



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

LAS VESICULAS DE MEMBRANA EXTERNA COMO
NUEVA TERAPIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE JUAN CAMARGO LAGOS

ASESORES: M. EN C. ENRIQUE SALAS TELLEZ

M. EN C. ALMA L. NUÑEZ DEL ARCO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Las vesículas de membrana externa como nueva terapia.

que presenta el pasante: José Juan Camargo Lagos
con número de cuenta: 09208015-1 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2003

PRESIDENTE	<u>Q.F.I: Andrea Becerril Osnaya</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B: Martha P. Campos Peón</u>	
SECRETARIO	<u>M en C: Enrique Salas Téllez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra: Susana E. Mendoza Elvira</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M en C: Cecilia Hernández Barba</u>	

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme fuerzas en los momentos difíciles que se presentan en la vida y poder lograr mi sueño y el de mis padres de terminar la carrera.

A MI MADRE

Por todos los momentos de felicidad, tristeza y angustia, y por los días de desvelo que paso desde que nací y emprendí mi camino como estudiante hasta terminar de trazar este camino. Por esto y más gracias.

A MI PADRE

Por todos los consejos y el apoyo económico que me brindaste, para que pudiera de alguna u otra forma estudiar y así ver terminado la carrera.

A MI ESPOSA

Por su apoyo, cariño y darme lo más valioso de mi vida que son mis hijos.

A MIS HIJOS

Por quitarme la tristeza, angustias y cambiarlas por momentos de felicidad y alegría, gracias por ser los tesoros de mi vida.

A MIS HERMANOS

Por compartir momentos de felicidad y tristeza que se presentan en la vida y por todo el apoyo brindado.

A MIS SOBRINOS

Por ser parte de la familia y traer alegría en todo momento.

A MARICRUZ Y ARTURO

Por ser mis amigos y compartir experiencias, problemas y alegrías, gracias por todos los consejos de apoyo que me dieron.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Enrique Salas y Alma Núñez por el apoyo, consejos y tiempo brindado durante la realización de este trabajo.

A mi cuñado José Luis por la ayuda brindada para la realización de este trabajo.

A los químicos Antonio Acosta y Ma. Luisa Lomas por permitirme trabajar con ellos y por las facilidades que recibí durante la elaboración de este trabajo.

A mis sinodales y a todas las personas que me dieron algún consejo para la terminación de este trabajo.

A la FES – Cuautitlan por el tiempo de formación que recibí.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Vesículas de membrana externa en bacterias gram negativas.....	9
OBJETIVO.....	11
GENERALIDADES.....	12
II. FORMACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
2.1 TEORIA I.....	14
2.2 TEORIA II.....	14
2.3 TEORIA III.....	15
2.4 TEORIA IV.....	15
III. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
3.1 Los nutrientes y factores que afectan el crecimiento de las vesículas de membrana externa.....	18
3.2 Nutrientes utilizados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para el crecimiento de vesícula de membrana externa.....	19
IV. METODOS DE AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
4.1 Métodos comúnmente empleados en el aislamiento de vesículas de membrana externa.....	21
V. COMPOSICIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
5.1 Las vesículas de membrana externa y su similitud con la membrana externa.....	21
5.2 Componentes de superficie celular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
VI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS VESÍCULA DE MEMBRANA EXTERNA	
6.1 Participación de las vesículas de membrana externa en el desarrollo de la enfermedad.....	25
6.2 Las vesículas de membrana externa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en cultivos de pulmones.....	27
6.3 <i>Borrelia burgdoferi</i> induce respuesta inmune por las vesículas de membrana externa.....	28
VII. ACTIVIDAD BACTERICIDA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
7.1 Importancia de la actividad bactericida de las vesículas de membrana externa.....	29
7.2 Las hidrolasas en bacterias gram negativas y gram positivas.....	30
7.3 <i>Bacteroides uniformis</i> y su producción de una sustancia bactericida.....	34

VIII. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA	
8.1 Las enzimas proteolíticas y su importancia en la patogenicidad.....	35
8.2 <i>Pseudomonas fragi</i> y su actividad proteolítica.....	35
8.3 <i>Bacteroides gingivalis</i> produce activiada proteolítica por vesículas de membrana externa.....	36
8.4 El proteoma en las vesículas de membrana externa de <i>Shewenella onoidensis</i> MR1.....	37
IX. ACTIVIDAD TOXICA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
9.1 Endotoxinas y LPS en las bacterias gram negativas.....	38
9.2 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> y su toxicidad sobre los leucocitos.....	39
9.3 <i>Escherichia coli</i> en la producción de vesículas de membrana externa y su actividad enterotoxigénica.....	39
X. PAPEL DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN EL INTERCAMBIO GENETICO.	
10.1 La importancia del material genético en las vesículas de membrana externa de bacterias gram negativas.....	42
XI. LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS.	
11.1 Desarrollo de una vacuna contra <i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B.....	43
11.2 Desarrollo de una vacuna contra <i>Helicobacter pylori</i>	44
XII. IMPORTANCIA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.	
12.1 Las vesículas de membrana externa como desarrollo de nuevas terapias en el humano.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía por microscopio electrónico de <i>Bacteroides gingivalis</i>	15
Figura 2. Modelo representativo de eventos para la formación de vesículas de membrana externa.....	16
Figura 3. Fotografía por microscopio electrónico de <i>Bacteroides gingivalis</i> W50.....	19
Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión que muestra la formación de vesículas de membrana externa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24

I. INTRODUCCIÓN

Es indudable que los microorganismos cada día resisten más a los fármacos por consiguiente la ciencia tiene que desarrollar investigaciones sobre nuevas terapias para el humano, es por esto que en el presente trabajo se realiza una recopilación sobre las vesículas de membrana externa que producen algunas bacterias gram negativas como un fenómeno natural y nos permiten conocer las diferentes teorías que existen sobre su formación, algunas de estas teorías describen el porque y como se forman las pequeñas vesículas sobre la membrana externa de las bacterias y de los elementos que forman parte de la vesícula, los nutrientes y factores que afectan su crecimiento por que dependiendo de la supresión o adición de alguno afecta la integridad de la membrana externa y con esto el aumento o disminución en la producción de vesículas, se mencionan los métodos de aislamiento comúnmente empleados en la purificación, para su aislamiento se utiliza mas el sobrenadante de los cultivos.

Las vesículas pueden contener: polipéptidos, lipopolisacaridos, enzimas, toxinas y DNA, algunos de estos componentes ayudan a la bacteria a resistir la actividad bactericida del suero y comprenderemos la similitud que existe entre la vesícula y la célula entera. Al contener componentes celulares son considerados factores de patogenicidad y son mas pequeñas que la célula entera por lo que difunden fácilmente las barreras anatómicas, tiene la habilidad de adherirse a células específicas induciendo una respuesta inmune. Se menciona cada una de las actividades que presenta la vesícula y su importancia.

Como las vesículas tienen entre sus componentes DNA entonces juegan un papel importante en la transformación de la bacteria, se mencionan estudios *in vitro* en el cual se lleva a cabo el intercambio genético.

En este trabajo se describe la importancia que tienen las vesículas en el desarrollo de nuevas vacunas o como vehículo de transporte de algunos fármacos y con esto ser una terapia contra patógenos del humano.

OBJETIVO

Recopilar información concerniente a las vesículas de membrana externa que producen las bacterias gram negativas y saber las condiciones de crecimiento, como se forman, cuales son los factores de patogenicidad, como están constituidas, su actividad biológica y como pueden ser utilizadas en el desarrollo de nuevas terapias.

