



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
PARA EL MAPEO DE REGIONES EXPUESTAS DE LA
PORINA Omp C DE Salmonella typhi".**



T E S I S
EXAMEN DE GRADUACION
EN QUIMICA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
LUZ MARIA MONICA GUTIERREZ FAJARDO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 1994





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.

Jurado asignado:

PRESIDENTE: Prof. José Sulivan López González

VOCAL: Prof. Armando Isibasi Araujo

SECRETARIO: Prof. Jorge F. Paniagua Solís

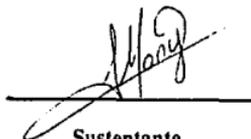
1er. SUPLENTE: Prof. Fernando García Tamayo

2o. SUPLENTE: Prof. Patricia Elvira Berron Ruiz

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



Asesor del tema
M. en C. Jorge F. Paniagua Solís



Sustentante
Luz María Mónica Gutierrez Fajardo

*A Dios gracias por darme el Don de la vida,
Gracias por darme una familia que me permite
crecer en plenitud para vivir dándome con amor.*

*Con mucho amor dedico este trabajo a mi abuelita Ma. de la Luz y a mi querido y gran amigo
Martín, a quien agradezco sus consejos y su apoyo incondicional, pero sobre todo su cariño.*

A mi Madre querida:

Gracias por darme tu amor, tu apoyo y comprensión, por darme raíces fuertes para tratar de realizar adecuadamente lo que me ha tocado vivir. Gracias por no compararme con nadie y aceptarme tal como soy sin pretender cambiarme, por darme con tu ejemplo deseos de superarme, de ser útil y de tratar de vivir la vida a plenitud; gracias por enseñarme a amar a Dios sobre todas las cosas y con ello me has dado el mejor regalo.

Mónica

Al Dr. Armando Isibasi, con cariño y respeto, gracias, por su confianza, por su apoyo y por haberme permitido formar parte de un gran equipo.

A Jorge Paniagua, por su paciencia, su dirección y su amistad, gracias.

Al Dr. Vianney gracias por sus consejos, por su dirección en mi tesis y por los momentos agradables que con su alegría y sencillez compartió conmigo.

*A mi pequeña hermana Melissa gracias por tu amor
y por contagiarme de tu alegría.*

*A July, que aunque físicamente no esta conmigo
su recuerdo me acompañará siempre.*

A mis queridas amigas:

Naty, Yolanda, Silvia, Margarita y Elizabeth, gracias por permitirme pasar a su lado ratos tan agradables compartiendo su alegría, gracias por su paciencia, por sus consejos, pero sobre todo gracias por brindarme su amistad.

A mis compañeros del laboratorio, gracias.

INDICE

	PAGINAS
-PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA	
GENERALIDADES	1
CLASIFICACION	1-2
-PORINAS	
CARACTERISTICAS GENERALES	3-6
-PAPEL DE LAS PME Y PORINAS COMO INMUNOGENOS	6-14
-OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	14-20
-HIPOTESIS	22
-OBJETIVOS	23
-MATERIALES Y METODOS	24-36
-RESULTADOS	37-46
-DISCUSION DE RESULTADOS	47-51
-CONCLUSIONES	52
-BIBLIOGRAFIA	53-57

INDICE DE FIGURAS

	PAGINAS
Figura 1 ESTRUCTURA CRISTALOGRAFICA DEL MONOMERO DE LA PORINA <i>Omp F</i> DE <i>E. coli</i>	4
Figura 2 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LA PORINA <i>Omp C</i> DE <i>E. coli</i> Y <i>S. typhi</i>	11
Figura 3 ESTRUCTURA SECUNDARIA PROPUESTA PARA LA PORINA <i>Omp C</i> DE <i>S. typhi</i> 9,12,VI;d	12
Figura 4 IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS TK Y HGPRT EN LA SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS	16
Figura 5 TECNICA DE ELISA	21
Figura 6 OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	27
Figura 7 FUSION	31
Figura 8 SELECCION DE CELULAS HIBRIDAS	32
Figura 9 CLONACION	33
Figura 10 SISTEMAS DE ELISA UTILIZADOS	34
Figura 11 SECUENCIA DE CLONACIONES PARA LA OBTENCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL L6-A11	40
Figura 12 SECUENCIA DE CLONACIONES PARA LA OBTENCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES L7-G8 Y L7-F1	41
Figura 13 ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA PAP-CTB-GM1	43

Figura 14 RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HACIA LAS PORINAS DE <i>S. typhi</i>	44
Figura 15 RECONOCIMIENTO DE BACTERIAS COMPLETAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	46
Gráfica 1 RESPUESTA DE ANTICUERPOS TOTALES HACIA EL CONJUGADO RESINA-PEPTIDO	38

INDICE DE TABLAS

	PAGINAS
TABLA 1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS	2
TABLA 2 SELECCION DE CELULAS HIBRIDAS EN MEDIO HAT	17
TABLA 3 EFICIENCIA DE FUSION	39

CONTENIDO

- I. ABREVIATURAS
- II. RESUMEN
- III. INTRODUCCION
- IV. HIPOTESIS
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSION DE RESULTADOS
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFIA

I. ABREVIATURAS

Ag8(X63.653)	Línea celular mielóide de origen murino
8-AG	8-azoguanina
ASB	Albumina sérica bovina
C3H/HEJ	Cepa singénica de ratones
CPA	Célula productora de anticuerpos
DL₅₀	Dosis letal media
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
FACS	Citometría de flujo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM1	Monosialogangliósido-GM1
³H	Timidina tritiada
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa
HT	Hipoxantina-timidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Ig	Inmunoglobulina
i.p	Intraperitoneal
IP	Ioduro de propidio
KD	Kilodaltones
L6	Péptido 246-254
L7	Péptido 285-303
L6-CTB	Proteína híbrida: Péptido 246-254-subunidad B de la toxina del cólera
L7-CTB	Proteína híbrida: Péptido 285-303-subunidad B de la toxina del cólera
LPS	Lipopolisacárido
MAC	Complejo de ataque a la membrana
Omp C	Porina Omp C presente en bacterias Gram negativas
Omp C_r	Porina Omp C recombinante
PBS	Buffer salino de fosfatos
PEG	Poli(etil)englicol
Péptido 246	Región de la porina Omp C cuya secuencia es TSNGSNPS
Péptido 285	Región de la porina Omp C cuya secuencia es LQSKGKDISNGYGASYGDQ
PME	Proteínas de membrana externa
RPMI	Medio de cultivo celular
SFB	Suero fetal bovino
6-TG	6-tioguanina
TK	Timidina-cinasa

II) RESUMEN

En trabajos previos se analizó la secuencia de la porina Omp C de *Salmonella typhi* mediante algoritmos de predicción de epítomos utilizando el programa PC-GENE. Eligiendo las siguientes secuencias como probables epítomos capaces de inducir una respuesta inmune en el hospedero: * La región comprendida entre los residuos 285-303 (LQSKGKDISNGYGASYGDQ) y la región 246-254 (GTSNGSNPST).

Se ha demostrado que la porina Omp C de *S. typhi* participa parcialmente en el control de la infección por dicha bacteria, por lo que el estudio de las regiones potencialmente antigénicas es importante. A la par de este trabajo se ha efectuado el mapeo de estas regiones utilizando anticuerpos policlonales obtenidos de suero de ratones inmunizados, observando que dichas regiones se encuentran en la superficie de la bacteria. Sin embargo, debido a la policlonalidad se obtuvo reconocimiento hacia otras bacterias Gram negativas, por lo que se hizo necesaria la obtención de anticuerpos monoclonales contra estas regiones, de tal modo que sea posible identificar estas regiones y en un futuro estudiar su inmunogenicidad, así como profundizar en el estudio de la relación hospedero-parásito.

Para esto fueron inmunizados ratones de la cepa C3H/HEJ con los péptidos 246-254 y 285-303, las células linfoides obtenidas de estos ratones fueron fusionadas con la línea celular mieloide de origen murino Ag 8 (X63-Ag8.653) empleando como agente fusionante PEG.

De las células híbridas obtenidas se realizaron 3 clonaciones a fin de seleccionar adecuadamente las clonas productoras de anticuerpos anti-péptido. De todas las clonas de células obtenidas a lo largo de las clonaciones realizadas se decidió trabajar con 10, estas clonas fueron crecidas y expandidas *in vitro*, finalmente se seleccionaron 3 clonas que secretan anticuerpos monoclonales que reconocen determinantes antigénicos diferentes: el anticuerpo monoclonal L6-A11 que reconoce únicamente al péptido 246-254 de *S. typhi*, el anticuerpo monoclonal L7-F1 y el anticuerpo monoclonal L7-G8 que reconocen al péptido 285-303 de *S. typhi* y *E. coli*, esto debido a que la región 285-303 tiene aminoácidos compartidos por ambas bacterias.

Estos anticuerpos monoclonales reconocen al péptido correspondiente expresado como una proteína híbrida (PAP-CTB), es decir, los anticuerpos anti-péptido 246 reconocen a la proteína híbrida L6-CTB secretada por la cepa *E. coli* DH 5 α /pJAK y los anticuerpos anti-péptido 285 reconocen a la proteína híbrida L7-CTB secretada por la cepa *E. coli* pJP L7 y no hay cruce al menos con el asa 8 de la porina. Además, estos anticuerpos son capaces de reconocer a la porina en solución y a la bacteria completa, lo que demuestra que los determinantes antigénicos reconocidos por estos anticuerpos se encuentran expuestos en la superficie de la bacteria y al estar expuestos son accesibles al reconocimiento por anticuerpos, de tal modo que pueden ser utilizados en un futuro para determinar el papel que desempeñan dichas regiones en la inducción de protección, así como profundizar en el estudio de la inmunidad humoral en el control de la infección por *S. typhi* en el modelo murino.

III) INTRODUCCION

PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

GENERALIDADES.

Las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas han cobrado gran importancia en la inducción de una inmunidad específica durante la infección por dichas bacterias. El estudio sobre estas proteínas se ha enfocado principalmente en tratar de establecer el papel que desempeñan en la relación hospedero-parásito. Esta importancia se ha podido establecer gracias al desarrollo de métodos que permiten la separación de la membrana externa de la membrana citoplasmática.

Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* utilizando esferoplastos preparados con lisozima y EDTA, lisando la bacteria por choque osmótico y posteriormente separando la membrana externa de la membrana citoplasmática mediante un gradiente de sacarosa¹.

Por otra parte Schnaitman describió una metodología que evita la utilización de esferoplastos y la cual consiste en la destrucción de la bacteria en una prensa francesa y la solubilización posterior de la membrana en un detergente no iónico², la identificación de las PME se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Schnaitman reportó por primera vez que la bacteria *E. coli* contenía una proteína principal y observó que esta proteína constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana³, posteriormente con ayuda de otros investigadores demostraron que en realidad no era una sino 4 proteínas^{4,5}. Sin embargo, el número de las PME varía de acuerdo a la información genética de las bacterias y su expresión puede verse afectada por las condiciones de cultivo⁶.

CLASIFICACION

Las PME que más se han estudiado son las de *S. typhimurium* y *E. coli*, Di Rienzo, Nakamura e Inouye hicieron una revisión extensa de ellas y las clasificaron en proteínas

principales y menores^{7,8}, las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100 mil copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo, solo se expresan 5, dentro de las proteínas principales se encuentran las siguientes:

1) **Proteínas matrices o porinas**, las cuales intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana; las principales características de estas proteínas⁹ se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS

1) *E. coli*¹⁰ 2) *S. typhimurium*¹⁰

PORINAS	PESO MOLECULAR (KDa)	DIAMETRO APROXIMADO (nm)	REGULACION DE LA SINTESIS	RECEPTOR A FAGOS Y COLICINAS
Omp F	1)32.7 2)39.3	1)1.2 2)1.2	Reprimida por alta osmolaridad	1)TufA,T2,TP1,T P2,TP5,ColA 2)no determinada
Omp C	1)36.0 2)39.8	1)1.1 2)1.3	Desreprimida por alta osmolaridad	1)Tuf h, MeI,PA2,434 SS1,TP2,TP5,T P6. 2)PH 42,PH 105,PH 221.
Omp D	1)no tiene 2)38.0	1)no tiene 2)1.3	Dependiente de AMPc	1)no tiene 2)PH 31,PH 42,PH 51.
Pho E	1)36.8 2)36.0	1)1.2 2)1.2	Desreprimida por escasez de fosatos	1)TC 23,TC 45. 2)no identificado.

