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, la pastilla así obtenida se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%), y se adicionaron en fresco inhibidores de proteasas (PMSF, Leupeptina, Aprotinina y Pepstatin), después se incubaron a 4°C por una hora, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 minutos, guardándose el sobrenadante de lisis a -20°C, hasta su uso (40).

#### - PreadSORCIÓN

En tubos eppendorf se colocaron 200  $\mu$ l de una suspensión de *Staphylococcus aureus* y se adicionaron los sobrenadantes de lisis de las bacterias cultivadas, junto con 20  $\mu$ l de suero normal de ratón y se dejó agitando toda la noche a 4°C, al día siguiente se centrifugó a 2500 rpm 10 minutos, se descartó el pellet y se volvió a repetir este paso dos veces más.

#### Obtención de la suspensión de *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC).

A partir de una colonia aislada de *Staphylococcus aureus* Cowan 1 cultivada toda la noche a 37°C en medio BHI (Infusión-Cerebro-Corazón), se inoculó a 50 ml de medio penassay (0.15% extracto de levadura, 0.15% extracto de carne, 0.5% peptona, 0.1% glucosa, 0.35% NaCl, 0.37%  $K_2HPO_4$ , 0.13%  $KH_2PO_4$ ), y se incubó a 37°C, con agitación toda la noche, al día siguiente éstos 50 ml se pasaron a un matraz de 1000 ml que contenía 500 ml del medio ya mencionado y se incubó en las mismas condiciones durante 8 horas, posteriormente se cosechó por centrifugación en botellas a 7000 rpm durante 15 minutos, a continuación se resuspendió la pastilla en PBS con 0.02% de azida de sodio y se lavó 2 veces con ésta misma solución, nuevamente se resuspendió la bacteria en PBS con azida de sodio al 0.02% 10% p/v. Inmediatamente después se colocó la bacteria en un matraz para ser agitado a temperatura ambiente y se adicionó lentamente formaldehído hasta llegar a una concentración final de 1.5% luego se dejó agitando durante 90 minutos a temperatura

ambiente, en seguida se centrifugó a 7000 rpm 15 minutos y la pastilla se resuspendió 10% p/v en PBS con 0.02% de azida de sodio. Posteriormente se preparó un baño de agua a 80°C en donde fue colocada la suspensión de SAC y mantenida así durante 5 minutos con agitación constante, transcurrido éste tiempo se transfirió a un baño de hielo y se lavó 3 veces. Se hicieron preparaciones de la suspensión SAC 10% v/v y se guardaron a 4°C, para su utilización.(40)

Se tomaron 100 µl de la suspensión SAC y se centrifugó a 10,000 rpm 10 minutos, al pellet se le adicionó el sobrenadante preadsorbido, se mezcló e incubó 30 minutos a 4°C, hasta entonces se le adicionaron los sueros adsorbidos dejándose a 4°C en un rotador toda la noche, y se repitió el ciclo dos veces más. Se desechó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces en buffer de lavado (Tris 50 mM, EDTA 5mM, NaCl 150 mM y NP 40 1% ), se lavó una vez más con Tris 10 mM pH 7.8, centrifugándose después y descartando el sobrenadante, después se resuspendió la pastilla en buffer muestra y se hirvieron durante 10 minutos, posteriormente se corrió un gel de electroforesis que contenía 11.5% de acrilamida, 0.3% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, β- mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%, Al final del corrimiento electroforético se colocó el gel en dimetil sulfóxido (DMSO) por una hora y con agitación a temperatura ambiente, después se agitó el gel a una solución de 2, 5, Dipheylloxazole (PPO) al 20% en DMSO a 37°C. y se lavó



con abundante agua hasta que se puso blanco. Después se colocó entre papel filtro y papel Kleen-Pack, posteriormente se secó en una bomba de vacío y se expuso a una placa de rayos X durante 3 días.

- Análisis por Citometría de Flujo (FACS).

En medio mínimo A se cultivó toda la noche una colonia de la bacteria, posteriormente se cosechó por centrifugación a 7000 rpm 10 minutos y se lavó el botón bacteriano 2 veces con PBS estéril y filtrado con un filtro de 0.22 micras, después se ajustó la densidad óptica a 0.6 de absorbancia a 540 nm ( $1 \times 10^9$  bacterias/ml), se hizo una dilución 1:10 para obtener  $1 \times 10^8$  bacterias/ml, con la solución de PBS, y después se repartió en tubos eppendorf colocando 1ml de la bacteria diluida en cada tubo, entonces se centrifugó a 10 000 rpm 10 minutos a 4°C y se dejó secar el botón, una vez seco se agregaron 30  $\mu$ l del suero problema (anti-péptido 246-254 y 285-303), incubándose a 4°C durante 1 hora con agitación, pasado éste tiempo se centrifugó en las condiciones ya descritas y se lavó la pastilla 2 veces con PBS para posteriormente adicionar el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:1000 en PBS y se incubó en las mismas condiciones que el suero, durante 30 minutos, nuevamente se centrifugó y se volvió a lavar la pastilla 2 veces con PBS, así mismo se dejó secar el botón y se agregaron 500  $\mu$ l de yoduro de propidio diluido 1:1000 en PBS y se hicieron las lecturas en el citómetro de flujo.