GENERALIDADES

VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

Diversos estudios indican que las bacterias gram negativas como, *Escherichia coli* (ETEC) y *Pseudomonas aeruginosa* produce pequeñas vesículas de membrana externa las cuales son liberadas como pequeñas bombas a tejidos específicos, contienen sustancias de la membrana externa y proteínas solubles del periplasma y lípidos. Los tejidos son infectados por vesículas que se desarrollan a partir del patógeno. Estos se encuentran cerradas y están en contacto con las células epiteliales. La habilidad de la bacteria patógena consiste en distribuir un arsenal de factores de virulencia a la célula específica por medio de restos de vesículas relativamente inexplorados.

Las vesículas, son pequeñas esferas cerradas que derivan de la membrana externa por fragmentación seguida de cierre, probablemente son el resultado de la expulsión de la membrana celular. La producción de vesículas de membrana externa por las bacterias gram negativas es un fenómeno natural y común. Estas son formadas tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha informado que diferentes géneros de bacterias gram negativas las producen durante el crecimiento normal, durante su formación atrapan varios componentes del periplasma celular. Pueden contener lipopolisacárido, proteínas periplásmicas, proteínas de membrana externa, fosfolípidos, varias toxinas asociadas, enzimas, fosfolípidos, DNA, factores de virulencia. (Kadurugamuwa y cols; 1995) (Kadurugamuwa y cols; 1996) (Li y cols; 1998) (Zhou y cols; 1998)

Estas estructuras, tienen un tamaño de 20 a 500 nm, pueden permanecer unidas a la membrana celular o pueden soltarse de la misma. Se les conoce como: vesículas alternativas, microvesículas (MVs), vesículas, vesículas de la membrana, o vesículas extracelulares, se ha estudiado extensamente su química, propiedades biológicas, y su morfología por microscopía electrónica. Se han encontrado en diferentes géneros, como *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria*, y *Brucella*. Recientemente, los estudios por microscopía electrónica han mostrado que las vesículas pueden liberarse de las bacterias al ambiente. Esto se ha informado en varios géneros incluso *Bacteroides*, *Capnocytophaga*, *Actinobacillus* y *Cytophaga*.

Se ha observado genética y bioquímica las funciones características de las bacterias que producen vesículas, proteínas específicas y moléculas que gobiernan la internalización de las vesículas dentro de células específicas. Estos estudios ayudaran a tener nuevas ideas para encontrar vesículas de membrana externa de bacterias gram negativas. (Magrand y cols; 1989) (Kadurugamuwa y cols; 1996) (Li y col; 1998) (Kadurugamuwa y cols; 1995)

II. FORMACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA

Existen varias teorías por las cuales las vesículas de membrana externa de bacterias gram negativas pueden formarse:

TEORIA I

Mutantes con defectos en la lipoproteína y la mureína.

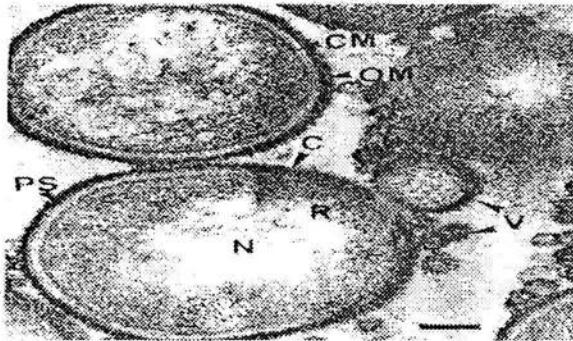
El mecanismo por el cual las vesículas se forman no se ha establecido claramente. Se mostró que las mutantes con defectos en la lipoproteína y mureína exhiben invaginación, deformando la membrana externa durante la división celular, produciendo vesículas grandes. (Mayrand y cols0; 1989)

TEORIA II

El desarrollo de la membrana externa.

El fenómeno de formación de la vesícula puede ser también, el resultado de que la membrana externa crece más rápidamente que la capa de peptidoglucano. En la Figura (1) se observa como la membrana externa (OM) de *Bacteroides gingivalis*, es cubierta por una cápsula (C) que encierra el periplasma (PS) con el ribosoma (R) y el núcleo (N). También muestra a las vesículas de membrana externa las cuales son cubiertas por una doble membrana y material capsular.

El exceso del material de la membrana externa (respecto a la capa de peptidoglucano) dá lugar a una protuberancia pequeña en la membrana externa, si esta protuberancia continúa creciendo dá lugar a una vesícula atada por sólo una cuerda de membrana externa. Esto apoya el mecanismo para la formación de vesícula de membrana externa.(Mayrand y cols; 1989)



Fig(1): Fotografía por microscopio electrónico de *Bacteroides gingivalis* que muestra como la membrana externa (OM) es cubierta por una cápsula (C) y encierra el periplasma (PS) con el ribosoma (R) y el núcleo (N). Las vesículas (V) son cubiertas por una doble membrana y parece ser cubierta por material capsular.

TEORIA III

La síntesis del peptidoglucano.

Se propone que el origen de vesículas en la membrana extracelular de bacterias gram negativas es el resultado de la síntesis de peptidoglucano que causa una abultación en la membrana externa, la membrana se pandea y finalmente forma la vesícula. (Kadurugamuwa y cols; 1995) (Li y col; 1998)

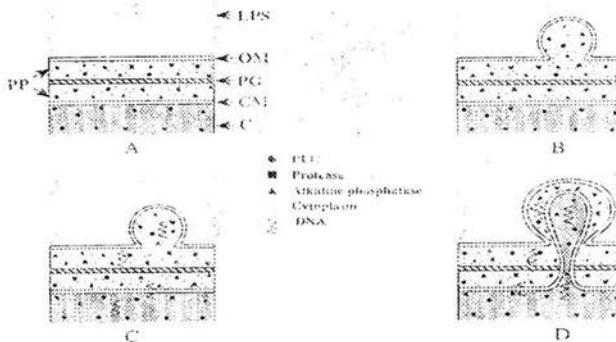
TEORIA IV

Participación de antibióticos en la formación de las vesículas.

El movimiento mecánico provoca que las vesículas sean soltadas al medio de cultivo, es conocido que las perturbaciones en el crecimiento o en la integridad de la membrana externa refuerza su formación. Por ejemplo, antibióticos o inanición para los aminoácidos puede estimular la formación de vesículas. Aparece por

consiguiente un desequilibrio en la transición y crecimiento aumentando la producción de vesículas.(Kadurugamuwa y cols; 1995)

Como se mencionó la cantidad de vesículas producidas se puede inducir por diferentes antibióticos, como por ejemplo, la gentamicina estimula la producción de vesículas de membrana externa en *Pseudomonas aeruginosa*, esta bacteria produce vesículas de membrana externa, naturalmente, pero al agregar al medio gentamicina se observa una alta producción de vesículas de membrana externa, las cuales son más grandes, se sugiere que en la formación de vesículas naturales e inducidas con gentamicina se forman de la siguiente manera:



Fig(2): Modelo representativo de eventos para la formación de vesículas de membrana externa naturales y de vesículas de membrana externa estimuladas con la adición de gentamicina. Membrana celular(OM), peptidoglucano (PG), membrana citoplasmática (CM), citoplasma (C).

En la Figura (2) Se observa un modelo que representa eventos en la formación de MVs en *Pseudomonas aeruginosa*, A) Indica la membrana antes de que la vesiculación comience, B) Se observa el tipo más simple de la formación de vesículas de membrana externa naturales más frecuente. Esta vesículas de

membrana externa es comparativamente más pequeña, involucra sólo la exfoliación de la membrana externa, y atrapa sólo periplasma, C) es una extrapolación de la B) en esta se ilustra el atrapamiento de ADN que ha emigrado del citoplasma al periplasma y es otra posibilidad para las vesículas de membrana externa naturales, D) Se observa la producción de vesículas de membrana externa más complicado, desde que contiene la membrana interna y externa así como algunos constituyentes del citoplasma. Se han descubierto autolisinas en vesículas de membrana externa (naturales) y vesículas de membrana externa (estimuladas con gentamicina) y se cree que la atadura íntima normal entre la membrana externa y peptidoglucano dentro de la membrana celular requiera una hidrólisis de la capa de peptidoglucano inmediatamente debajo de la vesículas de membrana externa durante la vesiculación. Esta brecha en el peptidoglucano durante el desarrollo de la vesículas de membrana externa naturales se localiza y se cierra, para que la lisis celular no suceda. La gentamicina aumenta la incidencia y el tamaño de vesículas de membrana externa, aumentando la actividad autolítica y contribuiría a la muerte celular. Como un perturbante de la membrana, la gentamicina anima la formación de vesículas de membrana externa en la membrana celular.