II) Proteína modificable por el calor (Omp A), involucrada en procesos de conjugación y se ha establecido su papel como receptor de fagos y colicinas.

III) Lipoproteína de Braun, la cual se encuentra unida covalentemente a la peptidoglicana y tiene como función principal mantener la integridad funcional y estructural de la membrana¹¹

Con respecto a las proteínas menores, se ha establecido que desempeñan un papel importante como acarreadores en el transporte activo de moléculas y se encuentran relacionadas con la replicación de las células.

Estudios recientes^{12,13} han permitido comprobar que la membrana externa de diferentes microorganismos está constituida de bicapas de fosfolípidos, las cuales permiten aislar y conferir a las células un compartimento subcelular a través del cual se lleva a cabo el transporte de solutos, la transducción de señales y la conversión de energía a través de esas barreras; las PME, atraviesan el core hidrofóbico de la membrana (aproximadamente 30Å). La superficie de estas proteínas que interactúan con el core de la membrana es también hidrofóbica, siendo una propiedad que distingue a estas proteínas de otras proteínas globulares y que favorece su agregación en soluciones acuosas.

Dentro de las PME existen unas proteínas integrales denominadas porinas, formadas de estructuras β , se encuentran asociadas estrechamente a la peptidoglicana y al LPS de forma no covalente. La estructura monomérica de la porina es un polipéptido de 336 residuos en promedio, estos monómeros se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse posteriormente a la membrana externa donde se encuentran como homotrímeros en cantidades elevadas (10^5 copias por célula).

Las porinas forman canales o poros a través de la membrana que facilitan la difusión de pequeños solutos polares (aproximadamente 600 Da) al interior de la bacteria, estas proteínas presentes en la membrana o en un estado isotrópico (después de su solubilización con detergentes) presentan una estabilidad inusual que es explicada por sus características estructurales.

En 1980 Rosenbusch y Cols¹⁴ reportaron la estructura cristalográfica de la porina Omp F de *E. coli* (figura 1), el análisis por difracción de rayos X muestra que el

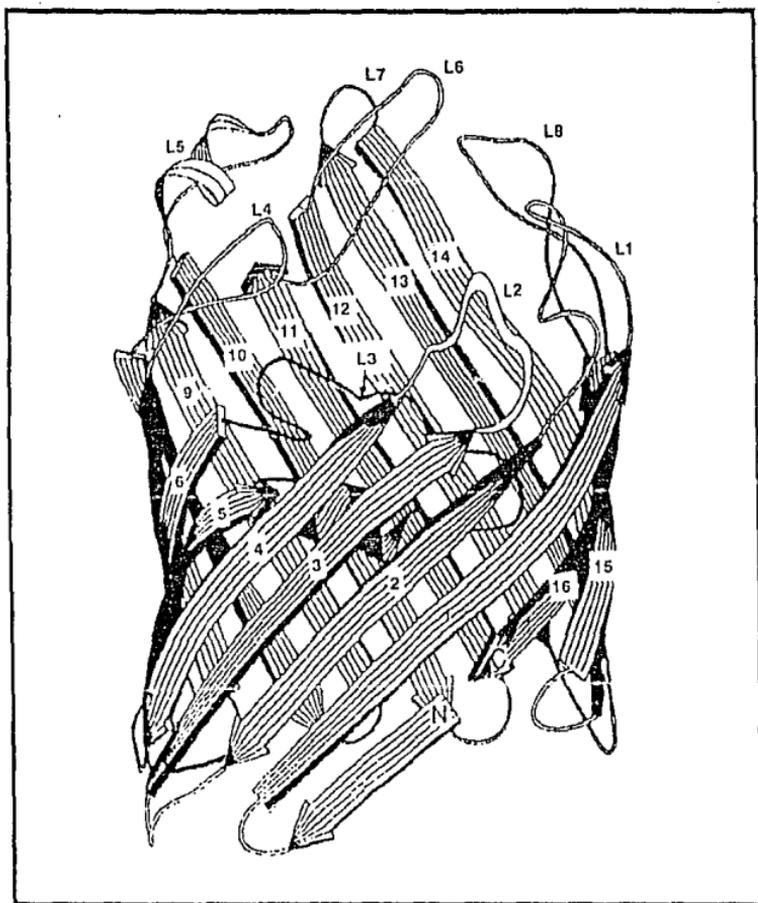


figura 1

Estructura cristallográfica del monómero de la porina Omp F de *Escherichia coli*.¹⁴

esqueleto de la porina esta formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas de 40Å que atraviesan la membrana, se encuentran enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con α -hélices intercaladas, formando una estructura cilíndrica al cerrarse la estructura β de manera pseudo-cíclica mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1¹⁴, el segmento transversal es de 10-12 aminoácidos y contiene aminoácidos polares orientados de forma perpendicular al plano de la membrana. Una parte del interior del poro o canal (poro de difusión hidrofílico con un diámetro promedio de 1.5-2.0 nm), se encuentra revestido por aminoácidos cargados, y el número y posición de estas cargas determina la selectividad iónica de los canales, además, la entrada del poro está restringida por las asas largas y dispares que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11Å a 19Å, la salida del poro al espacio periplásmico tiene dimensiones de 15 X 22Å y está definida por las vueltas β ¹⁴.

Las porinas conocidas son Omp C, Omp F y Pho E de *E. coli* y Omp C, Omp F, Pho E y Omp D de *S. typhimurium* compuestas de subunidades de 38,000 - 40,000 Da, son semejantes entre sí y solo difieren en algunas secuencia de aminoácidos y en su selectividad y afinidad por grupos iónicos; a excepción de Pho E llamada también fosfoporina la cual presenta una preferencia general por fosfatos. Dentro de la familia de las porinas de los generos de *Escherichia* y *Salmonella*, las más estudiadas son Omp F y Pho E de *E. coli* pero debido a su gran homología (más del 60%), se considera que la estructura de las otras porinas es muy similar.¹⁵

La síntesis de porinas es regulada de diferentes maneras¹⁶, en *E. coli*, por ejemplo, la elevada osmolaridad ocasiona que una proteína de membrana citoplásmica denominada Env Z fosforile a una proteína reguladora citosólica denominada Omp R que a su vez reprime la expresión de Omp F e incrementa la expresión de Omp C¹³. La expresión de los canales sobre la superficie de la membrana externa es regulada en respuesta a condiciones específicas del medio ambiente, tales como temperatura, osmolaridad, pH, composición del medio de cultivo, niveles de sales y fosfatos y diferencia de potencial eléctrico; en un medio de cultivo común (condiciones normales de C y N) sólo Omp F, Omp C y Omp D se producen, Pho E llamada también

fosfoporina se expresa sólo en condiciones de escases de fosfatos y Omp C es sobre-expresada a concentraciones elevadas de sales, la expresión de Omp F se reprime por la temperatura y osmolaridad elevadas.¹⁰

La estructura tridimensional de las porinas explica muchas de sus propiedades funcionales, por ejemplo, Pho E muestra una mayor preferencia por aniones mientras que Omp F y Omp C muestra una mayor preferencia por cationes, Omp C y Omp F son proteínas muy semejantes funcional y estructuralmente, el diámetro de sus poros varía entre 1.1 y 1.3 nm, se piensa que estas 2 proteínas así como la porina Pho E evolucionaron de una proteína ancestral común ya que las secuencias proteicas contienen un 63% de homología en cuanto a identidad de aminoácidos y un 80% de identidad funcional.^{15,16}

Se han utilizado diversos métodos para tratar de establecer la estructura de estas proteínas pero no se han obtenido hasta el momento resultados satisfactorios. En la actualidad el método más informativo es la espectroscopía infraroja, la cual es rápida y requiere poca cantidad de proteína, otro método altamente utilizado para el estudio de estas proteínas es la cristalografía de rayos X, pero esta técnica requiere la formación de cristales y las PME son frecuentemente inestables cuando son removidas de su estado nativo en la membrana, además la coexistencia de superficies hidrofílicas e hidrofóbicas complica la selección adecuada de condiciones de cristalización, por todo esto se ha establecido que una evaluación crítica de la predicción de tales estructuras en combinación con resultados obtenidos por métodos físicos e inmunoquímicos puede proporcionar la ruta más promisoría para el avance en el conocimiento de la estructura y diversidad de las PME¹³.

PAPEL DE LAS PME COMO INMUNOGENOS

Existen evidencias que indican que las PME se encuentran expuestas en la superficie de las bacterias Gram negativas y por lo tanto están accesibles a las células del sistema inmune, por lo tanto se proponen como antígenos capaces de inducir una

respuesta inmune protectora. Los estudios sobre estas proteínas se han enfocado principalmente en tratar de establecer el papel que desempeñan en la inducción de una inmunidad específica, en tales estudios se ha demostrado que la inmunización con PME de *N.meningitidis*¹⁷, *N.gonorrhoeae*¹⁸, *H.influenzae*¹⁹, *S.flexneri*²⁰, *P.aeruginosa*²¹, *S.typhimurium*^{22,23} inducen un estado de protección contra la infección causada por estas bacterias en el modelo murino.

En 1988 se demostró la importancia de las PME de *S. typhi* en la inducción de una inmunidad protectora contra el reto de la bacteria viva, la inmunización de ratones NIH con una suspensión de 30 μ g de PME conteniendo 4% de LPS como contaminante confiere una protección del 100% al reto con 500 DL₅₀ de 2 cepas de *S. typhi* (9,12,vi:d, cepa aislada de un paciente con fiebre tifoidea y Ty 2, cepa vacunal) y una protección del 30% al reto con 500 DL₅₀ de *S. typhimurium*. Se observó una protección cruzada entre ambas bacterias, lo que sugiere que los determinantes antigénicos que reconocen estos anticuerpos son compartidos entre las diferentes bacterias.

La administración de un suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d induce un estado de protección pasiva al reto con 100 DL₅₀ de la bacteria homóloga y una protección del 80% al reto con *S. typhimurium* en el modelo murino²⁴, además, se hicieron ensayos de protección activa utilizando LPS como antígeno, se inmunizaron ratones NIH con 1.2 μ g de LPS observándose una protección del 40% al reto con 100 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,Vi:d y *S. typhimurium*, este resultado indica que los antígenos responsables de la inducción de protección son las PME y no el LPS.²⁴

Considerando los resultados obtenidos hasta ese momento, se propuso que las PME de *S. typhi* tienen un papel importante como inmunógenos en el humano, ya que al evaluar la respuesta inmune humoral en pacientes con fiebre tifoidea se encontró en el suero de estos pacientes anticuerpos de clase IgM durante la fase aguda de la enfermedad y anticuerpos de clase IgG durante la fase de convalecencia; los primeros anticuerpos reconocen una proteína de peso molecular de 28 KDa y los segundos proteínas con pesos moleculares 38 a 41 KDa correspondientes a las porinas, en este trabajo se demostró que la respuesta inmune humoral está dirigida contra las porinas y se propuso, que dicha respuesta tiene un papel fundamental en el control de la infección

mediada por complemento, ya que los anticuerpos anti-porinas reconocerían determinantes antigénicos en la superficie de la membrana externa activando un complejo macromolecular compuesto de 3 proteínas (C1q, C1r y C1s), dando inicio de esta manera a la activación de una cascada enzimática y a la generación de una serie de complejos péptidicos con actividad enzimática, formando finalmente el complejo C5-C9 denominado complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual puede insertarse en la membrana y ejercer su efecto lítico sobre la bacteria.²⁵

Una vez establecido el papel de las PME como inmunógenos, se aislaron y purificaron porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d por el método de Nikaído²⁶, disminuyendo de esta manera la contaminación por LPS (0.04%), se observó que al inmunizar ratones NIH con 10µg de estas porinas hay un efecto de protección del 90% contra el reto a 500 DL₅₀ de la bacteria homóloga y solamente un 30% de protección al reto con la cepa heteróloga *S. typhimurium* cuando se inmunizaron con la misma dosis de porinas²⁷.

Se demostró por ensayos de proliferación celular que las porinas aisladas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* son capaces de inducir una respuesta proliferativa de linfocitos T en ratones. Esta proliferación se midió por incorporación de ³H-timidina en ratones inmunizados con PME y con porinas de *S. typhi*, estos resultados indican que además de la inmunidad humoral, la inmunidad celular tiene también un papel importante en el control de la infección.²⁸

La administración de vacuna antitifoídica oral (Germanier) indujo en sujetos estudiados una producción de anticuerpos anti-porinas y anti-PME. Así mismo, la administración de la vacuna subcutánea (L) no indujo una respuesta de anticuerpos contra PME y porinas de *S. typhi*²⁹.