### Obtención del suero hiperinmune.

#### - Preparación del inmunógeno.

Los péptidos sintéticos fueron sonicados (Sonipret 150). Con agua desionizada, posteriormente se le adicionó un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund y se mezcló hasta formar una emulsión, la cual fue usada para la inmunización de los ratones.

### ESQUEMA DE INMUNIZACION

DIA	VIA	DOSIS	
		Resina-péptido	Péptido
0	i.p.	0.5 mg	10 µg
15	i.p.	0.5 mg	10 µ
22	retroorbital	Sangría	

#### - Adsorción del suero.

Debido a que los ratones utilizados han estado en contacto alguna vez con *Escherichia coli*, en el suero obtenido de los ratones inmunizados se encuentran presentes anticuerpos dirigidos contra esta bacteria y como la similitud es grande entre las porinas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, para evitar reacciones inespecíficas se procedió a realizar la adsorción de los sueros con la bacteria *Escherichia coli* de la manera siguiente:

Se cultivó en medio Luria durante toda la noche a 37°C, con agitación a la bacteria *Escherichia coli* y se centrifugó a 7000 rpm 10 minutos, se lavó la pastilla dos veces con solución salina, posteriormente fue resuspendida con los sueros anti-péptidos (246-254 y 285-303), incubándose a 4°C, toda la noche con agitación, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm 5 minutos y se descartó el pellet, repitiéndose el proceso 4 veces más.

## VIII. RESULTADOS.

### 1.- Péptidos.

Las predicciones de epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi* descritas en trabajos previos (34) se realizaron con los programas ANTIGEN y FLEXPROM del paquete PCGENE, de donde se eligieron las regiones comprendidas entre los aminoácidos 246-254 y 285-303 por presentar los valores máximos para los parámetros analizados y se procedió a sintetizarlos químicamente (2,4,46).

Después del alineamiento de las secuencias de las porinas Omp C de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se observó que la región comprendida entre los residuos 247-254 es específica de *Salmonella typhi* (Figura 1).

### 2.- Sueros anti-péptido.

#### A) Obtención de los sueros anti-péptido.

Después de inmunizar ratones C<sub>3</sub>H/Fej con los conjugados péptido-resina emulsificados en adyuvante completo de Freund, de acuerdo como se describió en materiales y métodos, los animales fueron sangrados 21 días después de la primera inmunización.

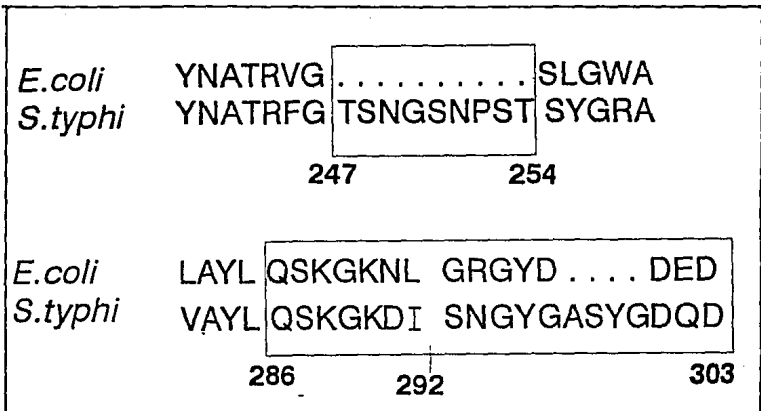


FIGURA 1

Alineamiento de dos epitopos para linfocitos B, predichos de la porina Omp C.

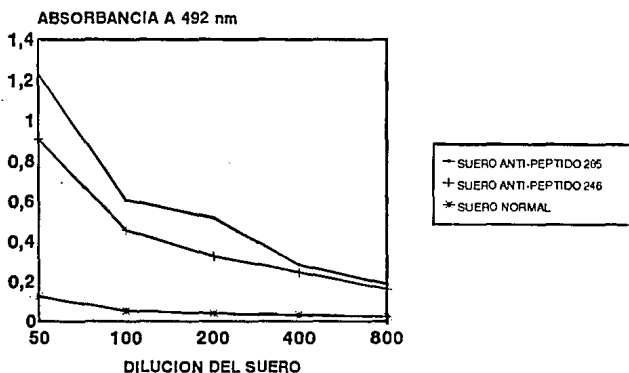
## B) Titulación de los sueros.