La encuadernación de policationes como el aminoglicósido puede reestructurar el LPS condensándolo y puede desestabilizar la membrana externa, estas regiones de la membrana externa tendrían al reconfigurarse sus macromoléculas, mientras se produce la vesiculación. Desde que el Mg^{+2} se libera de la membrana externa durante las fases iniciales de tratamiento con gentamicina, una zona libre de cationes podría ponerse disponible para activar las autolisinas que puede responder directamente a la hidrólisis, aumentando el peptidoglucano debajo de las

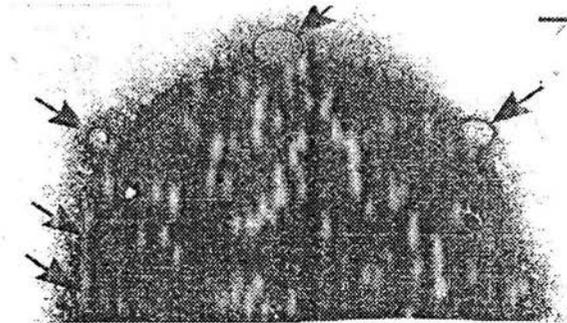
g-MVs. Así alternativamente, la perturbación de la membrana externa puede reestructurar el peptidoglucano y a su vez activar las autolisinas. Por lo tanto, la gentamicina desestabiliza la membrana externa, para que el periplasma y citoplasma puedan entrar en el vesículas de membrana externa.(Keywords; 2000) (Li y cols; 1998) (Kadurugamuwa y cols;1998)

III. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Los nutrientes y factores que afectan el crecimiento de vesículas de membrana externa.

Las vesículas de membrana externa se pueden formar o no dependiendo de los nutrientes que contenga el medio (perturbaciones en la supresión o adición de algún nutriente);y también, su proliferación es afectada por la presencia de factores o sustancias que afectan la integridad de la membrana externa reforzando su formación. Parece ser crítico obtener la "expresión" de vesículas. Se mostró que un cultivo de *Escherichia coli* limitado de lisina, excreta cantidades grandes de ácido diaminopimélico y lipopolisacárido. También se ha encontrado que las células exhiben un gran número de vesículas y que la cantidad de material extracelular aumenta con la edad del medio de cultivo. Se observó que células crecidas en un medio rico en lisina no presentaban tal estructura durante el ciclo de crecimiento.

En la Figura (3) se observa que en la membrana externa de *Bacteroides gingivalis* W50 crecido bajo limitaciones de hemina poseía numerosas y grandes vesículas extracelulares y pocas fimbrias.



Fig(3): Transmisión por microscopía electrónica que muestra la formación de vesículas de membrana externa en la superficie de *Bacteroides gingivalis* W50

Por otro lado se conoce que cuando *Pseudomonas fragi* coloniza el tejido del músculo, las vesículas aparecen en la superficie de *Pseudomonas fragi* y en el tejido que rodea la célula, sin embargo; las células no producen las vesículas extracelulares cuando se hace crecer sin los sustratos del tejido o en medios simples desprovisto de aminoácidos o proteínas. (Mayrand y cols; 1989)

Nutrientes utilizados por *Pseudomonas aeruginosa* para el crecimiento de vesículas de membrana externa.

Pseudomonas aeruginosa forma vesículas de membrana externa en el medio de cultivo durante el crecimiento normal. La liberación de estas vesículas aumenta tres veces aproximadamente después de la exposición del organismo a cuatro veces el

MIC de gentamicina. Vesículas naturales y vesículas de membrana inducidas con gentamicina (n-MVs y g-MVs, respectivamente).

La microscopia electrónica de n-MVs y g-MVs reveló que las vesículas de membrana externa eran bicapas esféricas. Los diámetros de las vesículas no tratadas y las células tratadas con gentamicina variaron entre 50 y 150 nm; sin embargo, cuando se promediaron medidas de g-MVs, se encontró que g-MVs son ligeramente más grandes que las n-MVs, con un diámetro de 100 nm y opuesto a 80 nm para n-MVs, se demostró que las vesículas tienen una estructura de bicapa. Ningún material externo se vio por cualquier técnica de microscopia electrónica de transmisión, sugiriendo por eso que las vesículas aisladas eran libres de detritus celulares.

El aumento de 3 veces la masa de la vesícula de bacterias expuestas a gentamicina, comparado con las células no tratadas, indicó que el antibiótico causa la liberación de más vesículas, probablemente debido a una interacción iónica entre el antibiótico y la superficie celular, provocando la desestabilización de la membrana externa. El análisis de vesículas por microscopia Inmuno-electrónica e inmunoblot demostró la presencia de una banda B de lipopolisacárido (LPS), con una proporción ligeramente más alta de banda B de LPS en las g-MVs que en las n-MVs. Una banda A de LPS se presentó algunas veces en g- MVs pero no en la n-MVs. El descargo natural de MVs aumentó por exposición del organismo al antibiótico gentamicina por perturbación de su membrana. (Li y col; 1996) (Kadurugamuwa y cols; 1996) (Keyword; 2000)

IV. METODOS DE AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Métodos comúnmente empleados en el aislamiento de vesículas de membrana externa.

Se han usado varios métodos diferentes para el aislamiento de vesículas del sobrenadante de cultivo. Los procedimientos más comunes incluyen la precipitación con sulfato de amonio, centrifugación en gradientes de sacarosa, ultracentrifugación y ultrafiltración. (Mayrand y cols; 1989) (Kadurugamuwa y cols; 1998) (Kadurugamuwa y cols; 1995) (Dorward y cols; 1989) (Reyes; 2002)

V. COMPOSICIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Las vesículas de membrana externa y su similitud con la membrana externa.

Las vesículas extracelulares son parte de la membrana externa de las células bacterianas que se dividen generando por lo tanto estructuras idénticas a la composición bacteriana. Se encontró que las vesículas recuperadas por ultracentrifugación de varias especies de *Bacteroides* eran idénticas a los modelos de membrana externa.

Se ha encontrado que las vesículas pueden contener polipéptidos que pueden ser obtenidos como sigue:

*Algunas proteínas que son parte de las células se concentran en el proceso de formación de vesícula.

*Algunas proteínas que están en el interior de la célula pueden ser envueltas, cuando brota la vesícula.

*Algunas proteínas son el resultado de la acción de las proteasas en las moléculas de la superficie de las vesículas. (Mayrand y cols; 1989) (Dorward y cols; 1989)

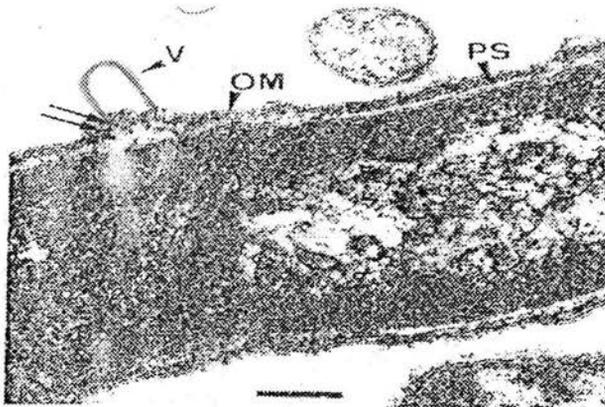
Componentes de superficie celular en *Pseudomonas aeruginosa*.