Con estos resultados se confirma el papel de las porinas como moléculas capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular en el modelo murino, así como su probable participación en la inducción de protección contra la fiebre tifoidea.

Con la finalidad de identificar en las porinas los determinantes antigénicos responsables de inducir protección, se realizó una predicción de las regiones potencialmente antigénicas de la porina Omp C de *S. typhi* 9,12,vi:d, para lo cual se emplearon métodos computacionales de predicción de epitopos^{30,31}.

Estos métodos han sido utilizados principalmente para dilucidar la estructura secundaria y terciaria de proteínas partiendo de su secuencia de aminoácidos, así mismo, para la búsqueda de la estructura de una proteína o de sitios antigénicos, se deben conocer las funciones y objetivos de los algoritmos y a la par considerar los datos experimentales y las características de la secuencia en estudio.

Dentro de las características que se consideraron para la elección de las regiones potencialmente antigénicas de la porina Omp C de *S. typhi* se encuentran las siguientes: ser secuencias expuestas en la superficie de la proteína, ser altamente hidrofílicas, cargadas y flexibles.

Los programas utilizados para este fin son:

1) el programa Antigen³², el cual asigna un valor de hidrofobicidad a cada aminoácido de la proteína de acuerdo a la escala de Levitt³⁰ y tomando fragmentos de seis aminoácidos promedia sus valores. Así se analizan regiones superpuestas a lo largo de toda la secuencia y selecciona la región más hidrofílica como un probable determinante antigénico. **2)** El programa Flexpro³², el cual basa sus predicciones en el modelo de flexibilidad o movilidad de los antígenos estudiados por Karpluz y Schulz con base en estudios de resonancia magnética nuclear y análisis cristalográficos a muy alta resolución, se determinaron los coeficientes de agitación térmica³² (valores de B o Debye-Waller), que representan el desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio determinado de posición³², tomando en cuenta el factor Debye-Wayer para el carbono α de los aminoácidos, el algoritmo selecciona aquellas regiones a lo largo de la secuencia que muestren los valores de movilidad más elevados.³²

De tal modo, que al analizar la secuencia de la porina Omp C de *E. coli*, se identificaron las siguientes secuencias como probables regiones antigénicas:

REGION	SECUENCIA	VALORES DE B
5-11	NKDGKGL	1.084
26-32	DKGSDGD	1.109
64-70	QETGSND	1.121
122-128	QQRNGY	1.088
150-156	QGKNGSV	1.098
157-163	SGEQTQG	1.105
167-173	LNQNGAG	1.092
198-234	TADQNNT	1.106
246-254*	TSNGSNP	1.133
285-292*	QSKGKDI	1.105

Al alinear la secuencia de la porina Omp C de *E. coli* con la secuencia de la porina Omp C de *S. typhi* se observó que la región 285-303 es parcialmente compartida ya que presenta aminoácidos que no están presentes en *E. coli* y que la región 246-254 no es compartida con *E. coli* sino que es específica de *S. typhi*. (figura 2)

Este péptido al no ser compartido con *E. coli* podría estar involucrado en la respuesta inmune específica a *S. typhi*.

De tal modo que empleando los resultados obtenidos con estos algoritmos y por comparación con la secuencia de la porina Omp C de *S. typhi* (figura 3) se decidió trabajar con las siguientes regiones:

** La región de la porina comprendida entre los residuos 285-303 y cuya secuencia es (LQSKGKDISNGYGASYGDQ).

** La región comprendida entre los aminoácidos 246-254 cuya secuencia es (TSNGSNPS).

ALIGNMENT OF TWO PROTEIN SEQUENCES

The two sequences to be aligned are:
 1) Porina Omp C de S.typhi Total number of residues: 378.
 2) Porina Omp C de E.coli. Total number of residues: 367.

Comparison matrix : Structure-genetic matrix.
 Open gap cost : 2 Unit gap cost : 1

DNCFRT127- NEEVEVELLIPALLVACAAKAAATISVDFDNLALISFCFVCGIIFVIMVGDG-50
 DNCFCE011- NEEVEVELLIPALLVACAAKAAATISVDFDNLALISFCFVCGIIFVIMVGDG-50

DNCFRT127- DGGDTNKKIIFRDTVYVQGLTNGQVYVQIQCHCEKTEHIVHVAAPC-100
 DNCFCE011- DGGDTNKKIIFRDTVYVQGLTNGQVYVQIQCHCEKTEHIVHVAAPC-100

DNCFRT127- LAFAAGAGIIEGHIIVYDTEVETWDLRFEPVQVTEADWFMQGGNCTA-150
 DNCFCE011- LAFAAGAGIIEGHIIVYDTEVETWDLRFEPVQVTEADWFMQGGNCTA-150

DNCFRT127- LAIQQVGFQICAKATGWFVDFVETVNIYFPIQDCEIGSDFMQGGNCTA-150
 DNCFCE011- LAIQQVGFQICAKATGWFVDFVETVNIYFPIQDCEIGSDFMQGGNCTA-150

DNCFRT127- TVKATLFFGATNGLDFAIQIQFVHGVACE-----KIVKPKRILII--Q-180
 DNCFCE011- TVKATLFFGATNGLDFAIQIQFVHGVACE-----KIVKPKRILII--Q-180

DNCFRT127- KGGDGGSLFTRVIGCFVIVGALITERRATGQVHVAHARLY--DKCAA-V-230
 DNCFCE011- KGGDGGSLFTRVIGCFVIVGALITERRATGQVHVAHARLY--YIKCAALET-241

DNCFRT127- VYDGLLIDVAMVYIYAAQVAGVYHATVACTDQVPTKSCITANVAQPE-280
 DNCFCE011- VYDGLLIDVAMVYIYAAQVAGVYHATVAVY-----KLVNVAQVPE-283

DNCFRT127- VYAGVDFGLFAPVATLQVFCVQIEMVYASVQVIVLIVDVAETFF-334
 DNCFCE011- VYAGVDFGLFAPVATLQVFCVQIEMVYASVQVIVLIVDVAETFF-337

DNCFRT127- EKHKETTVDREHLLDHPDFTDAGVINTDVAALGVVDF-378
 DNCFCE011- EKHKETTVDREHLLDHPDFTDAGVINTDVAALGVVDF-367

number of gaps inserted in DNCFRT127: 4 Identity: 368 (97.3%)
 number of gaps inserted in DNCFCE011: 7

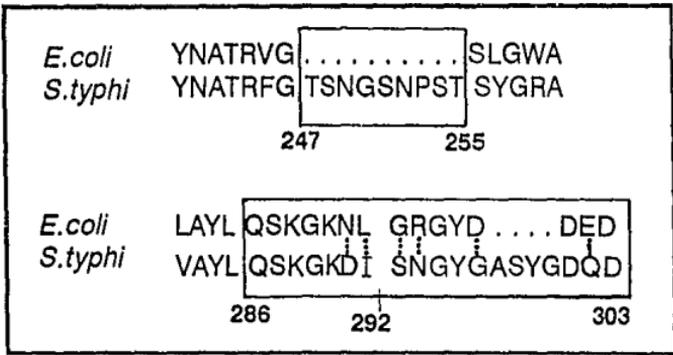


figura 2

Alineamiento de las secuencias de la porina Omp C de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. (reporte del análisis de las secuencias por el programa PALIGN, del paquete PCGENE)

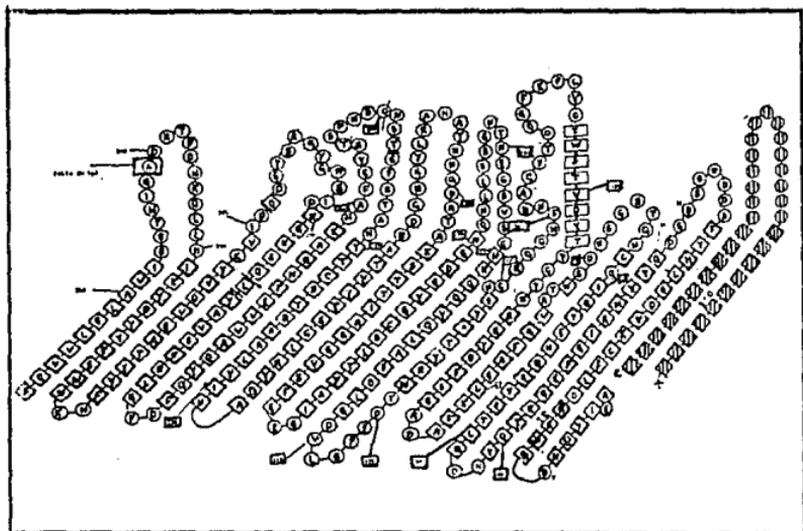


figura 3

Estructura secundaria propuesta para la porina Omp C de *Salmonella typhi*
• 9,12,Vi:d a partir de una comparación con los resultados de Cowan¹⁴

Estas regiones se sintetizaron en fase sólida empleando el método químico de los derivados Fmoc en poliamida reportada por Sheppard³³ y cols, la cual involucra la unión, por medio de un enlace covalente, de aminoácidos protegidos en su extremo α -amino a un soporte sólido de carácter insoluble e inerte, la purificación de los péptidos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna C18 y se verificó su composición mediante un análisis de aminoácidos utilizando derivados de orto-ftaldehído (OPA)^{32,34}.

Debido a que la región 246-254 es específica de *S. typhi* 9,12,Vi:d³⁵ y con el fin de tratar de establecer el papel inmunogénico de este péptido así como sobreproducirlo fácilmente, se realizó una construcción genética de una proteína híbrida con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), el péptido fué expresado unido a la porción amino de la subunidad B de la CTB en una proteína de fusión denominada PAP-CTB (péptido antigénico de la porina)³⁶.

Para Ello se empleó un sistema de sobreexpresión recombinante, en el plásmido pJS 752-3 (que contiene el gen de la CTB, controlado por el promotor Tacp³⁷), se insertó un oligonucleótido con el fragmento 246-254 (GTSNGSNPST) DE Omp C entre los sitios de restricción Xma I y Sac I, el plásmido resultante adquirió el sitio de restricción KpnI incluido en el oligonucleótido de Omp C.

La cepa *E. coli* DH 5 α fué transformada con este plásmido que lleva el gen Omp C, la producción de la proteína híbrida se comprobó mediante la titulación del sobrenadante de cultivo por ELISA y electroforesis (SDS-PAGE)³⁶.

De esta manera se tienen 2 fragmentos de la porina Omp C de *S. typhi* 9,12,Vi:d, las regiones (285-303) y (246-254) predichas como epítomos capaces de inducir una respuesta en el hospedero.

A la par de este trabajo se ha efectuado el mapeo de las regiones L6 y L7 de la porina Omp C de *S. typhi* 9,12,Vi:d utilizando anticuerpos policlonales obtenidos de suero de ratones inmunizados, comprobándose que las regiones contra las cuales están dirigidos estos anticuerpos se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria³⁵, sin embargo, debido a la policlonalidad se observaron reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas por lo que es necesario obtener anticuerpos monoclonales

dirigidos contra estas regiones y que éstos sean utilizados posteriormente para la identificación de estas regiones potencialmente antigénicas de la porina Omp C y para el estudio de la relación hospedero-parásito.

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Durante los años 1960s se desarrollaron métodos estructurales y genéticos para la producción de altas cantidades de anticuerpos, siendo el más utilizado el cultivo de diferentes células de mieloma.

Un mieloma o plasmacitoma es un tumor de células productoras de anticuerpos (CPA), cada tumor representa la proliferación de una clona única de células, es por esto que se han generado y estudiado un gran número de mielomas, principalmente de origen murino. Sin embargo, a pesar de los avances en esta área no ha sido posible generar mielomas antígeno-específicos por lo que ha sido necesario fusionar estas células mieloides con linfocitos productores de anticuerpos con una especificidad predeterminada. De las líneas celulares adaptadas para este fin, la más utilizada es la línea celular P3-X63-Ag8 la cual descende del mieloma de ratón MOPC-21 secretor de IgG

En 1986, Köhler y Milstein obtuvieron el Premio Nobel por su contribución en el desarrollo de técnicas para la obtención de anticuerpos monoclonales, al lograr fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos obtenidos de un ratón inmunizado con un antígeno determinado^{38,39,40}.