Se titularon los sueros anti-péptido 246-254 y 285-303, en ensayos de ELISA, empleando como antígeno a la porina rOmp C en su forma nativa (gráfica 1). Se observó que ambos sueros reconocen a la proteína nativa aproximadamente cinco veces más que el suero control. Estos resultados demuestran que las regiones predichas se encuentran expuestas en la porina.

## 3.- Análisis por citometría de flujo (FACS).

Se realizó un análisis por citometría de flujo, con la bacteria *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d y los sueros anti-péptido, en donde se observa que los sueros anti-péptido reconocen a la bacteria completa, indicado por el desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha, a diferencia del suero normal que no produce ningún desplazamiento (figura 2). Por lo tanto con estos resultados se demuestra que los péptidos 246-254 y 285-303 son regiones de la porina Omp C expuestas en la superficie de la bacteria, puesto que los anticuerpos generados contra esas regiones son capaces de reconocer a la bacteria intacta

# RECONOCIMIENTO DE LA PORINA NATIVA POR LOS SUEROS ANTI-PEPTIDO.



Gráfica 1.

Titulación de los sueros anti-péptido por ELISA, utilizando como antígeno a la porina rOmp C, en su forma nativa.

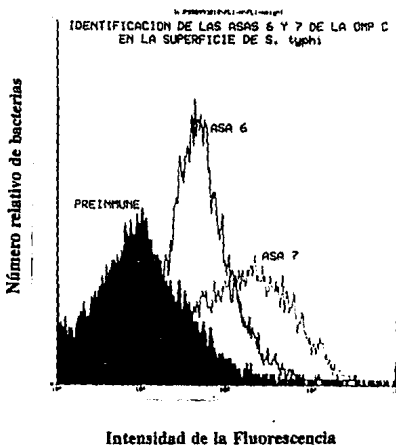


Figura 2.

Citometría de flujo de *Salmonella typhi* con anticuerpos anti-péptido. Localización en la superficie bacteriana de las regiones 246-254 (asa 6) y 285-303 (asa 7), se emplearon anticuerpos de ratón anti-péptido y como segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Sigma C.O) conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

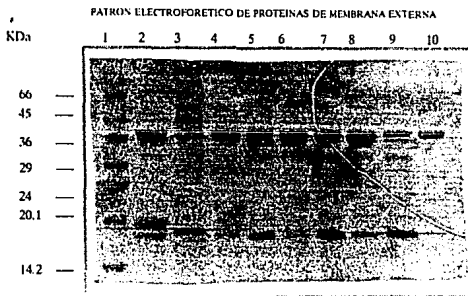


#### 4.- Aislamiento y caracterización de las proteínas de membrana externa.

Se obtuvieron proteínas de membrana externa de las bacterias Gram-negativas mediante el método de Schnaitman, las cuales se resuspendieron en buffer Tris-HCl pH 7.2, que contenía tritón X-100 al 2% y EDTA 5 Mm, posteriormente por el método de Lowry (31) se determinó la concentración de las mismas y se procedió a su caracterización realizando un corrimiento electroforético en condiciones reductoras (figura 3). Las proteínas obtenidas tuvieron pesos moleculares desde 14 hasta 70 KDa, observándose similitudes en todas las cepas en un grupo de proteínas con pesos moleculares de 38 a 42 KDa que corresponden a las porinas, excepto para *Escherichia coli* UH302 que carece de porinas (Carril 3). En cambio *Escherichia coli* UH302/PS13 que es una bacteria recombinante que expresa a la porina Omp C de *Salmonella typhi* únicamente aparece una sola banda de aproximadamente 38 KDa (Carriles 4 y 10).

#### 5.- Reactividad de sueros policlonales anti-péptido.

Esta prueba se llevó a cabo con los sueros anti-péptido adsorbidos con *Escherichia coli* K12 y sin adsorber, en ensayos de ELISA utilizando como antígeno diferentes PMEs de *Salmonella* y *Escherichia*, (Figura 4). Se encontró que los sueros anti-péptido adsorbidos disminuyen la reactividad hacia las PMEs de todas las cepas pero su reconocimiento nunca se abate y que estos sueros no son capaces de hacer un reconocimiento diferencial entre las diferentes cepas, observándose siempre que el suero anti-246 reconoce más intensamente a todas las cepas.



**Figura 3.**

**Electroforesis de PMEs de diferentes cepas de bacterias Gram-negativas.** Carril 1. Pesos moleculares (66: Albúmina Bovina; 45: Albúmina de huevo, 36: Fosfato Deshidrogenasa; 29: Anhidrasa Carbónica; 24: Tripsinógeno; 20.1: Inhibidor de Tripsina; 14.2:  $\alpha$  Lactoalbúmina). Carril 2. PMEs de *Salmonella gallinarum*. Carril 3. PMEs de *Escherichia coli* UH302. Carril 4. PMEs de *Escherichia coli* UH302/pSt13. Carril 5. PMEs de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Carril 6. PMEs de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pSt13. Carril 7. PMEs de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Carril 8. PMEs de *Salmonella typhimurium*. Carril 9. PMEs de *Salmonella typhi* O 901. Carril 10. PMEs de *Escherichia coli* UH302/pSt13.