Muchos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* se localizan en la superficie celular, como el lipopolisacárido (LPS), y otros productos extracelulares, como proteasa alcalina, elastasa, exotóxina, DNAsa, hemolisinas, fosfatasa alcalina y fosfolipasa C (PLC). Están en los 2 tipos de vesículas, las naturales y las inducidas con gentamicina.

Varios estudios han demostrado la secreción de estos productos al ambiente externo durante el crecimiento del patógeno. Los investigadores han procurado entender el mecanismo de translocación de proteínas, en las bacterias. Sin embargo, los eventos precisos que llevan a la liberación real de proteínas de la superficie bacteriana al ambiente externo no se han reconocido ni entendido totalmente. Varios modos distintos de secreción de proteínas existen, y en *Pseudomonas aeruginosa* por lo menos se han identificado dos vías de secreción diferentes, la proteasa alcalina, un producto del gen apr.

La mayoría de las exoproteínas en *Pseudomonas* spp, se cree que son secretadas vía un mecanismo de 2 pasos. Primero, las proteínas pasan por la membrana interna como péptido señal vía dependiente. La translocación subsecuente por la membrana externa se media por las proteínas auxiliares específicas, la fuente de energía para el traslado de las exoproteínas por la membrana exterior no se define todavía claramente, a pesar de la evidencia de que una pendiente del protón se requiere para la secreción de proteínas en *Pseudomonas aeruginosa*. En la Figura (4) Se observa la formación de vesículas (V) de *Pseudomonas aeruginosa*, pero también se observa lo que es la membrana externa (OM) y el periplasma (PS). Una vez que las exoproteínas son translocadas por la membrana periplasmática, algún plegado de las proteínas debe ocurrir, completa su vinculación intramolecular. Incluso las estructuras terciarias y cuaternarias pueden resultar antes de la translocación de las proteínas por la membrana externa.

Las estructuras ordenadas pueden ser toleradas por la proteína de la membrana externa (OM). Las exoproteínas antes de dirigirse al periplasma tienen que desplegarse antes del transporte hacia la membrana. Es también posible que algunas exoproteínas no se desplieguen y se suelten como paquetes en las vesículas de membrana externa. (Kadurugamuwa y cols; 1998) (Hancock y cols; 1979) (Kadurugamuwa y cols; 1996)



Fig(4): Fotografía por microscopio electrónico de *Pseudomonas aeruginosa*. Muestra una porción delgada que es la formación de una vesícula (V), también muestra lo que es la membrana externa (OM) y el espacio que ocupa el periplasma (PS).

La actividad de la fosfatasa alcalina también se descubrió en ambas preparaciones de vesículas de membrana externa. La actividad total en el sobrenadante estaba reducido por aproximadamente 50% después de la centrifugación de vesículas de membrana externa del sobrenadante de cultivo, indicando una asociación de la enzima con las vesículas. Aunque la mayoría de PLC y fosfatasa alcalina se encontró dentro de las vesículas, también se descubrieron ambas actividades de la enzima en los extractos celulares después de que se trataron las células intactas con tolueno, mientras se indica que enzimas maduras son acumuladas dentro de la célula antes de su descargo en el medio extracelular.

El examen de ambos tipos de vesículas de membrana externa para la actividad de proteasas demostró la asociación de enzima activa. En la centrifugación las células soltaron vesículas al sobrenadante de cultivo, la actividad de proteasa total

se dejó caer en un 16% en los sobrenadantes no tratados y 25% en los sobrenadantes tratados con gentamicina. Desde una cantidad apreciable de actividad también podría descubrirse células que sueltan vesículas al medio en los sobrenadantes centrifugados, la enzima probablemente se suelta de las células en ambos soluble y formularios asociados a vesículas.

En contraste, la actividad elastolítica se descubrió exclusivamente en los sobrenadantes y no era afectada la liberación de vesículas por las células al sobrenadante por la centrifugación. Los estudios anteriores han demostrado que la enzima se secreta como una proenzima que sólo se pone activa cuando se suelta al sobrenadante. Por esta razón, aun cuando la proenzima está presente en vesículas de membrana externa, no sería perceptible por su actividad de enzima. La cuantificación fluorométrica de ADN en vesículas de membrana externa determinó que el ADN se empaqueta dentro de las vesículas, encontrándose más ADN en g-MVs que en n-MVs. (Keywords; 2000)

VI: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Participación de las vesículas de membrana externa en el desarrollo de la enfermedad.

Para producir la enfermedad, los microorganismos deben resistirse al sistema de defensa del organismo así como el acceso al órgano, colonización, y daño de los tejidos. La especie del microorganismo es crucial para producir la enfermedad

ya que para su patogenicidad, contienen en su superficie varios factores de virulencia. La liberación de componentes de la pared celular bacteriana, como las vesículas, podría contribuir entonces al proceso de patogenicidad.

Desde que las vesículas de la membrana externa atrapan componentes celulares, ellos tienen que ser considerados como un factor de virulencia importante. Comparado con la célula bacteriana entera, sustancias que son biológicamente activas son concentradas en el interior y la superficie de las vesículas podrían alcanzar las áreas inaccesibles más fácilmente o podrían difundir a través de las barreras anatómicas.

Muchos componentes bacterianos contribuyen a la patogenicidad en infecciones por bacterias. Como se ha mencionado las vesículas pueden contener ADN. Así estas vesículas podrían jugar un papel importante en la transformación genética, sirviendo como un vehículo de transporte para ADN y factores de virulencia. (Dorward y cols; 1989)

Los efectos adversos en pacientes que se encuentran en terapia al utilizar antibióticos, tiene como resultado la liberación de componentes bacterianos lo cual es de gran preocupación. Varios antibióticos diferentes pueden afectar la superficie bacteriana, sobre todo liberando endotoxinas de las bacterias gram negativas y componentes de la pared celular de bacterias gram positivas. Estos componentes parecen ser un inductor poderoso de la inflamación durante la infección, por ejemplo, la meningitis bacteriana.

Las vesículas de membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* en cultivo de pulmones.

El descargo de vesículas de membrana externa por *Pseudomonas aeruginosa* es normal durante su crecimiento, es posible que sus vesículas puedan funcionar como un mecanismo por el que *Pseudomonas aeruginosa* secreta sus productos naturales, como factores asociados a virulencia al ambiente externo. Durante la infección, estas vesículas de membrana externa podrían concentrar estos factores y podrían llevarlos al tejido que será infectado, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista en pacientes inmunosuprimidos, particularmente en los que presentan fibrosis cística (FC) asociada a la enfermedad, la habilidad del patógeno en distribuir un arsenal de factores de virulencia a muchas células por medio de las vesículas. (Keywords; 2000)

Pseudomonas aeruginosa produce vesículas de membrana externa en los pulmones del paciente con cistitis fibrosa, estas vesículas se adhieren mejor en el pulmón que en las células epiteliales del intestino. Esto nos indica la habilidad que tienen las vesículas de adherirse a células específicas.

***Borrelia burgdorferi* induce respuesta inmune por las vesículas de membrana externa.**

Borrelia burgdorferi forma también vesículas de membrana, que desarrollan una respuesta inmune induciendo una hiperactividad de células B, esto debido a que las vesículas contienen LPS, demostrándose una respuesta inmune humoral específica dirigida hacia vesículas de membrana extracelular.

Los linfocitos B producen, como célula plasmática anticuerpos IgM dirigidos contra las vesículas pero no producen IgG e IgA, por otra parte las vesículas también inducen la producción de macrófagos, IL1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), estos dos últimos factores median la inflamación, y podrían contribuir a los síntomas de la enfermedad de Lyme, las vesículas se ven involucradas en una alta producción de células B, así mismo, se forma un complejo multiproteico entre las vesículas y anticuerpos, que estimula una protección autoreactiva y respuesta inmune específica de células B contra las vesículas.