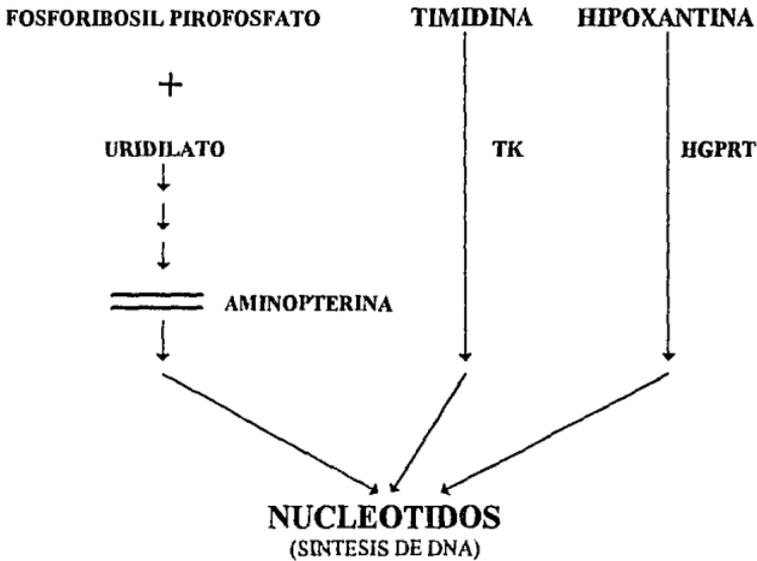
La obtención de anticuerpos monoclonales se basa en lo siguiente: fusionar una célula plasmática (productora de anticuerpos contra un antígeno determinado) con una célula neoplásica especialmente seleccionada, obteniendo de esta manera células híbridas que expresan tanto la propiedad del linfocito B de producir anticuerpos para un antígeno determinado, como el carácter inmortal de las células mielómicas.

Estas células fusionadas, denominadas hibridomas o plasmacitomas producen anticuerpos homogéneos (anticuerpos monoclonales) que pueden ser seleccionados por

su reactividad a un antígeno determinado. El linfocito B contribuye con genes específicos para el anticuerpo en los híbridos y la célula mielómica contribuye con genes que proporcionan al hibridoma el carácter de inmortal, para que se divida indefinidamente y continúe la expresión de los genes de la inmunoglobulina.^{41,42}

Las células de bazo de ratón, previamente inmunizadas con el antígeno, son fusionadas con la línea de mieloma, la fusión se lleva a cabo en un medio que contiene polietilenglicol (PEG) como agente fusionante; la selección posterior de las células híbridas depende de la capacidad de las células para utilizar la vía "alterna" de síntesis de DNA por producción de guanósina cuando la vía biosintética "principal" es bloqueada (usualmente por antibióticos, aminopterina o amethopterina) ya que ambas vías son necesarias para la formación de los precursores del DNA, esta selección se lleva a cabo en un medio que contiene aminopterina-hipoxantina-timidina (HAT).

Cuando la vía metabólica principal es bloqueada por aminopterina, el camino alternativo para las células es utilizar la hipoxantina existente en el medio; sin embargo, las células tumorales deficientes de las enzimas hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT) y timidina-cinasa (TK) mueren al no poder utilizar la vía "alterna" para la síntesis de nucleótidos, los linfocitos de bazo mueren debido a su vida media corta en cultivo (6 a 7 días), de tal modo que solamente los híbridos (mieloma-linfocito B) que resulten de la fusión continuarán duplicándose^{41,42,43,44} (Figura 4).

VIA PRINCIPALVIA ALTERNA

TK= Timidina cinasa

HGPRT= Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa

Enzimas ausentes en las células de mieloma utilizadas para la fusión

figura 4

Importancia de las enzimas TK y HGPRT en la síntesis de ácidos nucleicos

De tal modo que la selección de las células se efectúa como sigue:

TABLA 2:

SINTESIS DE DNA			
TIPO DE CELULA	VIA ALTERNA	VIA PRINCIPAL	SOBREVIVENCIA EN MEDIO HAT
MIELOMA	HGPRT ⁻	sensible a aminopterina	mueren (no sintetizan DNA)
CELULAS DE BAZO	HGPRT ⁺	sensible a aminopterina	viven (pueden utilizar la hipoxantina presente en el medio)
HIBRIDOS (MIELOMA-CELULAS DE BAZO)	HGPRT ⁺	sensible a aminopterina	sobreviven
HIBRIDOS (MIELOMA-MIELOMA)	HGPRT ⁻	sensible a aminopterina	mueren (no sintetizan DNA)
HIBRIDOS (CEL. BAZO-CEL. BAZO)	HGPRT ⁺	sensible a aminopterina	viven (en la media corta en cultivo 6-7 días)

Las características que deben tener las células de mieloma para su uso en la fusión son las siguientes:

A) Ser deficientes en la enzima timidina-cinasa (TK), por crecimiento en bromodeoxiuridina, TK es una enzima que fosforila nucleótidos de timidina, sustrato necesario para la síntesis de nucleótidos y DNA.

B) O bien, ser deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT⁻), el aislamiento de células HGPRT⁻ es relativamente sencillo, debido a que la enzima es codificada por un solo cromosoma X activo presente en cada célula, de modo que sólo se requiere una mutación para que se pierda la capacidad de producir la enzima. La selección posterior de las células de mieloma HGPRT⁻ se lleva a cabo en un medio de cultivo en presencia de una base análoga sumamente tóxica: 8-azoguanina (8-AG) o bien 6 tioguanina (6-TG), la cual es incorporada al DNA de la célula vía HGPRT, este compuesto se adiciona a la célula en concentraciones que varían de 1 a 100 µg/ml en un período de 6 a 8 semanas durante el cual se realizan varias clonaciones con el fin

de seleccionar aquellas células de crecimiento vigoroso y que hayan perdido la capacidad de producir la enzima, teniendo de esta manera células HGPRT⁻ disponibles para su empleo.

Existen en el mercado una gran cantidad de líneas celulares HGPRT⁻ producidas comercialmente, de tal modo que el procedimiento antes descrito se realiza en situaciones en que es estrictamente necesario, por otra parte, el utilizar 6-TG da una mejor selección de las células HGPRT⁻ que el uso de 8-AG⁴³.

C) No producir inmunoglobulinas, de tal modo que al ser fusionadas con linfocitos productores de anticuerpos, las células híbridas resultantes expresan únicamente inmunoglobulinas para el antígeno seleccionado.

Por otra parte, es importante asegurarse que las células linfoides productoras de anticuerpos se encuentren dividiendo y secretando anticuerpos, por lo que es recomendable llevar a cabo la fusión durante 3 a 5 días después de la administración de un antígeno, obteniendo de esta manera un gran número de híbridos productores.

Finalmente mediante una serie de ensayos de selección y clonación se obtendrá el híbrido que sintetice el anticuerpo de la especificidad deseada, la clona que cumpla con éstas características debe ser aislada y propagada tanto *in vitro* como *in vivo* para su posterior utilización.

Considerando los problemas asociados con la producción de células híbridas productoras de anticuerpos, es necesario mencionar algunos aspectos generales importantes:

El problema más importante que se presenta al momento de realizar la fusión es el de aumentar la frecuencia de fusiones espontáneas, debido a ésto, la primera sustancia utilizada como agente fusionante fué el virus Sendai inactivado⁴², observándose que al incubar a 37°C el virus con células susceptibles de ser atacadas por éste, la membrana adyacente al sitio de adsorción del virus sufre daño, de tal manera que se forma un puente citoplasmático entre células adyacentes y las células son fusionadas. Sin embargo, esta técnica presentó ciertas desventajas: no se podía llevar a cabo con cierto tipo de células y la producción natural del virus *in vitro* es difícil, es por

ésto que el uso de sustancias como isolecitina y polietilenglicol (PEG) se hizo necesario y se obtuvieron excelentes resultados⁴⁴, siendo el PEG la sustancia de uso más frecuente en los últimos años, por lo que se han descrito un gran número de protocolos para su uso en fusiones de hibridomas^{45,46,47}, las variables más importantes que hay que tomar en cuenta son: la concentración de PEG utilizada, normalmente se utiliza al 40% y 50% (w/v); el pH del medio, fusiones máximas ocurren entre un pH 8 y un pH 8.2; el tiempo de exposición, a causa de la toxicidad del PEG el tiempo de exposición se reduce al mínimo: 1- 2 min en PEG 50% y arriba de 7 min en PEG 30%; finalmente la temperatura (entre 20°C y 37°C) y la proporción de células utilizadas.

En algunos casos se hace necesario el uso de células alimentadoras para un mejor crecimiento de los hibridomas durante la clonación, expansión y cultivo de células descongeladas⁴⁸. Hay evidencias que sugieren que la duplicación de hibridomas es mayor en estados tempranos de cultivo⁴⁹.

Cuando los hibridomas han crecido lo suficiente es necesario seleccionar aquellas células productoras mediante un ensayo adecuado, tomando en cuenta las siguientes características:

****** Que la técnica a utilizar cuente con una gran especificidad para el anticuerpo en estudio.

****** Sea lo suficientemente sensible y fácilmente reproducible, así como capaz de procesar un número elevado de muestras en un intervalo de tiempo reducido, ya que el tiempo que transcurre entre la toma de sobrenadante de cultivo y la realización del ensayo no debe ser mayor de 24 h debido al rápido crecimiento de las células híbridas.

En 1971, Enquall y Perlman desarrollaron el procedimiento denominado ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)⁵⁰, siendo este el método comúnmente utilizado para la selección de hibridomas (figura 5).

Cuando se ha seleccionado la clona productora, es necesario efectuar una o más clonaciones según sea el caso, con el propósito de aislar de los millones de células generadas durante la fusión una célula productora de anticuerpos contra el antígeno deseado, de tal manera que se establezcan líneas de células monoclonales, es

indispensable congelar y almacenar los cultivos de células obtenidas antes y durante la clonación por 3 razones importantes:

****** Durante la clonación, particularmente durante estados tempranos de crecimiento, los hibridomas son particularmente susceptibles de perder la capacidad de producción.

****** Existe un riesgo de sobrecrecimiento de células productoras de anticuerpos que no nos interesan.

****** Siempre existe el riesgo de contaminaciones por levaduras o bacterias y el tratar de salvar los cultivos de células de este tipo de contaminaciones requiere de tiempo y del uso de antibióticos que pueden afectar tanto el crecimiento como la capacidad de producción de las células.

Debido a que el estudio de la porina Omp C de *S. typhi* ha demostrado que participa parcialmente en la inducción de un estado de protección a la infección por esta bacteria en el modelo murino⁵¹, es necesario obtener anticuerpos monoclonales contra estas regiones, de tal manera, que el empleo de estos anticuerpos ayude a determinar el papel que desempeñan dichas regiones en la inducción de protección y en el estudio de la relación hospedero-parásito, así como en un futuro tratar de utilizarlos para estudios de topología y posiblemente de diagnóstico.

TECNICA DE ELISA

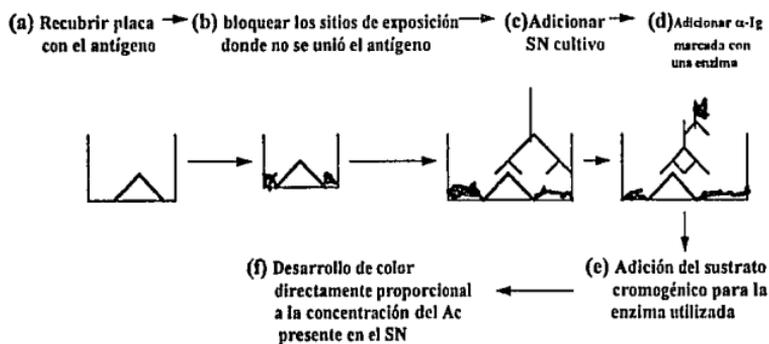


figura 5

IV. HIPOTESIS

Los péptidos de la porina Omp C de *S.typhi* (285-303) y (246-254) que corresponden a regiones expuestas de esta proteína, serán capaces de generar anticuerpos monoclonales que reconozcan a la porina nativa y a la bacteria completa.

V. OBJETIVOS

** OBJETIVO GENERAL:

Obtener anticuerpos monoclonales para el mapeo de regiones expuestas de la porina Omp C de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d.

** OBJETIVO PARTICULAR:

Que los anticuerpos monoclonales generados a partir de péptidos inmunogénicos reconozcan de manera exclusiva a las regiones L6 (246-254) y L7 (285-303) de la porina Omp C de *S.typhi*.