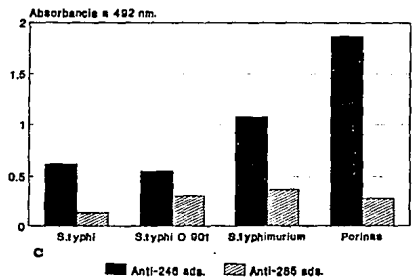
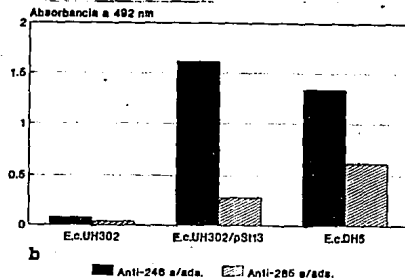
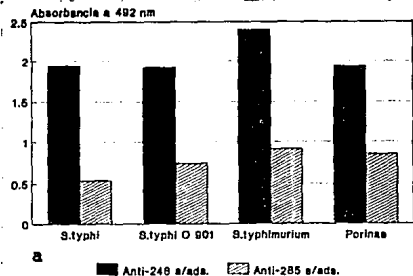
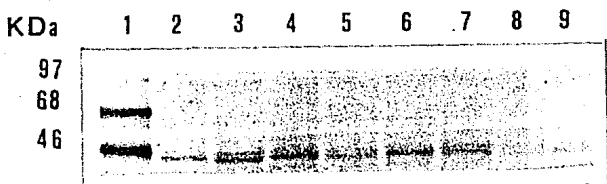


Figura 4.

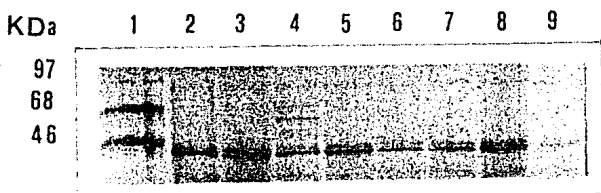
Reactividad de sueros policlonales anti-péptido. ELISA de sueros anti-péptido, adsorbidos con *Escherichia coli* K12 (c,d) y sin adsorber (a,b) utilizando como antígeno PMEs (30 µg/ml) de diferentes cepas de *Salmonella* y *Escherichia*.

## 6.- Inmunoprecipitación.

Los sueros fueron probados por inmunoprecipitación para determinar si los anticuerpos anti-péptido son capaces de hacer un reconocimiento diferencial entre *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d y *Escherichia coli* K12, utilizando sueros adsorbidos con *Escherichia coli* K12, y sin adsorber (Figura 5), los resultados muestran que las dos bacterias son reconocidas de la misma manera por cualquiera de los sueros tanto adsorbidos como no adsorbidos, por lo que no se observó un reconocimiento diferencial, lo cual se atribuye a la policlonalidad de los sueros.



a



b

Figura 5.

Inmunoprecipitación con sueros policlonales anti-péptido, *Salmonella typhi* (a) y *Escherichia coli* (b) marcadas con S<sup>35</sup>-metionina. Carril 1. Pesos moleculares (97.4 KDa, Fosfolipasa B; 68 KDa, Albúmina; 46 KDa, Ovoalbúmina); Carriles 2 y 3. Suero anti-porinas; Carriles 4 y 5. Suero anti-246; Carriles 6 y 7. Suero anti-285; Carriles 8 y 9. Suero normal de ratón.

Carriles 3,5,7 y 9 adsorbidos (ads) con *Escherichia coli* K12; Carriles 2,4,6 y 8 sin adsorber (s/ads).

## IX.- DISCUSION DE RESULTADOS.

Actualmente se sabe que las porinas de *Salmonella typhi* desempeñan un papel importante en la inducción de una respuesta inmune contra la fiebre tifoidea y se ha demostrado que estas proteínas estimulan mecanismos efectores humorales y celulares en modelos murinos así mismo que son buenos inmunógenos para la inducción de un estado de protección contra la infección por la bacteria (9,19,22,24,37). También se sabe que la porina Omp C de *Salmonella typhi*, participa parcialmente en la inducción de protección en el modelo murino (23).

Esto ha motivado a que se hagan estudios más profundos sobre la antigenicidad de las porinas como: ¿cuáles son los determinantes antigénicos que inducen protección? y ¿qué mecanismos inmunológicos están involucrados en el control de la infección?

Para responder parcialmente a estas preguntas se realizó un mapeo de epitopos para linfocitos B de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, mediante algoritmos de predicción. De manera general, la predicción algorítmica de epitopos, ha agilizado su búsqueda, lo que ha permitido estudiar parámetros de antigenicidad, como son: Composición química, tamaño, forma, así como realizar estudios sobre inmunidad celular, tolerancia y restricción genética (45).