Se conoce bien que el efecto bactericida del suero humano es de suma importancia en la defensa del organismo contra las infecciones bacterianas. La exposición del organismo a muchas especies de bacterias gram negativas hace que el suero diluya estas células bacterianas. La resistencia al suero humano puede ser conferida por los componentes de superficie celular como el lipopolisacárido, los polisacáridos capsulares, cromosomas y plasmidos que determinan las proteínas de la membrana externa. (Kaduruga muwa y cols; 1996)

VII. ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Importancia de la actividad bactericida de las vesículas de membrana externa

Las vesículas inhiben la actividad bactericida del suero, cuando se usa una concentración de 0.3 mg/ml de vesículas, hirviendo estas vesículas se previene esta inhibición, sin embargo una concentración alta de vesículas hervidas, estas inhiben la actividad bactericida del suero, por lo tanto las vesículas contienen factores lábiles al calor y componentes estables al calor.

Las vesículas de *Pseudomonas gingivalis* producen una tilo-proteasa que es activa contra algunos componentes del suero, como factores del complemento, inmunoglobulinas, inhibidores de proteasas y proteínas de transporte, cuando estas vesículas se combinan con un bloqueador de thiol, el suero vuelve a tener su actividad bactericida, por otra parte al poner en contacto directamente LPS con suero, también inhibe su actividad bactericida, es posible que las vesículas de membrana externa protejan a la bacteria para que produzca la enfermedad y la actividad del complemento, mientras se favorece la patogenicidad, logrando producir la enfermedad. (Allen y col 1996) (kadurugamuwa y cols; 1998)

Las vesículas extracelulares parecen tener la misma actividad biológica que una célula completa y una composición similar, se demostró que tanto los factores lábiles y estables al calor son capaces de inhibir la acción letal del suero. Las vesículas podrían ligar (vía LPS) a las bacterias, permitiendo la protección de

bacterias contra la acción letal de suero. Sin embargo, uno no debe excluir la posibilidad de que algunos otros componentes resistentes al calor (como los polisacáridos capsulares) de vesículas pueden ser involucrados en el efecto proteccionista.

Se ha mostrado que lipopolisacáridos y enzimas proteolíticas se encuentra en vesículas de membrana externa de *Pseudomonas gingivalis* y que puede mediar la habilidad de estas estructuras para suprimir la actividad bactericida de suero humano. Estas observaciones indican un factor de virulencia adicional asociado con *Pseudomonas gingivalis*; las vesículas.(Grenier y cols; 1991) (Hancock y cols; 1979)

Las hidrolasas en bacterias gram negativas y gram positivas.

Bacterias gram positivas y gram negativas poseen varios tipos de hidrolasas de mureina endógenas que se pegan covalentemente al peptidoglucano de la pared celular. La mayoría de estas enzimas son autolisinas, estas actúan sobre el peptidoglucano hidrolizándolo, el resultado de esta hidrólisis es la avería de la integridad celular, las autolisinas se definen como un grupo de enzimas capaces de hidrolizar peptidoglucano, pueden encontrarse ligadas a el citoplasma, membrana citoplasmática, periplasma y peptidoglucano. Existen varios tipos de autolisinas las β -N-acetilmuramidasa (lisozimas), β -N- acetilglucosaminidasas, N-acetilmuramoiil-L-alanina y peptidasas.(Kadurugamuwa y cols; 1996) (Zhou y cols; 1998)

Las autolisinas deben jugar, papeles fisiológicos importantes en las bacterias como en el crecimiento y división celular, ya que a menudo se expresan en bacterias que crecen rápidamente, se ha propuesto que estas enzimas participan en la formación de la estructura flagelar, en la producción de la pared celular, formación de septos y hendiduras, por lo tanto estas autolisinas son importantes en el crecimiento y desarrollo celular de las bacterias. Además de estas funciones, existen también evidencias de que estas participan en la formación de esporas y gemación, estas enzimas también funcionan como moléculas importantes que determinan crecimiento o lisis celular. (Li y cols; 1996)

Las vesículas de membrana externa producidas naturalmente, por bacterias gram negativas como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, y *Shigella*, lisan muchas bacterias gram positivas, incluso *Mycobacterium* y cultivos de bacterias gram negativas, se sugiere que las vesículas de membrana externa contienen hidrolasas (conocidas como autolisinas de peptidoglucano). (Mayer y cols; 2000) (Peeters y cols; 1999)

La microscopia electrónica reveló que las membranas de las bacterias fueron digeridas, las bacterias sensibles a vesículas de membrana externa tienen quimiotipos de peptidoglucano A1 α , A4 α , A1 γ , A2 α , y A4 γ , mientras que las bacterias que no son afectadas por la lisis de vesículas contienen quimiotipos A3 α , A3 β , A3 γ , A4 β , B1 α , y B1 β . La *Pseudomonas aeruginosa* PAOI sus vesículas tienen la mayor actividad lítica. (Li y cols; 1996) (Kadurugamuwa y cols; 1996) (Zhou y cols; 1998)

Para las bacterias gram positivas, las vesículas de membrana externa se atan a la superficie de la pared celular donde ellas rompen abiertamente, mientras liberan hidrolasas para peptidoglucano digiriendo el peptidoglucano subyacente de la pared; la lisis sucede en el sitio de la digestión. Las vesículas de membrana externa lisan bacterias gram negativas por un mecanismo diferente.

Las vesículas de membrana externa funden la membrana externa de la bacteria y así, introduce hidrolasas de peptidoglucano en el periplasma luminal. Una vez en el periplasma, la hidrolasa difunde alrededor del saco de ácido murámico y puede digerir en varios sitios diferentes, causando lisis en estos sitios. Vesículas de membrana externa también pueden adherirse a las capas S de las bacterias gram positivas donde hidroliza el peptidoglucano y también puede emigrar a través de las capas S atacando la pared subyacente, las capas S están compuestas de proteínas y glucoproteínas que son incapaces de inhibir la lisis producida por vesículas de membrana externa. (Li y cols; 1996) (Kadurugamuwa y cols; 1996)

Las bacterias gram positivas tratan de defenderse de esta lisis por vesículas de membrana externa posiblemente construyendo una capa proteccionista adicional sobre sus paredes celulares. Para que estas mismas bacterias ganen nutrientes, estructuras como las cápsulas, la capa tendría que ser una matriz rígida con un tamaño de poro muy pequeño en donde no penetrarán las hidrolasas; sin embargo, no todas las bacterias tienen cápsula y aunque la tuvieran el tamaño del poro no es tan pequeño para impedir la penetración de las hidrolasas. (Li y cols; 1996) (Zhou y cols; 1998)

Las vesículas de membrana externa matan bacterias, la microscopia electrónica reveló las zonas de lisis de bacterias, apoyando que las vesículas habían matado a las bacterias, para que esta lisis pueda ocurrir las bacterias deben de contener peptidoglucano químicamente diferente ya que bacterias con un peptidoglucano químicamente similar no hay digestión de pared celular y por lo tanto no existe lisis. El efecto lítico de las vesículas de membrana externa no solo era en LPS si no también digería especies que contienen paredes celulares formadas con ácido micólico, lipoarabinomanana, y arabinogalactan.

Es posible que otras enzimas hidrolíticas se encuentren en vesículas de membrana externa para realizar la lisis de bacterias. Por ejemplo, proteasas, lipasas, o fosfolipasa C podrían afectar directamente la membrana plasmática de bacterias susceptibles o podrían digerir los polímeros secundarios esenciales en la pared celular.