VI. MATERIALES Y METODOS

1) SELECCION DE CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron las siguientes cepas:

E. coli DH 5 α [pJS 752-3](productora de CTB), *E. coli* DH 5 α [pJAK](productora de la proteína híbrida L6-CTB), *E. coli* UH 302 [pST 13](productora de Omp C₁), *E. coli* pJP L7 (productora de la proteína híbrida L7-CTB), *E. coli* pJP L8 (productora la proteína híbrida L8-CTB), *S. typhi* 9,12,Vi:d, *E. coli* K12 y *E. coli* DH 5 α . Las cuales se sembraron por aislamiento en placas de agar-*juria* y se incubaron 24 h a 37°C, posteriormente se seleccionó al azar una colonia de cada placa, y se cultivaron individualmente en agitación durante 8 h (crecimiento en fase logarítmica) a 37°C, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7000 rpm y los sobrenadantes se congelaron a -20°C para su uso posterior. Para el caso de las bacterias que secretan proteínas recombinantes se añadió al medio de cultivo ampicilina a una concentración de 250 μ g/ml siguiendo el procedimiento de cultivo descrito.

2) ESQUEMA DE INMUNIZACION

Los péptidos sintéticos fueron sonicados (sonipret 150), posteriormente se hizo una emulsión en adyuvante completo de Freund y se inmunizaron ratones de la cepa C3H/HEJ hembras de 6 a 8 semanas de acuerdo al siguiente esquema:

DÍA	VIA	DOSIS RESINA-PEPTIDO
-----	-----	-------------------------

0	i.p.	0.5mg*
15	i.p.	0.5mg*
22	retroorbital	SANGRIA

* Equivalente de péptido:10 μ g

3) TITULACION DE LOS SUEROS DE LOS RATONES INMUNIZADOS CON EL CONJUGADO RESINA-PEPTIDO

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-péptido en el suero de los ratones inmunizados se utilizó un ensayo de ELISA de la manera siguiente:

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos con 10 μ g por pozo de porinas de *S.typhi* en amortiguador de carbonatos (pH 9.5) incubando 2 h a 37°C y a 4°C toda la noche, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 (tween 20 al 0.01%) y se añadió la solución de bloqueo (PBS-leche 5%) incubando las placas 2 h a 37°C, las placas se lavaron y se añadieron los sueros de los ratones inmunizados en diluciones 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 y se incubaron a 2 h a 37°C, las placas se lavaron y se añadieron 100 μ l del conjugado (anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa) en una dil. 1:1000, las placas se incubaron 2 h a 37°C para posteriormente adicionar 100 μ l de la solución de sustrato (O-fenilendiamina 500 μ g/ml, amortiguador de citratos 0.1M 12ml pH 5.6 y peróxido de hidrógeno 30% 10 μ l) a los 20 min la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2.5N y se efectuaron las lecturas de absorbancia a 492nm.

4) OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La obtención de anticuerpos monoclonales es esquematizado de manera general en la Figura 6.

4.1) OBTENCION DE MACROFAGOS DE CAVIDAD PERITONEAL PARA SU USO COMO CELULAS ALIMENTADORAS

Se sacrificaron ratones de la cepa C3H/HEJ y se inyectó intraperitonealmente solución de Hanks, se dió un masaje durante 10 min y se removió el líquido con ayuda de una jeringa estéril. El líquido así obtenido se centrifugó a 1500 rpm durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con solución de Hanks,

resuspendiéndola posteriormente en medio RPMI 1640 complementado (glutamina 2mM, 2-β-mercaptoetanol 50μM, piruvato de sodio 5ml, estreptomina 100μg/ml, gentamicina 200μg/ml y 15% SFB) colocándose 50μl de ésta solución en cada pozo de una placa de 96 pozos.

La cantidad de células adicionadas por pozo es variable de acuerdo al número de placas a recubrir: para clonación se utilizan aproximadamente 40,000 células por pozo en una placa de 96 pozos, para expansión en placas de 24 pozos se utilizan aproximadamente 80,000 células en 0.5 ml de medio para cada pozo.

4.2) LINEA CELULAR DE MIELOMA

Se utilizó la línea celular X63-Ag8.653 (Ag8) deficiente de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT), se mantuvieron en cultivo utilizando medio RPMI 1640, dentro de una incubadora a 37°C con atmósfera controlada de humedad y 5% de CO₂ hasta el momento de su utilización para la fusión. Al momento de utilizarlas para la fusión se determinó la viabilidad de las células en una cámara de Neubauer dil. 1:10 con azul tripán 0.2%, la cual fué del 87%, estas células se cosecharon en fase de crecimiento logarítmico centrifugándose a 1200 rpm/5 min.

4.3) OBTENCION DE CELULAS ESPLENICAS

Se sacrificaron los ratones inmunizados de acuerdo al esquema antes descrito, dentro de una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se maceró el bazo con ayuda de un tamíz, las células dispersadas se centrifugaron a 1500 rpm durante 10min; el paquete celular se lavó 2 veces en solución de Hanks, finalmente, el paquete celular se resuspendió en medio RPMI 1640 complementado y se determinó que la viabilidad de las células al momento de su utilización para la fusión fué del 89%

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

ESQUEMA GENERAL



figura 6

4.4) FUSION

Las células de mieloma cosechadas en fase logarítmica (10^7 - 10^8 células) y las células esplénicas obtenidas de acuerdo al método descrito previamente, se lavaron dos veces con solución de Hanks, se resuspendió cada paquete celular en medio RPMI 1640 (complementado sin SFB) y se contó la viabilidad de las células en cada caso con ayuda de una cámara de Neubauer a una dilución 1:10 en azul tripán 0.2%; posteriormente las células se mezclaron en una proporción 5:1 (Bazo-Mieloma), se centrifugaron a 1200 rpm/5 min eliminando el sobrenadante, se adicionó lentamente 0.8 ml de polietilenglicol (PEG) 1500 durante 1 min y se dejó reposar la mezcla durante 3 min a 37°C. Posteriormente se adicionó medio RPMI 1640 y se centrifugó la mezcla a 800 rpm/5 min, la pastilla se resuspendió cuidadosamente en medio RPMI 1640 complementado más 15% SFB distribuyendo 50 μ l de esta suspensión a cada una de las placas de cultivo, las cuales 48 h antes de la fusión habían sido recubiertas con macrófagos de cavidad peritoneal obtenidos de ratón, las placas se incubaron posteriormente dentro de una estufa con atmósfera controlada de humedad y 5 % de CO₂ adicionando medio de cultivo hasta un volumen total de 100 μ l por pozo. (figura 7)

4.5) SELECCION DE CELULAS HIBRIDAS.

Después de 24 h el medio RPMI fué sustituido por medio HAT (RPMI 1640 suplementado con hipoxantina-aminopterina-timidina) quitando 50 μ l del volumen total y añadiendo posteriormente el volumen correspondiente de medio HAT; las células se mantuvieron en este medio por 20 días. Las clonas con crecimiento de células híbridas se revisaron diariamente hasta el momento en que crecieron lo suficiente para secretar cantidades detectables de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo, la presencia de estos anticuerpos se detectó mediante un ensayo de ELISA; una vez efectuado este ensayo, se seleccionaron las clonas productoras de anticuerpos anti-péptido y estas fueron expandidas a placas de 24 pozos y posteriormente a botellas de 25 cm², estas

células productoras fueron clonadas y preservadas *in vitro*. (figura 8)

4.6 CLONACION DE CELULAS HIBRIDAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDO

Las células híbridas productoras de anticuerpos fueron clonadas por el método de dilución limitante de la siguiente manera: Se tomó una alícuota de 10 μ l de células híbridas y se contó el número de células viables en una cámara de Neubauer a una dilución 1:10 con azul tripán al 0.2%, posteriormente se realizaron las diluciones necesarias a fin de tener 0.3 células por pozo (30 células viables en 10 ml de medio). Se colocaron 100 μ l de esta dilución en cada uno de los pozos de una placa de cultivo de 96 pozos y se incubaron las placas durante 7-10 días en una incubadora a 37 $^{\circ}$ C y 5% de CO $_2$. (figura 9)

4.7 ENSAYOS DE ELISA UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDO

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-péptido 246-254 y anti-péptido 285-303 en los sobrenadantes de híbridomas se utilizaron los siguientes sistemas de ELISA para cada caso:

** Para el péptido 285-303 se utilizó el sistema poly-L-lisina debido a que se contaba con el péptido sintetizado³⁴.

** Para el péptido 246-254 se utilizó el sistema GM1-ELISA⁵² ya que se contaba con la proteína híbrida PAP-CTB (péptido antigénico de la porina unido a CTB), secretada al medio de cultivo por la bacteria *E. coli* DH 2 α [pJS 752-3].

4.7.1 SISTEMA POLY-L-LISINA (PEPTIDO 285-303)

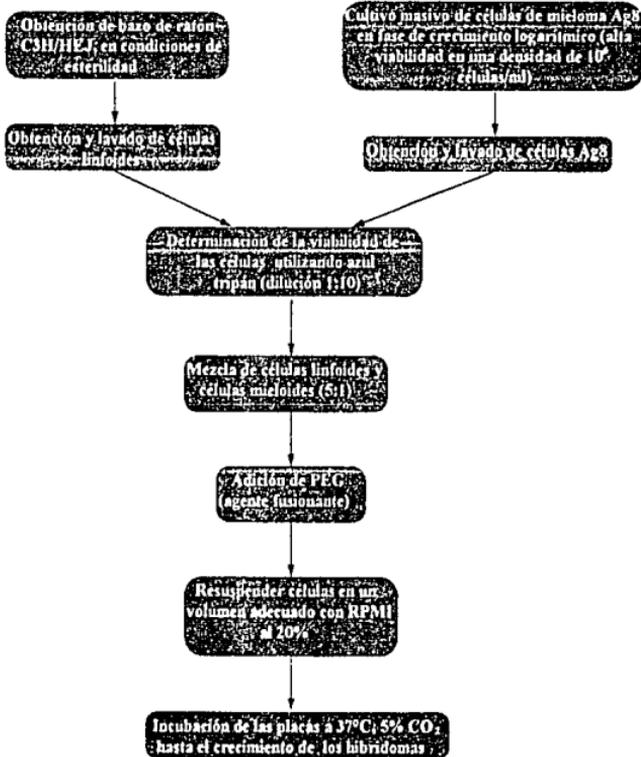
Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos con 100 μ l de poly-L-lisina

(sigma, 10 µg/ml, p.m. mayor 70,000) las placas se incubaron 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C y se lavaron con PBS-tween 80 (tween 80 al 0.1% en PBS), se añadieron 100 µl del péptido 285-303 (5 µg/ml en PBS) incubando 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, transcurrido este tiempo las placas se lavaron y se incubaron con 200 µl/pozo de solución de bloqueo (leche 5% en PBS) 2 h a 37°C adicionando posteriormente 100 µl/pozo de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por agotamiento del cultivo celular, se incubaron las placas 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, las placas fueron lavadas con PBS-tween 80 y se añadieron 100 µl del conjugado (anticuerpo anti-IgG de ratón unido a peroxidasa) en una dilución 1:1000 2 h a 37°C, finalmente las placas se lavaron y se añadieron 100 µl de la solución de sustrato (O-fenilendiamina 6mg, amortiguador de citratos 12.5 ml 0.1M pH 5, H₂O₂ 30% 10 µl) a los 20 min la reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 2.5N y se midió la absorbancia a 492nm. (figura 10)

4.7.2 SISTEMA GM1-ELISA (PEPTIDO 246-254)

Se incubaron placas de poliestireno con 100 µl por pozo de una solución de monosialogangliósido-GM1 1.5 µM en PBS (NaH₂PO₄ 0.18 g/l, Na₂HPO₄ 1.236 g/l y NaCl 8.5 g/l, pH 7.2) 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, seguido de lavados con PBS-tween 20 (tween 20 0.1% en PBS); posteriormente se incubaron las placas con 200 µl/pozo de solución de bloqueo (ASB 1% en PBS) 2 h a 37°C, las placas se lavaron con PBS-tween 20 y se adicionaron los sobrenadantes de cultivo de hibridomas incubando 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, las placas se lavaron y se añadió el conjugado anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Gibco BRL) en una dilución 1:1000 durante 2 h, una vez lavadas, se colocaron 100 µl de la solución de sustrato (O-fenilendiamina 5mg, amortiguador de citratos 0.1M pH 5 y 10 µl de H₂O₂ 30%) la reacción se detuvo a los 20 min con ácido sulfúrico 2.5N y se realizaron las lecturas de absorbancia a 492nm. (figura 10)