Las regiones 246-254 (TSNGSNPS) y 285-303 (LQSKGKDISNGYGASYGDQ) presentaron los valores más altos de hidrofiliidad y antigenicidad por los programas ANTIGEN y FLEXPPO, además la región 246-254 resultó ser específica de *Salmonella typhi*, una región que no es compartida por la porina Omp c homóloga de *Escherichia coli* (Figura1).

Para que los péptidos sintéticos sean buenos inmunógenos generalmente se acoplan con proteínas acarreadoras, en este caso como la síntesis de los péptidos se hizo en un soporte de Polidimetilacrilamida Novasyn Ka. Este fungió como activador policlonal, en conjunción con el Adyuvante Completo de Freund.

En la titulación de los sueros policlonales de los ratones inmunizados, (Grafica 1) se observó que el título después de la inmunización es casi cinco veces mayor que el control, con estos resultados se demuestra la presencia de anticuerpos dirigidos contra estas regiones sobre la porina y como estamos utilizando una porina recombinante (rOmp C) como antígeno, podemos afirmar que estos anticuerpos anti-péptido son capaces de reconocer a la porina nativa y que las regiones que reconocen se encuentran expuestas sobre la misma.

Esta observación comprueba que los péptidos acoplados a la resina y emulsificados en Adyuvante Completo de Freund, son capaces de inducir en los ratones anticuerpos que reconocen a dichas regiones.

Por otro lado el análisis por citometría de flujo muestra un claro reconocimiento de los sueros anti-péptido hacia la bacteria completa, esto comprueba que los fragmentos 246-254 y 285-303 de la porina Omp C de *Salmonella typhi* son regiones expuestas en la superficie de la bacteria y constituyen determinantes antigénicos reconocibles por linfocitos B. De este modo se confirma la predicción teórica de los péptidos como epitopos de la porina.

En el ensayo de reconocimiento de los sueros anti-péptido con las PMEs de diferentes cepas, se observó que en el proceso de adsorción de los sueros con *Escherichia coli* K12 disminuye la reactividad comparado con el suero no adsorbido, lo que demuestra la presencia de anticuerpos contra esta bacteria.

El suero anti-246 mostró un reconocimiento mayor que el suero anti-285 en todas las cepas siendo mayor para *Salmonella typhimurim* lo cual pudiera deberse a que en el ensayo se esta usando un complejo de proteínas conjuntamente con un suero policlonal, en donde seguramente se están dando varias reacciones antígeno-anticuerpo y no todas corresponden a las de las regiones peptídicas con los anticuerpos anti-péptido, y el sistema detecta los complejos antígeno-anticuerpo formados de esta manera. También se observa que para *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  el suero anti-246 disminuye su reactividad en la adsorción, mientras que el suero anti-285 elimina la respuesta, esto se atribuye a anticuerpos que reconocen a las otras PMEs de manera cruzada, *Escherichia coli* UH302/pSt13 que es una bacteria recombinante que expresa la porina Omp C de *Salmonella typhi* tal como se esperaba fue



reconocida más intensamente por el suero anti-246 que es específica de *Salmonella typhi* y disminuyó para el anti-285 cuya secuencia no se encuentra en la porina, este pronunciado reconocimiento puede deberse a que únicamente se tiene porina Omp C a diferencia de las otras que es una mezcla, así también como se esperaba para *Escherichia coli* UH302 no hubo reconocimiento por ningún suero, debido a que esta bacteria no tiene porinas, en un ensayo de ELISA realizado con porinas purificadas de *Salmonella typhi* se observó que los sueros anti-péptido adsorbidos solo disminuían su reactividad aproximadamente un 10%, al compararlos con los sueros no adsorbidos, siendo los valores más altos para el anti-246 que es el fragmento específico de *Salmonella typhi*, lo que demuestra que las regiones elegidas son epitopos de la porina. A continuación se presentan los resultados.

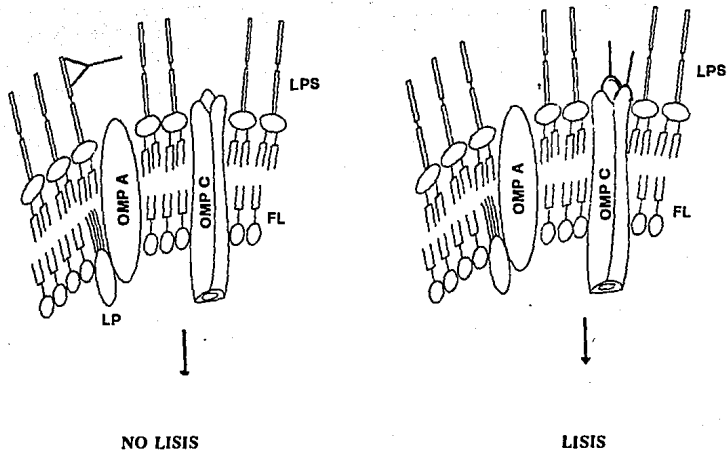
PORINAS DE <i>Salmonella typhi</i>	ABSORBANCIA A 492 nm			
	ANTI-246		Anti-285	
	S/ADS	ADS	S/ADS	ADS
	1.932	1.876	0.845	0.680