Por otra parte la inducción de vesículas con gentamicina en *Pseudomonas aeruginosa*, muestra que las g-MVs tienen una mayor actividad hidrolítica, que las n-MVs; las g-MVs, además de la lisis por hidrolasas, también depositan pequeñas cantidades de gentamicina en el interior de la célula, matando por sinergismo. (Li y cols; 1996) (Kadurugamuwa y cols; 1996)

Es probable que las vesículas de membrana externa sean estructuras que las bacterias gram negativa usan para su sobrevivencia, para concentrar sus componentes periplásmicos y que estos puedan ser enviados al ambiente para

realizar funciones particulares. Ciertamente, las bacterias secretan un número de enzimas extracelulares solubles por diferentes rutas de secreción, pero la difusión debe diluir las concentraciones de la enzima rápidamente. Las vesículas de membrana externa permiten que estas enzimas se concentren y permanezcan hasta que encuentren un sustrato en particular. Es probable que las hidrolasas peptidoglucano tengan el propósito de lisar células vecinas para aumentar los nutrientes de la célula productora de vesículas, esto dá una gran ventaja a las bacterias gram negativas por encima de las bacterias que no pueden producir vesículas de membrana externa.(Li y cols; 1996) (Keywords; 2000)

***Bacteroides uniformis* y su producción de una sustancia bactericida.**

Bacteroides uniformis se conoce que produce una sustancia bactericida activa contra especies que pertenecen al grupo de *Bacteroides*. Se cree que esta sustancia bactericida permite que *Bacteroides uniformis* destruya flora normal para permanecer en su nicho ecológico. Los informes más recientes indican que este bactericida se suelta al medio de cultivo y tiene un peso molecular menor a 3 kDa. Recientemente se mostró, que esos fragmentos bactericidas, eran liberados por vesículas de membrana. Por lo tanto puede usarse la urea como un agente para disociar proteínas e hidrocloretrato de guanidina para soltar la sustancia inhibitoria de la superficie de las vesículas.(Mayrand y cols; 1989)

VIII. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Las enzimas proteolíticas y su importancia en la patogenicidad.

La asociación de enzimas proteolíticas con la superficie celular bacteriana podría ser potencialmente importante en la nutrición bacteriana así como en el proceso de patogenicidad, enzimas degradativas localizadas en la superficie de las vesículas facilitan la digestión por ruptura de moléculas complejas en fragmentos pequeños para la nutrición de la bacteria. Estos productos están entonces inmediatamente disponibles para las proteínas obligatorias o las porinas presentes en la membrana externa de las células. Las mismas enzimas proteolíticas también podrían afectar las barreras anatómicas y así podrían permitir la penetración subsecuente de bacterias y sus productos tóxicos en los tejidos. Además, una perturbación en el sistema inmune humoral podría ocurrir por degradación de inmunoglobulinas o proteínas del complemento. (Mayrand y cols; 1996)

***Pseudomonas fragi* y su actividad proteolítica.**

Pseudomonas fragi, una bacteria presente en la carne y producto lácteos, produce actividades proteolíticas extracelulares, así como las vesículas cuando crece en el substrato de tejido de carne. Recientemente se aisló una proteasa del sobrenadante del medio de cultivo de esta especie bacteriana. Usando los procedimientos de inmuno-peroxidasa, se mostró que la enzima esta presente en la superficie y dentro de las vesículas que se unieron externamente a la pared celular o que se presentan como estructuras globulares libres en el medio. Se sugiere que

las vesículas puedan funcionar como un mecanismo para concentrar y secretar las enzimas proteolíticas y de proteínas hidrolasas y así mantiene una fuente de péptidos pequeños o aminoácidos para que sean utilizados por el metabolismo celular. (Mayrand y cols; 1996)

***Bacteroides gingivalis* produce actividad proteolítica por vesículas de membrana externa.**

Se mostró que *Bacteroides gingivalis* producen vesículas que son favorablemente proteolíticas. La actividad proteolítica de las vesículas fue similar a las células bacterianas enteras. El sustrato no específico Azocoll y caseína así como la colágena ácida soluble y el benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida que son sustratos de tripsina like, se degradaron. La actividad de tripsina like era investigada, usando los medios de cultivo viejos, ellos encontraron que el 80% de la actividad recuperable total estaba asociado con un fragmento de partículas que contiene vesículas, considerando que la actividad restante estaba soluble en el fragmento de sobrenadante. Fue postulado que la enzima tripsina like de *Bacteroides gingivalis* se suelta como una proteína soluble, pero también es asociada con las vesículas extracelulares. Además de la actividad contra arginina, las vesículas de *Bacteroides gingivalis* pueden degradar también el glicil-L-prolina—pNA así como la albúmina del suero bovino, fibronectina, transferrina, α -antitripsina, IgA e IgG. (Mayrand y cols; 1989) (Dorward y cols; 1989)

Bacteroides gingivalis W50, produce la enzima tripsina like, esta es liberada como una proteína soluble, también es asociada con vesículas de membrana

externa, en las que puede existir como un componente soluble y también como un complejo proteico. La importancia de esta enzima en la enfermedad que produce, es que produce una pigmentación negra en los dientes y aumenta el potencial de este organismo para mediar la destrucción de los tejidos periodontales, el descargo de enzima proteolítica que contienen las vesículas puede permitir a este organismo obtener aminoácidos. El descargo de tal enzima proteolítica no puede ser de hecho exclusivo para *Bacteroides gingivalis*. (By y cols; 1987) (Smalley y cols; 1989) (Patrick y cols; 1996)

El proteoma en las vesículas de membrana externa de *Shewanella oneidensis* MR-1.

Se analiza todo el proteoma de las vesículas de la membrana de *Shewanella oneidensis* MR-1. Se ha identificado la completa asociación de proteínas con las vesículas de membrana externa de las bacterias usando una nueva técnica de alta resolución en la separación y gran precisión en masa y sensibilidad en transformar un ión ciclotrón resonante por espectrofotometría de masas, las vesículas de membrana externa son únicas en bacterias gram negativas y constantemente las ponen en libertad de la superficie de las células durante el crecimiento de la bacteria, parecen adornos de algunos subalternos del citoplasma que contienen varias enzimas. Las vesículas de membrana externa son como enzimas que protegen a la bacteria y son secretadas por vía extracelular al liberar estas enzimas dentro de otras bacterias para matarlas y además lisan a las células endocrinas.

Para identificar completamente las proteínas de las vesículas de la membrana externa se puede predecir por el medio ambiente en el que ellas están. Los resultados del análisis del proteoma sugiere que las vesículas de membrana externa de *Shewenella oneidensis* MR-1 se liberan de ella, conteniendo enzimas responsables para reducir radionucleotidos. (Lipton y cols; 2000)

IX. ACTIVIDAD TOXICA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Endotoxinas y LPS en las bacterias gram negativas.

Endotóxicas y LPS fueron los primeros compuestos conocidos y localizados en la superficie celular de bacterias gram negativas. La composición química típica de LPS incluye un polisacárido en la cadena lateral (antígeno O) y un lípido hidrófobo covalentemente unido por un polisacárido central que contiene quetodeoxioctonato y heptosa. La mitad de la molécula del lípido hidrófobo es responsable de la actividad endotóxica. El término endotóxina libre se usa para material tóxico encontrado en el ambiente externo. Se ha repasado la evidencia para el descargo de tal endotóxina libre y ha indicado que no requiere de lisis celular sino, más bien, que es el resultado de la vesiculación de la membrana externa durante el crecimiento normal. Esta observación se informó primero durante en el crecimiento *in vitro* de *Neisseria meningitidis* y como consecuencia, se encontró en otras especies bacterianas gram negativas se comparó LPS puro celular y LPS asociado a vesículas de los miembros de la familia *Neisseriaceae* y mostró que existía una similitud alta entre las dos preparaciones con respecto a la ausencia de antígeno O

y la composición química del lípido hidrófobo.(Mayrand y cols; 1989) (Fischer y cols; 1999)

***Actinobacillus actinomycetemcomitans* y su toxicidad sobre los leucocitos.**

Actinobacillus actinomycetemcomitans puede dividirse en dos grupos según su toxicidad hacia los leucocitos. Se observó esa leucotóxicidad se produce por las numerosas vesículas de membrana extracelular. Una prueba más directa de que las vesículas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* son leucotóxicas es midiendo la deshidrogenasa láctica soltada por las células polimorfonucleares humanas incubadas en la presencia de vesículas o los extractos sónicos de las vesículas, los estudios de la ultraestructura de los leucocitos revelaron la desorganización celular y destrucción de membrana, cuando fueron expuestos a las vesículas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. (Mayrand y cols; 1989)

Escherichia coli en la producción de vesículas de membrana externa y su actividad enterotoxigenica.