FUSION



SELECCION DE CELULAS HIBRIDAS

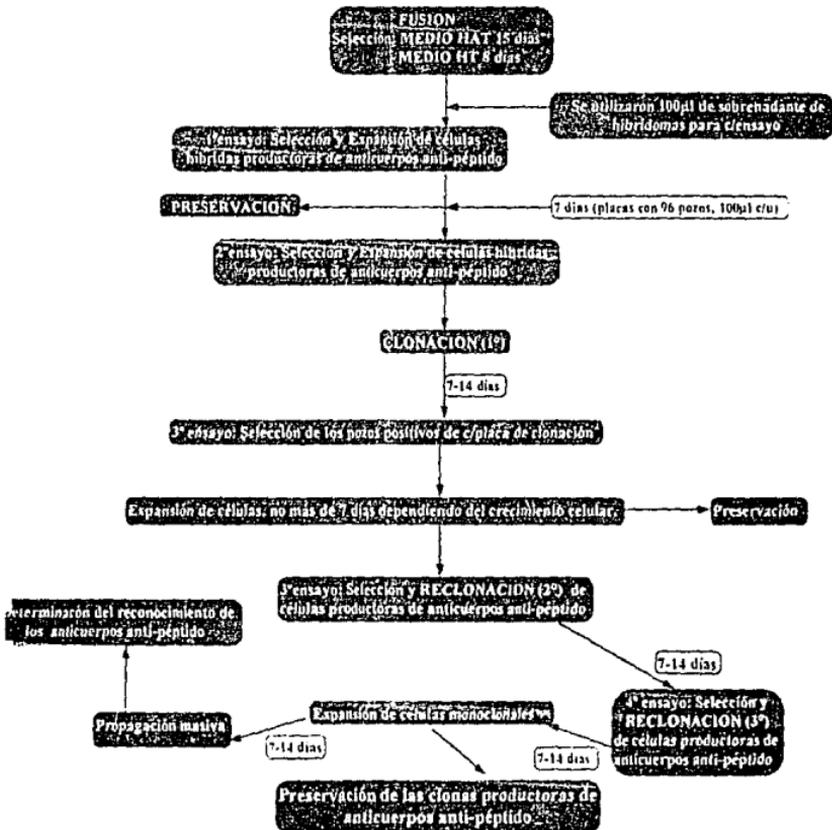


figura 8

CLONACION

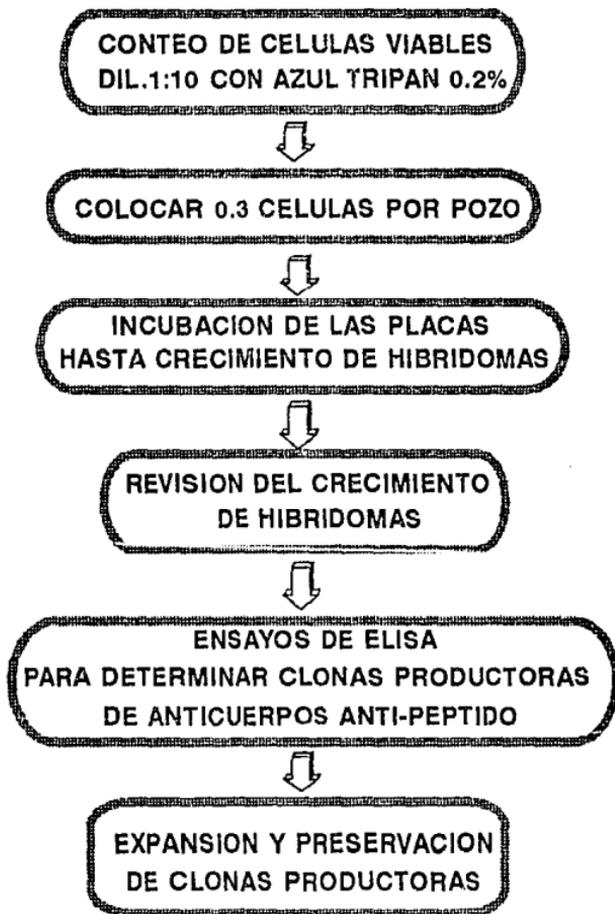


figura 9

SISTEMAS DE ELISA UTILIZADOS

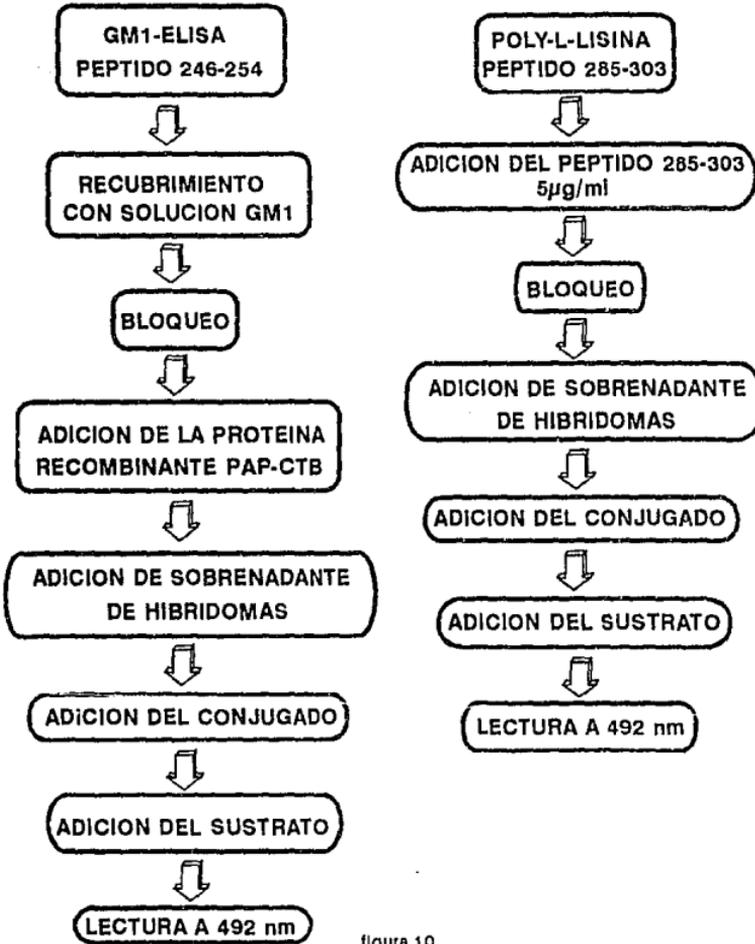


figura 10

4.8 PROPAGACION DE CELULAS HIBRIDAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS

4.8.1 PROPAGACION IN VITRO

La propagación de células híbridas productoras consistió en pasar las células a placas de 24 pozos y posteriormente a botellas de 25 cm², estas células se mantuvieron en cultivo reemplazando un volumen de medio de cultivo por medio fresco. Cuando la confluencia de células fue adecuada sin que hubiera daño en las células por sobrecrecimiento, se tomó el sobrenadante de cultivo para determinar los anticuerpos secretados por los híbridos mediante un ensayo de ELISA y de FACS. Las clonas productoras se crecieron posteriormente en botellas de 80 cm² realizando el mismo procedimiento.

4.8.2 PROPAGACION IN VIVO

Diez días antes de la inoculación de las células, se inyectaron 0.5 ml de pristano (2,6,10,4-tetrametilpentadecano) por vía i.p. en ratones de la cepa C3H/HEJ, una vez transcurrido este tiempo, se inyectaron por vía i.p. 0.5 ml de células híbridas productoras de anticuerpos en fase de crecimiento logarítmico (aproximadamente 10⁶-10⁷ células).

Cuando el tumor se hizo evidente (aproximadamente 6 a 8 semanas) se obtuvo el líquido de ascitis y se congeló a -70°C.

4.9 ALMACENAMIENTO DE CELULAS

Para conservar los hibridomas obtenidos tanto en la fusión como en cada una de las clonaciones realizadas se congelaron aproximadamente 2-10 x 10⁶ células en 0.25 ml de solución crioprotectora (4% de DMSO y 96% de SFB) de la siguiente manera: Las

células se centrifugaron 1200 rpm/10min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 0.25 ml de solución crioprotectora, las células se colocaron posteriormente en un criotubo y se almacenaron a -70°C durante 24 h y finalmente fueron transferidas a nitrógeno líquido (-196°C).

5.0 ANALISIS DE CITOMETRIA DE FLUJO (FACS)

En medio mínimo M9 (Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g, NaCl 1g, MgSO_4 1M 2ml, glucosa 20% 10ml y CaCl_2 1M 0.1ml) se cultivó toda la noche una colonia de las bacterias *E. coli* K12 y *S. typhi* 9,12,Vi:d, las bacterias se cosecharon en fase de crecimiento logarítmico y los botones se lavaron con PBS estéril (pH 7.4, estéril y filtrado con poro de 0.22μ), se ajustó la densidad óptica a 0.6 a 540 nm (1×10^9 bacterias/ml). Se hizo una dilución 1:10 (aproximadamente 1×10^8 bacterias/ml en PBS) colocando 100 μ l de esta dilución en tubos eppendorf de 1 ml de capacidad, los tubos se centrifugaron a 2,500 rpm/10 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 μ l de sobrenadante de hibridomas obtenidos por agotamiento del cultivo celular, se incubaron los tubos a 4°C toda la noche, se eliminó el sobrenadante por centrifugación y las pastillas se lavaron con PBS-suero normal de conejo 2% añadiendo posteriormente el conjugado (anticuerpo anti-IgG de ratón unido covalentemente con isotiocianato de fluoresceína el cual da una fluorescencia verde a 525nm) dil 1:1000 en PBS-SNC 2% y se incubaron a 4°C 30 min. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación y las pastillas de células se lavaron con PBS-SNC 2% añadiendo posteriormente 500 μ l de yoduro de propidio (100 μ g/ml) dil. 1:1000 en PBS-SNC 2% y se procedió a realizar las lecturas en el aparato de FACS.

VII. RESULTADOS

1) SUEROS ANTI-PEPTIDO

1.1) OBTENCION DE SUEROS ANTI-PEPTIDO 246-254 y 285-303

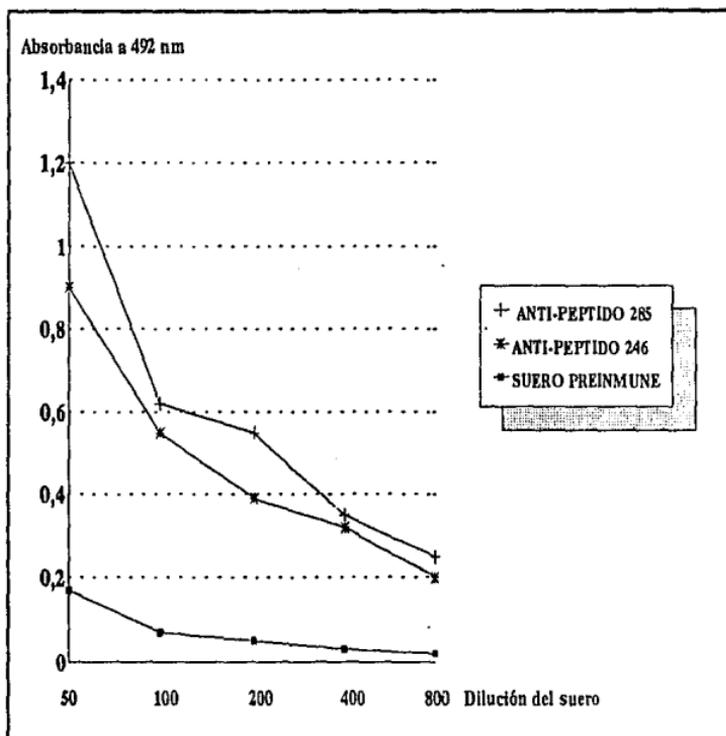
Después de inmunizar ratones de la cepa C3H/HEJ con los conjugados péptido-resina emulsificados en adyuvante completo de Freund, los animales fueron sangrados 22 días después de la primera inoculación.

1.2) TITULACION DE LOS SUEROS

Se probó el reconocimiento de los sueros anti-péptido 285-303 y 246-254 hacia la porina rOmp C nativa mediante un ensayo de ELISA a los 22 días de inmunización con el conjugado resina-péptido (Gráfica 1), se observó que los sueros anti-péptido 246-254 y anti-péptido 285-303 reconocen a la proteína nativa aproximadamente 10 veces más que el suero preinmune, este reconocimiento indica que las regiones reconocidas por estos anticuerpos se encuentran expuestas en la porina.

2) OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Para realizar la fusión se utilizó una mezcla 5:1 de células linfoides y células de mieloma y se utilizaron cantidades variables de células por pozo (100mil, 200mil, 400mil y 2 millones) obteniendo una elevada eficiencia de fusión para ambos péptidos (tabla 2). El criterio para la selección de las clonas productoras de anticuerpos anti-péptido fué la reclonación de las células híbridas positivas para el ensayo de ELISA, así como la verificación de que estas clonas de células dieran la misma o mejor respuesta de ELISA a lo largo de las 3 clonaciones realizadas.(figuras 11 y 12)



Gráfica 1

Respuesta de anticuerpos totales hacia el conjugado resina-peptido Omp C 246-254 y 285-303 al día número 22 de inmunización utilizando como antígeno a la porina rOmp C en su forma nativa

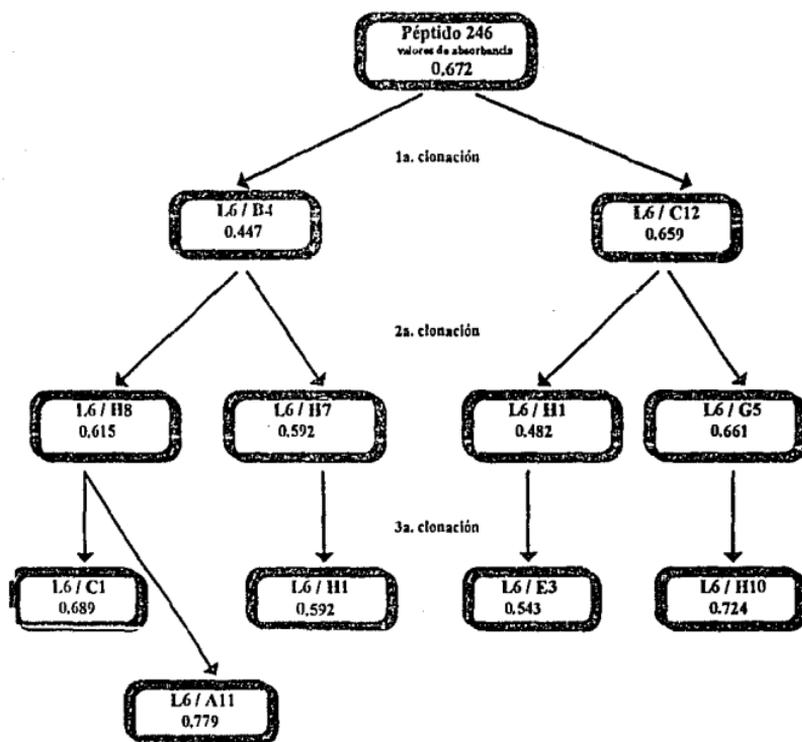
PEPTIDO	SECUENCIA	No. POZOS TOTALES	No. PLACAS	CELULAS POR POZO	EFICIENCIA DE FUSION
246-254	TSNGSNPS	24	2	100mil	25%
		18	2	200mil	18%
		22	2	400mil	22%
		12	1*	2millones	50%
285-303	LQSKGKDIS NGYGASSYG DQ	15	1	100mil	15%
		24	3	200mil	25%
		21	2	400mil	22%
		8	2*	2millones	33%

* placas de 24 pozos

Tabla 3

Eficiencia de fusión obtenida utilizando una relación 5:1 de células de mieloma y células de bazo.

CLONAS ANTI-PEPTIDO 246-254
(L6)



C(+)=1.186 C(-)=0.08

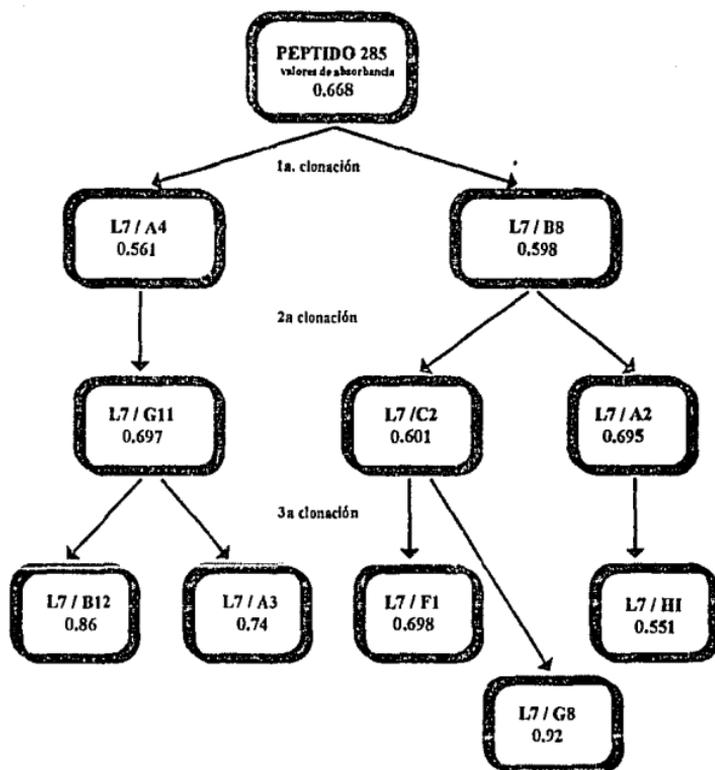
valores de absorbancia a 492 nm

figura 11

Secuencia de clonaciones para la obtención del anticuerpo monoclonal L6-A11

CLONAS ANTI-PEPTIDO 285-303

(L7)



C(+)=1.28 C(-)=0.012

Valores de absorbancia a 492 nm

figura 12

Secuencia de clonaciones para la obtención de los anticuerpos monoclonales L7-F1, L7-G8

3) REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-PEPTIDO HACIA LA PROTEINA HIBRIDA PAP-CTB

Se realizó un ensayo GM1-ELISA utilizando sobrenadante de hibridomas obtenidos por agotamiento del cultivo celular (**figura 13**), se observa que el anticuerpo monoclonal L6-A11 (reactividad anti-246-254) reconoce al péptido correspondiente expresado como una proteína híbrida denominada L6-CTB, no presenta reconocimiento hacia la región L7 (L7-CTB) ni hacia la región L8 (L8-CTB) de la porina Omp C de *S. typhi*, de tal modo que el anticuerpo reconoce únicamente a la región 246-254 y no hay cruce al menos con una tercera asa de la porina.

Los anticuerpos monoclonales L7-G8 y L7-F1 (reactividad anti-285-303) reconocen también al péptido correspondiente expresado como una proteína híbrida denominada L7-CTB, en ambos casos no hay reconocimiento hacia la región L6 (L6-CTB) ni hacia la región L8 (L8-CTB), de tal modo que el reconocimiento es únicamente hacia la región 285-303, con estos resultados podemos concluir que los péptidos 246-254 y 285-303 de la porina omp C de *S. typhi*, acarreados por la proteína CTB, son reconocidos por anticuerpos dirigidos contra la proteína en su forma nativa.

4) RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HACIA LAS PORINAS DE *Salmonella typhi*

Esta determinación se realizó por un ensayo de ELISA utilizando como antígeno porinas de *S. typhi* obtenidas por el método de Nikaído¹⁰, se encontró que tanto los anticuerpos dirigidos contra el péptido 246-254 (L6-A11) como los dirigidos contra el péptido 285-303 (L7-G8 y L7-F1) reconocen a la porina completa, de tal modo que las regiones que reconocen estos anticuerpos se encuentran expuestas en la superficie de las mismas. (**figura 14**)

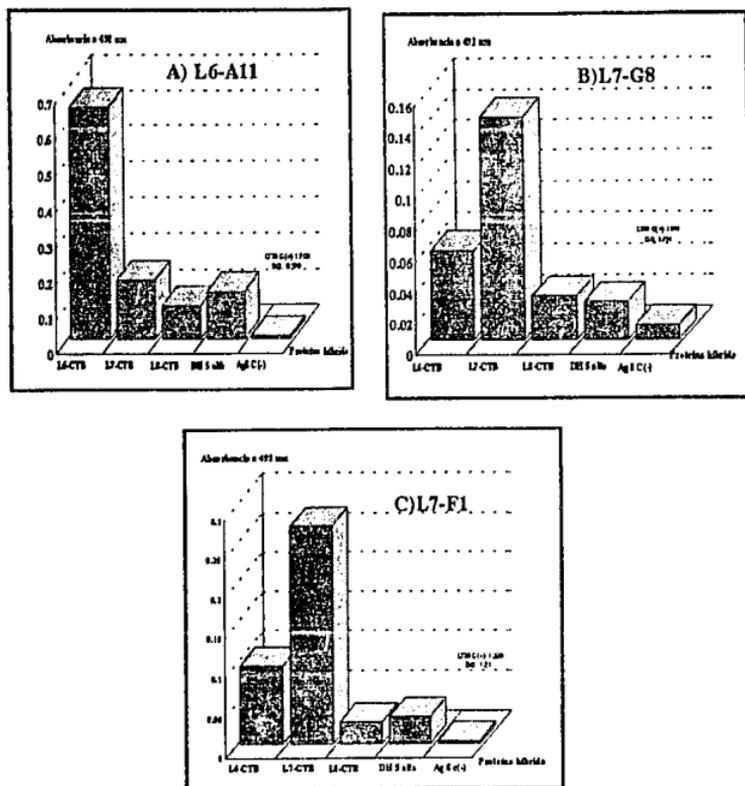


Figura 13

Especificidad del sistema PAP-CTB-GM1. GM1-ELISA con sobrenadante de las clonas A) L6-A11, B) L7-G8 y C) L7-F1.

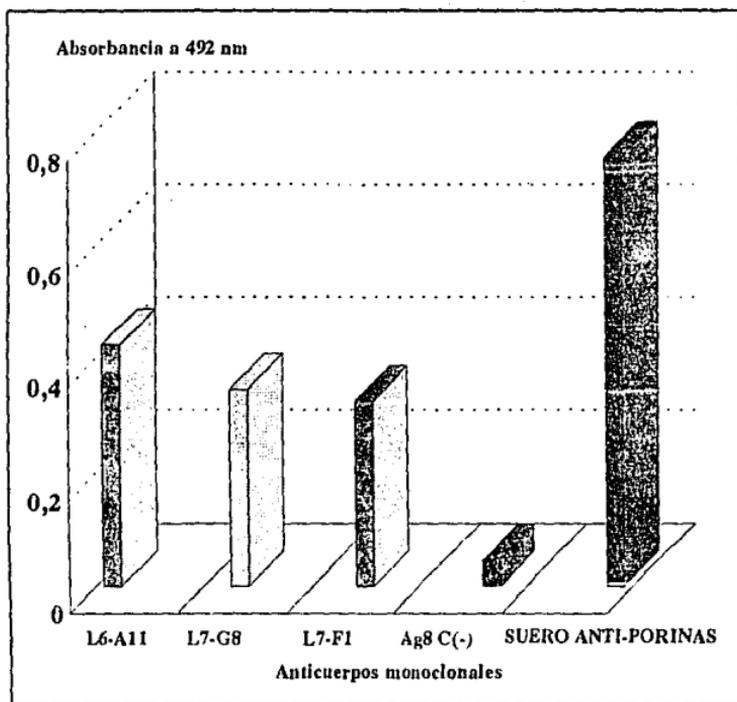


Figura 14

Reconocimiento por ELISA de los anticuerpos monoclonales L6-A11 (reactividad anti-246-254), L7-G8 y L7-F1 (reactividad anti-285-303) hacia las porinas de *S. typhi*.

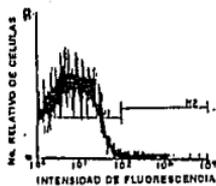
5) ANALISIS DE CITOMETRIA DE FLUJO (FACS)

Se realizó el ensayo de FACS con las bacterias *E. coli* K12 y *S. typhi* 9,12,Vi:d utilizando sobrenadantes de hibridomas productores de anticuerpos anti-péptido, se observa que los anticuerpos anti-péptido son capaces de reconocer a la bacteria completa, indicado por el desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha. (figura 15)

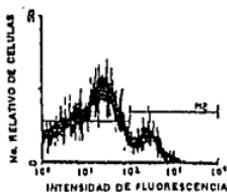
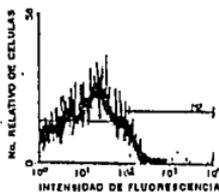
El anticuerpo monoclonal L6-A11 (reactividad anti 246-254) muestra un reconocimiento únicamente hacia *S. typhi*, esto debido a que esta secuencia es específica de *S. typhi*, además, al hacer el alineamiento de las secuencias de la porina Omp C de *E. coli* y de *S. typhi* se observó que esta región no está presente en ninguna parte de la secuencia de *E. coli*, de tal modo que es específica de *S. typhi*.