En el ensayo de inmunoprecipitación se observó el mismo fenómeno (figura 5) ya que los sueros no hicieron un reconocimiento diferencial de las PMEs sino que todas las bandas observadas son idénticas y prácticamente no hay diferencia entre una cepa y otra, ni entre los mismos sueros.

Los resultados anteriores nos llevan a pensar en la necesidad de obtener anticuerpos anti-péptido purificados, debido a la policlonalidad de la respuesta, para ello se propone la elaboración de anticuerpos monoclonales.

La activación de complemento por los anticuerpos anti-porina probablemente represente uno de los mecanismos efectores del sistema inmune en la fiebre tifoidea, debido a que la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo sobre la superficie de la bacteria, de manera que el complejo C5-C9 (MAC) puede insertarse en la membrana y ejercer su efecto lítico (Figura 6).

Las predicciones de epitopos por medio de algoritmos se realizaron antes de que se conociera en detalle la estructura cristalográfica de la porina Omp F de *Escherichia coli*, reportada por Cowan y Rosenbusch en 1992. ( figura 7) Después de alinear las secuencias de Omp F de *Escherichia coli* y Omp C de *Salmonella typhi*, se efectuó en nuestro laboratorio, una aproximación de la estructura secundaria de la porina Omp C, representada en la figura 8. En ella se observa que el péptido 246-254, está localizado en el aza L6 y el péptido 285-303 en L7, lo cual confirma, su comportamiento como epitopos para linfocitos B, pues quedan expuestos en la superficie de la porina y de la bacteria, quedando accesibles al reconocimiento de los anticuerpos.



**FIGURA 6**

Efecto lítico de los anticuerpos anti-porinas por el complemento sobre la superficie de la membrana. FL Fosfolípido, LPS Lipopolisacárido, LP Lipoproteína. OMP A Proteína modificable por el calor. Omp C porina que se expresa con temperaturas y osmolaridad elevadas.



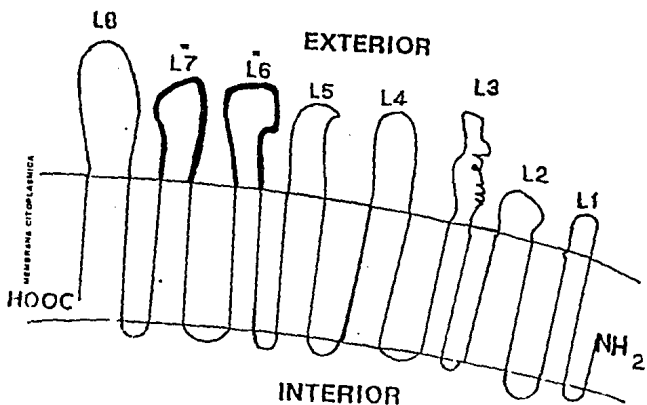


FIGURA 8

Estructura secundaria propuesta para la porina Omp C de *Salmonella typhi* a partir de una comparación con el modelo propuesto para la porina Omp F de *Escherichia coli*.  
 (Basado en Cowan et. al. Nature, 727-732. 1992).

## X.- CONCLUSIONES.

Se demostró que el sistema péptido-resina es capaz de estimular en los ratones una respuesta de anticuerpos contra los péptidos.

Los péptidos 246-254 y 285-303 son regiones expuestas en la porina Omp C y a su vez expuestas en la superficie de la bacteria.

Los sueros policlonales no son capaces de diferenciar selectivamente a las PME de las diferentes cepas utilizadas.

El mapeo de epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi* representa un paso más en el estudio de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune generada contra la fiebre tifoidea.

## **XI.- PERSPECTIVAS**

Dado que en los resultados para demostrar la especificidad de los sueros anti-péptido con las PME de las diferentes especies de *Salmonella* y *Escherichia*, no se pudo demostrar si había reconocimiento diferencial, se propone realizar este ensayo con anticuerpos monoclonales.