Estudiando a las bacterias gram negativas se observo que *Escherichia coli* (ETEC) produce pequeñas vesículas de membrana externa que pueden ser liberadas como pequeñas bombas en muchos tejidos. *Escherichia coli* (ETEC) causa diarrea del viajero y mortalidad en infantes en países subdesarrollados. En genética y bioquímica actualmente es un foco de investigación las características de las bacterias que producen vesículas. Se tienen aislados mutantes de genes de *Escherichia coli* que son importantes en el proceso de vesiculación y en el proceso de caracterización de la disección de la toxina secretada que revelo la secretaria

general y que es la responsable para determinar la virulencia de la enterotoxina de *Escherichia coli* (ETEC) en la superficie de la célula de *Escherichia coli* (ETEC) y que contiene la toxina.

Purificando las vesículas de membrana externa y marcadas por fluorescencia, se han identificado moléculas que determinan el intercambio entre las vesículas tóxicas de la bacteria y las células epiteliales del humano. Estas toxinas se dirigen al exterior de la membrana de la vesícula y tienen la capacidad de entrar a la célula humana e intoxicarla. De esta manera se puede decir que la célula tiene receptores para la toxina y esta puede ser la base molecular para la toxicidad de *Escherichia coli* (ETEC) derivada de las vesículas.

Escherichia coli presenta enterotoxigenicidad, y suelta vesículas de membrana exterior que poseen LPS y una enterotoxina basado en el volumen de proteínas, las vesículas contuvieron 2 veces más LPS que las membranas exteriores, y más de tres veces la cantidad de enterotoxina. Fue concluido que la elaboración de vesículas puede funcionar como portadores fisiológicos significantes de la toxina.

La enterotoxina es un importante factor de virulencia de *Escherichia coli* (ETEC), es transportada la vesícula por la célula en su superficie externa, y se puede medir la entrada de la vesícula entera de *Escherichia coli* (ETEC) dentro del tejido del colon-rectal humano por medio de cultivos. Se ha descubierto la habilidad que tienen las vesículas de adherirse a la célula específica, dependiendo del tipo de cepa original. La enterotoxina de *Escherichia coli* se han aislado de cultivos

naturales y purificados por gradientes de concentración removiendo cualquier proteína soluble y contaminantes de la preparación. Las proteínas de la vesícula son similares pero no idénticas a las de la membrana externa y difieren entre cepas. La mayoría de las proteínas de las vesículas son resistentes a la disociación. Un estrato se revelo por cromatografía y se observo que es mayor el componente de lípidos de la membrana externa que el de la vesícula. El citoplasma de la membrana y el citosol están ausentes en las vesículas pero la fosfatasa alcalina, AcrA y el periplasma interno esta localizado en las vesículas.

La actividad de la enterotoxina (LT) esta asociada con las vesículas de ETEC. La actividad de LT esta directamente correlacionada con la vesícula. Un análisis lejano revelo que LT es enriquecida en la vesícula y es localizada en el interior de ambos y en el exterior de las vesículas. Las distintas proteínas que componen a las vesículas de ETEC y su habilidad de llevar toxinas que puedan contribuir a la patogenisidad de la cepa de ETEC. (Al y cols; 2000) (Ohycol y cols; 1998) (Ferris y cols; 1984) (Bonhiver y cols; 1998)

X. PAPEL DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN EL INTERCAMBIO GENÉTICO.

La importancia del material genético en las vesículas de membrana externa de bacterias gram negativas.

La transformación, es uno de los mecanismos básicos de intercambio genético entre las bacterias, requiere la inducción de un estado de competencia. La inducción de competencia en el *Haemophilus influenzae* se acompaña por la producción de vesículas que se vierten en el medio cuando las células competentes devuelven las condiciones de crecimiento normales. También se ha mostrado que en el ADN específico los péptidos obligatorios están presentes en la superficie de estas estructuras. Esto no está claro, sin embargo, si las vesículas se generaran por la competencia, por lo menos en *Haemophilus influenzae*, es similar a aquellos encontrados en especies bacterianas que normalmente no se transforman. (Mayrand y cols; 1989) (Dorward y cols; 1989)

Como varios patógenos gram negativos, *Neisseria gonorrhoeae* forma y descarga vesículas de membrana. Estas vesículas de membrana contienen proteínas, lipopolisacárido y ácidos nucleicos. Las vesículas purificadas contienen dos fragmentos, 81 y 811, con las densidades respectivas de 1.12 y 1.30, la diferencia entre estos 2 tipos de fragmentos de vesículas es la densidad y que 811 contiene lipopolisacárido y proteínas de membrana externa. Ambos fragmentos contuvieron ARN, ADN redondo, y ADN lineal, se consideró primero si los ácidos nucleicos eran asociados con los fragmentos de vesículas. Después de encontrar

plásmidos. ADN lineal y ARN asociado con las vesículas, se examinó el ADN encontrado en las vesículas para ver si estos ácidos podrían incorporarse y podrían ser expresados por una bacteria destinataria. Los resultados mostraron que los plásmidos se separan dentro de la membrana externa de las vesículas 811 y resisten la digestión de DNAsas. Además, las bacterias destinatarias incorporan este tipo de plásmido y expresan plásmidos específicos de penicilinasas asociados con las vesículas. Éstos resultados *in vitro* sugieren que la formación de vesículas, puede servir para transferir intercelularmente plásmidos *in vivo*, mientras constituyendo un mecanismo del intercambio genético previamente inexplorado quizás en estas bacterias. Los plásmidos asociados con el fragmento de vesículas 811 son resistentes a la hidrólisis enzimática exhaustiva y se demostró que una cepa con plásmido de penicilinasas, pudo transferir esta información a otra cepa que no contenía el plásmido de penicilinasas esto sugiere que la exportación de ADN asociado a vesícula puede servir como un papel de intercambio genético *Neisseria gonorrhoeae*. (Dorward y cols; 1989)

XI. LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS.

Desarrollo de una vacuna contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

Las vesículas de membrana externa son otra opción para elaborar una vacuna contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B. El desarrollo de esta vacuna es derivado de un tipo de cepa silvestre para dar protección a jóvenes. Se puede obtener una

Vacuna monovalente de vesículas de membrana externa en eventos de epidemiológicos y en enfermedades endémicas por diferentes cepas patógenas. Con tal vacuna de vesículas de membrana externa el suero tiene actividad bactericida induciendo antígenos de men B. Esta investigación aumenta la posibilidad para la identificación de antígenos para obtener completamente la secuencia genómica. Este estudio tienen como fin encontrar la combinación correcta del antígeno para el desarrollo de una mezcla reactiva para generar la vacuna contra *Neisseria meningitidis* sero grupo B. (Poolman y cols; 2000)(Brodeur y cols; 1985)

Desarrollo de una vacuna contra *Helicobacter pylori*.

Por medio de las vesículas de membrana externa se puede producir una vacuna con la cual podamos inducir inmunidad contra *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* produce inflamación la cual es asociada con el desarrollo de gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico en humanos. Para ello se infectan animales de laboratorio con *Helicobacter felis* para evaluar la inmunogenética antes de describir las vesículas de membrana externa de *Helicobacter pylori* que es la fracción que daría la protección inmune.

Helicobacter pylori induce inflamación y es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma gástrico, esto ocurre en un gran número de niños de países subdesarrollados que son infectados por *Helicobacter pylori* en una edad temprana. La inmunización contra *Helicobacter pylori* puede representar una rápida y efectiva

intervención para reducir mundialmente el cáncer gástrico y puede ser utilizado en cepas distintas de *Helicobacter*.