El anticuerpo monoclonal L7-G8 (reactividad anti 285-303) presenta un reconocimiento hacia ambas bacterias, debido a que esta región es parcialmente compartida por *E. coli* y *S. typhi*. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal L7-F1 presenta un mayor reconocimiento hacia *E. coli*, esto debido probablemente a que estos anticuerpos reconocen solo una pequeña secuencia de aminoácidos que no se encuentran presentes en *S. typhi*, ya que esta secuencia solo es parcialmente compartida.

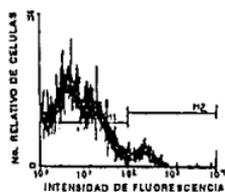
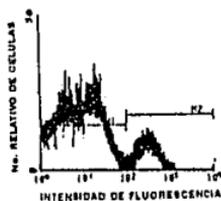
Estos resultados confirman que las regiones 246-254 y 285-303 de la porina Omp C de *S. typhi* predichas como regiones potencialmente antigénicas por programas computacionales se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y que a pesar de la complejidad celular de la membrana son reconocidas por los anticuerpos monoclonales.

E. coli**S. typhi**

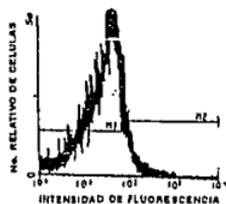
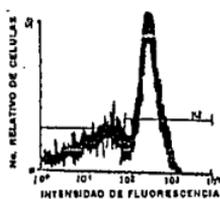
C(-)



L6/A11



L7/G8



L7/F1

Figura 15

Reconocimiento de bacterias completas por los anticuerpos monoclonales anti-asa 6 (L6-A11) y anti-asa 7 (L7-G8 y L7-F1) de la porina Omp C de *S. typhi* 9,12,VI:d.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Una vez que se analizó la secuencia de la porina Omp C de *S. typhi* mediante algoritmos de predicción de epitopos, se eligieron 10 regiones como potencialmente antigénicas. Finalmente por comparación con la porina Omp C de *E. coli* se decidió trabajar con las regiones 246-254 y 285-303 para su estudio y su evaluación inmunoquímica, por lo que se realizó una síntesis química de las mismas.

Posteriormente se realizó un mapeo de estas regiones utilizando anticuerpos policlonales obtenidos de suero de ratones inmunizados con el conjugado resina-péptido, observando que estas regiones se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria, sin embargo, debido a las reacciones cruzadas obtenidas con otras bacterias Gram negativas fué necesaria la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas regiones.

Obtuvimos 10 clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-péptido, 5 productoras de anticuerpos anti-péptido 285-303 y 5 productoras de anticuerpos anti-péptido 246-254. Tanto los anticuerpos monoclonales anti-péptido 246-254 como los anticuerpos anti-péptido 285-303 reconocen de manera específica al péptido correspondiente expresado como una proteína híbrida denominada PAP-CTB, esta misma reactividad se observó cuando los anticuerpos monoclonales anti-péptido fueron capaces de reconocer a la porina en solución, demostrando que los determinantes antigénicos reconocidos por estos anticuerpos se encuentran expuestos y son accesibles al reconocimiento por anticuerpos.

Así mismo, a pesar de la complejidad estructural de la porina y de la presencia de otras proteínas en la membrana, ambos anticuerpos anti-246-254 y 285-303 fueron capaces de reconocer a la bacteria completa.

Sin embargo, obtuvimos resultados no esperados: Debido a que la región 285-303 es parcialmente compartida por *S. typhi* y por *E. coli*, esperabamos que los anticuerpos dirigidos contra esta región reconocieran a ambas bacterias, este reconocimiento fue observado, pero se obtuvo un mayor reconocimiento hacia *E. coli*,

este reconocimiento puede deberse a 3 causas principales: la accesibilidad de los determinantes antigénicos que reconocen estos anticuerpos es mayor en *E. coli* que en *S. typhi*, la cantidad de porina Omp C en *E. coli* es mayor que en *S. typhi* o bien que durante el proceso de obtención de una clona productora haya ocurrido una mutación que resulte en una mayor afinidad hacia *E. coli*.

Por otra parte, debido a que la región 246-254 es exclusiva de *S. typhi*, esperabamos que el anticuerpo dirigido contra esta región reconociera únicamente a *S. typhi*, sin embargo, se obtuvo reconocimiento también hacia *E. coli*, esta reacción cruzada entre ambas bacterias es debida probablemente a que en la secuencia de *E. coli* hay 9 regiones que presentan una homología de al menos 3 aminoácidos con la región 246-254 (TSNGSNPST) de *S. typhi*, estas regiones se muestran en el siguiente cuadro:

REGION	SECUENCIA	AMINOACIDOS HOMOLOGOS
86-94	AENENNSWT	N,T
171-179	QGKNGNPSG	N,P,S
183-191	TSGVTNNGR	T,S,N
187-195	TNNGRDALR	T,N,G
233-241	IGNGDRAET	N,G,T
266-274	TRVGSLGWA	T,G,S
288-296	FDGRLRPSL	G,P,S
300-308	QSKGKNLGR	S,G,N
325-333	YYFNKNMST	N,S,T

De tal modo, que el reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido 246-254 hacia *E. coli* indica que alguno o algunos de estos aminoácidos son importantes para el reconocimiento de los anticuerpos hacia la porina.

IX. CONCLUSIONES

****** Las regiones 246-254 y 285-303 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, seleccionadas mediante algoritmos de predicción son epitopos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos.

****** Los anticuerpos monoclonales obtenidos reconocen determinantes antigénicos presentes en la superficie de la porina en solución así como también en la bacteria completa.

****** La reactividad de los anticuerpos monoclonales con la bacteria sugiere que la respuesta de anticuerpos podría jugar un papel importante en el control de la infección por *Salmonella typhi*.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Miura, T. y Mizushima, S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Acta.* 150:159-161.
- 2.- Schnaitman, C.A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. *J. Bacteriol.* 108:545-552.
- 3.- Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 104:882-889.
- 4.- Bragg, P.D. y Hoy, C. 1972. Organization of protein in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 274:478-488.
- 5.- Schnaitman, C.A. 1974. Outer membrane proteins of *Escherichia coli* O 111 outer membrane consist of four distinct polypeptide species. *J. Bacteriol.* 118:442-453.
- 6.- Schmitges, C.J. y Henning, U. 1976. The major proteins in the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. *Eur. J. Biochem.* 63:47-52.
- 7.- Di Rienzo, J.; Nakamura, K. e Inouye, Y. 1978. The outer membrane protein of gram-negative bacteria: Biosynthesis assembly and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 47:481-532.
- 8.- Osborn, M.J. y Wu, H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:369-422.
- 9.- Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Meth. Enzymol.* 97:85-100.
- 10.- Nikaido, H. y Vaara, M. 1987. Outer membrane. En: Neidhardt, F.C; Ingraham, J.; Low, K; Magasanik, B; Schaechter, M. y Umberger, H.E. (Eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA. págs:7-22.
- 11.- Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 415:335-337.
- 12.- Nikaido, H. 1994. Porin and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *Biol. Chemistry.* 269:3905-3908.

- 13.- Cowan, S.W. y Rosenbusch, P. 1994. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science*. 264:914-916.
- 14.- Cowan, S.W.; Schirmer, G.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Paupit, R.A.; Jansonius, J.N. y Rosenbusch, J.P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature*. 358:727-733.
- 15.- Nikaido, H. y Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
- 16.- Stock, J.B.; Ninfa, A.J. y Stock, A.M. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53:450-490.
- 17.- Wang, L.I. y Frash, C.E. 1984. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 46:408-414.
- 18.- Buchanan, T.M.; Pearce, G.K. y Arko, R.J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane proteins complex and purified pili. *J. Infect. Dis.* 136:132-137.
- 19.- Guling, P.A.; McCracken, G.H.; Frich, C.F.; Johnston, K.H. y Hansen, E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type B after systemic *Haemophilus* disease. *Infect. Immun.* 37:82-88.
- 20.- Adamus, G.; Mulczka, G.M.; Witkowska, D. y Romanowska, E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella sp.* *Infect. Immun.* 30:321-324.
- 21.- Guilleland, H.E.; Parker, M.G.; Matthews, J.W. y Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* 44:49-54.
- 22.- Kussi, N.I.; Nurmien, M.; Saxén, H. y Mäkela, P.H. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.
- 23.- Svenson, S.B.; Nurminen, B.M. y Lindberg, A.A. 1979. Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 25:863-872.
- 24.- Isibasi, A.; Ortiz, V.; Vargas, M.; Paniagua, J.; González, C.; Moreno, J. y Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane

proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.

25.- Vianney Ortiz, A. Isibasi, E. García-Ortigoza y Jesús Kumate. 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.

26.- Nikaido, M. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Meth. Enzymol.* 97:85.

27.- Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., García, J. y Kumate, J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porin Vaccine. 10:811-813.

28.- González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., García, A., Blanco, F. y Kumate, J. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 37:793-799.

29.- Blanco, F.; Isibasi, A.; Ortiz, V.; Paniagua, J.; Arreguín, C. y Kumate, J. 1990. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* 25:73-80.

30.- 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.

31.- Karplus, M. y McCammon, A. 1983. Dynamics of proteins: elements and function. *Ann. Rev. Biochem.* 53:263-300.

32.- Bairoch, A. 1990. PCGENE: The nucleic acid and protein sequence analysis software system. (TM) IntelliGenetics Inc. University of Geneva, Switzerland.

33.- Atherton, E.; Clive, D.L.J. y Sheppard, R.C. 1975. Polyamide support for polypeptide synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* 97:6584-6585.

34.- Orozco, M. 1992. Péptidos sintéticos de porinas de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. México, D.F.

35.- López-Santibañez, G.M. 1993. Caracterización inmunoquímica de dos epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. México, D.F.

36.- Paniagua, J.; Sánchez, J.; Ramírez, G.; Isibasi, A. y Kumate, J. 1992. Genetic construction of a hybrid protein containing a *Salmonella typhi* Omp C porin epitope. *Arch. Med. Res.* 23:200.

- 37.- Sánchez, J. y Hölmgren, J. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:481-485.
- 38.- Kohler, G. y Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-497.
- 39.- Kohler, G. y Milstein, C. 1976. Derivation of specific-antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6:511-579.
- 40.- Milstein, C. 1986. From antibody structure to immunological diversification of the immune response. *Science.* 231:1261-1269.
- 41.- Fazekas de st Groth, S. y Sherdegger, D. 1988. Production of monoclonal antibodies, strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 35:1-21.
- 42.- Galfre, G. y Milstein, C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth. Enzymol.* 73:3-46.
- 43.- Evans, H.J. y Vijayalaxmi. 1981. Induction of 8-azoguanine resistance and sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to mitomycin C and X rays in vitro. *Nature.* 292:601-605.
- 44.- Pontecorvo, G. 1975. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. *Somatic cell Genet.* 1:397-400.
- 45.- Galfre, G.; Howe, S.C.; Milstein, C.; Butcher, G.W. y Howard, J.C. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* 266:550-522.
- 46.- Gefter, M.L.; Marquies, D.H. y Scharff, M.D. 1977. A simple method for polyethyleneglycol promoted hibridisation of mouse myeloma cells. *Somatic cell Genet.* 3:231.
- 47.- Oi, V.T.; Jones, P.P.; Goding, J.W. y Herzenberg, L.A. 1978. Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2&Ia antigens. *Current topics. Microbiol. Immunol.* 81-115.
- 48.- Coffino, P.; Baumal, R.; Laskov, R. y Scharff, M.D. 1972. Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants. *J. Cell Physiol.* 79:429.
- 49.- Bazin, R. y Lemieux, R. 1989. Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage derived hybridoma growth factor (IL 6). *J. Immunol. Methods.* 116:245-249.

50.- Engvall, E. y Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8:871-874.

51.- Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M.P., Ramírez, G., González, C., Kumate, J. and Ortiz, V. 1994. Role of Porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. Ac. Sc. N.Y.* (en prensa).

52.-Cázaréz-Domínguez, V. 1994. Mapeo de 2 epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi*. Tesis de licenciatura. F.E.S. Zaragoza, UNAM. México, D.F.

53.- Svennerholm, A.M. y Hölmgren, J. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* 1:19-23.