En un proyecto a corto plazo será necesario analizar la capacidad de estos epitopos para generar una respuesta inmune protectora en animales y su papel en la relación huésped-parásito durante la infección.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Morbilidad por infecciones transmisibles. 1993. En: *Atlas Epidemiológico del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 1985-1990. Pags: 100-101, 130.
- 2.- Arshady,R., Atherton,E., Clive,D.L.J. and Sheppard,R.C. 1981. Peptide synthesis. Part 1. Preparation and use of polar supports based on poly(dimethylacrylamide). *J.C.S. Perkin* 1;529-537.
- 3.- Atherton,E., Clive,D.L.J. and Sheppard,R.C. 1975. Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* 97:6584-6585.
- 4.- Atherton,E., Logan,C.J. and Sheppard,R.C. 1981. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using  $N\alpha$ -fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J.C.S. Perkin* 1:538-546.
- 5.- Bairoch,A. 1990. PCGENE: the nucleic acid and protein sequence analysis software system. (TM) *IntelliGenetics Inc.* University of Geneva, Switzerland.



- 6.- Benz,R. y Bauer,K. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur.J. Biochem.* **176**:1-19.
- 7.- Berkower,I., Buckenmeyer,G.K., Gurd,F.R.N. and Berzofsky,J.A. 1982. A possible immunodominant epitope recognized by murine lymphocytes immune to different myoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:4723-4727.
- 8.- Berkower,I., Kawamura,H., Matis,L.A. and Berzofsky,J.A. 1985. T cell clones to two major T cell epitopes of myoglobin: effect of I-A/I-E restriction on epitope dominance. *J. Immunol.* **135**:2628-2633.
- 9.- Blanco,F., Isibasi,A., González,C.R., Ortiz,V., Paniagua,J., Arreguín,C. and Kumate,J. 1993. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**:73-80.
- 10.- Bosch,D., Scholten.M., Verhagen,C. and Tommassen,J. 1989. The role of the carboxiterminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* **216**:144-148.
- 11.- Coligan,J.E., Kruisbeek,A.M., Margulies,D.H., Shevach,E.M. and Strober,W. (Eds). 1992. Current protocols in immunology. National Institutes for Health. Greene publishing Association and Wiley-Interscience, N.Y. U.S.A. Págs: 8.4.1-8.4.20.

- 12.- Cowan,S.W., Schirmer.G., Rummel,G., Steiert,M., Ghosh,R., Pauptit,R.A., Jansonius,J.N. and Rosenbusch,J.P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two E.coli porins.  
*Nature* 358:727-733.
- 13.- DeLisi,C. y Berzofsky,J.A. 1985. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7048-7052.
- 14.- Engwall,E. and Perlmann,P. 1971. Enzyme-Linked immunoabsorbent assay (ELISA).  
*Immunochem.* 8:874-879.
- 15.- Falk,K., Rötzschke,O., Deres,K., Metzger,J., Jung,G. and Rammensee,H.G. 1991. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* 174:425-434.
- 16.- Falk,K., Rötzschke,O. and Rammensee,H.G. 1990. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348:248-251.
- 17;- Fasman,G.D. 1989. Protein Conformational Prediction. *TIBS* 14:295-299.

- 18.- Takeshi,M., Mei,Y., and Masayori,I 1983. DNA sequence of the promotor region of the omp C gene and the aminoacid sequence of the signal peptide of pro Omp C protein of *Escherichia coli*. *Fed. Eur. Bioch. Soc.* 151:159-163.
- 19.-González,C.R., Isibasi,A., Ortiz-Navarrete,V., Paniagua,J., García,J.A., Blanco,F. and Kumate,J. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 37:(10): 793-799.
- 20.- Hoop,T.P. y Woods.K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3824-3828.
- 21.- Isibasi,A., Ortiz,V., Moreno,J., Paniagua,J., Vargas,M., González,C. and Kumate,J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever: monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* porins. En: Cañedo,L.E., Todd,L.E., Packer,L. y Jaz,J. (Eds). Cell function and disease. *Plenum Press.* N.Y. Págs:281-292.
- 22.- Isibasi,A., Ortiz,V., Paniagua,J., Pelayo,R., González,C.R., García,J.A. and Kumate,J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 10:811-813.

- 23.- Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M.P., Ramírez, G., González, C.R., López, C., Sánchez, J., Kumate, J. And Ortiz, V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann.Ac.Sc. Ny.* (En prensa).
- 24.- Isibasi,A., Ortiz,V., Vargas,M., Paniagua,J., González,C.R., Moreno,J. and Kumate,J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- 25.- Jahing,F. 1990. Structure Predictions of membrane proteins are not that bad. *TIBS* 15:93-95.
- 26.- Jap, B.K. 1989. Molecular design of pho E porin and its functional consequences. *J. Mol. Biol.* 205:407-419.
- 27.- Karplus,M. y McCammon,A. 1983. Dynamics of proteins: elements and function, *Ann. Rev. Biochem.* 53:263-300.
- 28.- Kumate,J. 1980. Fiebre tifoidea. En: Manual de infectología. Kumate,J. and Gutiérrez,G. (Eds). Séptima Edición. Ediciones Médicas del Hospital infantil de México. Págs: 45-55.
- 29.- Sinigaglia,F and Hammer,J. 1994. Defining rules for the peptide-MHC class II interaction. *Current Op. Immun.* 6: 52-56.

- 30.-Levine,M.M., Ferreccio,C., Black,R.E., Tacket,C.O., Germanier,R. and The Chilean Typhoid Committee. 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev.Infect. Dis.* 11:9552-9567.
- 31.- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 32.- Margalit,H., DeLisi,C. y Berzofsky,J.A. 1990. Computer prediction of T-cell epitopes. En: Woodrow,G.C. y Levine,M.M. (Eds). New generation vaccines. Marcel Dekker, Inc.N.Y., USA. Págs:109-116.
- 33.- Margalit,H., Spouge,J.L., Cornette,J.L., Cease,K.B., DeLisi,C. and Berzofsky,J.A. 1987. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* 138:2213-2229.
- 34.- Martín Orozco,N., 1992. Péptidos sintéticos de porinas de *Salmonella typhi*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México,D.F., México.
- 35.-Nikaido,H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzimol.* 97:85-100.

- 36.- Nikaido, H. and Vaara, M. 1987. Outer membrane. En: Neidhardt,F.C., Ingraham,J.L., Low,K.B., Magasanik,B., Schaechter,M. and Umbarger,H.E. (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology.* Washington. D.C. USA. págs:7-22.
- 37.- Ortiz,V., Isibasi,A., García-Ortigoza,E. and 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. Clinic. Microbiol.* 27:1640-1645.
- 38.- Overbeeke,N., Bergmans,H., van Maxsfeld,F. and Lugtemberg,B. 1983. Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 163:513-532.
- 39.- Paniagua,J., Isibasi,A., Pelayo,R., Ortiz,V., González,C., García,J.A., Islas,S. and Kumate,J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d: análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20:315-320.
- 40.- Harlow, E., Lane, D. 1988. Inmunoprecipitación.En: *Antibodies a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y. Pags: 421-466.

- 41.- Puente,J.L., Flores,V., Fernández,M., Fuchs,Y. and Calva,E. 1987. Isolation of an Omp C-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61:75-83.
- 42.- Richards, F.F., Rosenstein, R. W., Varga,J.M. and Konigsberg,W.H. 1978. En: *Inmunoglobulins*, Litman,G.W. and Good, R.A. (Eds). *Plenum Press*. 117-154.
- 43.-Rosenbusch, J.P. 1987. Three Dimensional Structure of Membrane Proteins. En: Masayori Inouye (Eds). *Bacterial outer membranes as model systems*. John Wiley and Sons. USA. 141-162.
- 44.- J.Sand,A and Miller,J. 1994. MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Current. Op. Immunol.* 6:57-63.
- 45.- Milich,D.R. 1989. Syntetic T and B cell recognition sites: Implications for vaccine development.*Adv. Immunol.* 45:195-282.
- 46.- Saul,A.J. y Geysen,H.M. 1990. Identification of epitopes through peptide technology. En: *New generation vaccines*. Woodrow,G.C. and Levine,M.M. (Eds). Marcel Dekker, Inc. N.Y, USA. Págs:117-126.
- 47.- Schnaitman. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* 108:545-552.

48.- Schnaitman,C.A. 1971. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozime on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108:553-563.

49.-Struyvé,M., Moons,M. y Tommassen,J. 1991. Carboxi-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* 218:141-148.



## APENDICE

### Lista de material utilizado.

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratonos C<sub>3</sub>HB/Fej y Balb/c.

- Cepas de: *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* UH302, *Escherichia coli* UH302/pSt13, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pSt13, *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, *Salmonella typhi* ty2, *Salmonella typhi* O 901, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.

#### MEDIOS DE CULTIVO.

BHI (Infusión Cerebro Corazón).

Luria (0.5% de extracto de levadura, 1% triptona y 1% de NaCl).

M9 (0.6% NaHPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% NaCl, MgSO<sub>4</sub> 1 M, glucosa al 20% y CaCl<sub>2</sub>).

Birni I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8. 25 mM y EDTA 10 mM).

Penassay (0.15% extracto de levadura, 0.15% extracto de carne, 0.5% peptona, 0.1% glucosa, 0.35% NaCl 0.37% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.13% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

## REACTIVOS

Triton X-100

HEPES

Tris-HCl

EDTA

BSA

Acrilamida

Bis-acrilamida

PPO

DMSO

SDS

$\beta$  Mercapto-etanol

Glicerol

Glicina

Tween-20

Nonidet P-40

Adyuvante Completo de Freund

OPD

$H_2O_2$

$H_2SO_4$

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## EQUIPO DE LABORATORIO

Estufa

Balanza Analítica

Centrífuga

Ultracentrífuga

Sonicador

Sintetizador de Péptidos

Lector de ELISA

Citómetro de Flujo (FACS)

Equipo para Electroforesis

Contador de Centelleo

Espectrofotómetro