Usando como modelo *Helicobacter felis* en la infección que causa *Helicobacter pylori* en humanos. Se puede utilizar *Helicobacter felis* para infectar ratones y con ellos ser inmunizados por vía oral contra la toxina del cólera. Se ha obtenido la *Helicobacter felis* para infectar ratones y con protección contra la infección de *Helicobacter felis* en ratones inmunizados con el aumento de anticuerpos sensibilizados en la preparación de la membrana externa de *Helicobacter felis* y tener un gran número de ratones inmunizados más rápidamente con las vesículas de membrana externa de *Helicobacter felis*. Y con ello obtener los componentes de la membrana externa de *Helicobacter pylori* los cuales deben ser inmunogénicos en ratones para obtener una vacuna efectiva contra *Helicobacter pylori*. (Keywords; 2000)

XII. IMPORTANCIA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Las vesículas de membrana externa como desarrollo de nueva terapia en el humano.

Se han desarrollado nuevas vacunas por medio de vesículas de membrana externa para inmunizar humanos y animales contra un gran número de bacterias patógenas, como también la liberación de antibióticos directamente a bacterias resistentes a los mismos.

Existen dos tipos básicos de bacterias las gram positivas y las gram negativas, hay una gran diferencia entre las dos. En las gram negativas se encuentra la *Escherichia coli* y *Salmonella* que son muy semejantes, que pueden causar serias infecciones del tracto intestinal. Constantemente liberan vesículas de membrana externa las cuales parecen minúsculos globos, estos pueden ser aislados de una cepa para realizar una vacuna atenuada viva y que pueda llegar a ser una vacuna oral efectiva contra bacterias gram negativas y gram positivas.

Las vesículas de membrana externa pueden llevar poderosas enzimas que permitan descubrir y destruir a las bacterias patógenas. Lo más importante es que las vesículas de membrana externa pueden ser llenadas con antibióticos. Las vesículas cargadas penetran a las bacterias gram negativas resistentes a otras drogas y se fijan algún sólido hasta llegar al tejido. Una vez en el interior ellas estallan y ponen en libertad su carga y matan a la bacteria. Todo esto nos indica que en un futuro cercano podremos tener una concentración que nos pueda inmunizar contra muchas bacterias patógenas incluyendo cólera, disentería y *Helicobacter pylori*. Se puede empaquetar el antibiótico en las vesículas y mandarlas justo al tejido infectado, inhibiendo el crecimiento del patógeno.

La tecnología trabaja en humanos como también en animales de granja y animales domésticos. Esta manera de introducir la droga resulta particularmente prometedora, por que puede ser liberada y usarse en cualquier parte del ser humano incluyendo drogas antitumorales hacia células malignas. Más adelante se podrá empaquetar casi cualquier proteína o pequeñas biomoléculas en las

vesículas y hasta, hormonas para ser llevadas a tejidos que las requieran. (Mayer; 2000)

Mientras el papel de las vesículas en la patogénesis es incierto, los datos indican que estas estructuras pueden funcionar como factores de virulencia. Su tamaño pequeño podría permitirles fácilmente cruzar barreras del epitelio que son por otra parte impermeable a las células enteras. Las vesículas podrían servir como un vehículo para las toxinas y enzimas proteolíticas, pero también para entender la capacidad de las células bacterianas de obtener los nutrientes. Las vesículas pueden degradar los anticuerpos y así impedir la defensa inmune antibacteriana específica.

Se cree que las vesículas podrían emplearse como inmunógenos en un futuro cercano.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aase A. E. Høiby A. Michaelsen T. E. May 1997. Opsonic and bactericidal activity induced by different IgG subclass antibodies after immunisation with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine, *Immunology Letters*, Volume 56, Part 2, pp. 398
- Amis Eric J. Dan J. Wendt, Edward D. Erickson and Hyuk Yu. 22 June 1981. Permeability to ions of bovine retinal disk membrane vesicles in the bleached state, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 644, Issue 2, pp. 201-210
- Al Horstman. Kuehn MJ.2000. Enterotoxigenic Escherichia coli secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biology chemical*.28:pp. 275
- Bonhivers M. Plançon L. Ghazi A. Boulanger P. Maire M Le. Lambert O. Rigaud J. L. and Letellier L. May-June 1998. FhuA, an Escherichia coli outer membrane protein with a dual function of transporter and channel which mediates the transport of phage DNA, *Biochimie*, Volume 80, Issues 5-6, pp. 363-369
- Brodeur B.R. Larose Y. Tsang P. Hamel J. Ashton F. and Ryan A. 1985. Protection against infection with Neisseria meningitidis group B serotype 2b by passive immunization with serotype-specific monoclonal antibody. *Infect. Immun.* pp. 510-516.
- By J. Smalley W. and Birss A. J. 1987. Trypsin-like Enzyme activity of the extracellular membrane vesicles of bacteroides gingivalis W50. *Jurnal of general Microbiology*. 133: pp. 2883-2885.
- Cann K.J. and Rogers T. R. 1989. Detection of antibodies to common antigens of pathogenic and commensal Neisseria species. *Med. Microbiol.* pp. 23-30
- Cartwright Keith, Rhonwen Morris, Hans Rümke, Andrew Fox, Ray Borrow, Norman Begg, Peter Richmond and Jan Poolman. 4 June 1999. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins, *Vaccine*, Volume 17, Issues 20-21. pp. 2612-2619
- Coen P.G. Cartwright K. and Stuart J. 2000. Mathematical modelling of infection and disease due to Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica. *Int. Epidemiol. Assoc.* pp. 180-188. 12. G.
- Dalseg Rolf, Elisabeth Wedege, Johan Holst, Inger Lise Haugen, E. Arne Høiby and Bjørn Haneberg. 14 May 1999. Outer membrane vesicles from group B meningococci are strongly immunogenic when given intranasally to mice, *Vaccine*, Volume 17, Issue 19. pp. 2336-2345

De Gaspari E. N. Ribeiro C. L. and Farhat C. K. May 1997. Study of the antigenic stability of the 50 kDa peptides using native outer membrane vesicles of N. meningitidis B and sera from infected patients, *Immunology Letters*, Volume 56, Part 2. pp. 290

De Leij Loe and Bernard Witholt. 15 November 1977. Structural heterogeneity of the cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 471, Issue 1. pp. 92-104

De VrijeTruus, Jan Tommassen and Ben De Kruijff. 12 June 1987. Optimal posttranslational translocation of the precursor of PhoE protein across Escherichia coli membrane vesicles requires both ATP and the protonmotive force, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 900, Issue 1. pp. 63-72

Dorward W. David W. Clauden F. Garon and Ralph C. Judd. 1989. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae. *Journal of bacteriology*. 171: pp. 2499-2501

Chrzyszczuk Adela, Arnold Wishnia and Charles S. Springer, Jr. 20 October 1981. Evidence for cooperative effects in the binding of polyvalent metal ions to pure phosphatidylcholine bilayer vesicle surfaces, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 648, Issue 1. pp. 28-48

Endo Tetsuya, Osamu Kimura, Masataka Hatakeyama, Masahiko Takada and Masakatsu Sakata. 28 April 1997. Effects of zinc and copper on cadmium uptake by brush border membrane vesicles, *Toxicology Letters*, Volume 91, Issue 2. pp. 111-120

Endo Tetsuya, Osamu Kimura and Masakatsu Sakata. 15 October 1998. pH-Dependent transport of cadmium in rat renal brush border membrane vesicles: cadmium efflux via H⁺-antiport, *Toxicology Letters*, Volume 99, Issue 2. pp. 99-107

Egan L.J. Orren A. Doherty J. Würzner R. and MCarthy C. F. 1994. Hereditary deficiency of the seventh component of complement and recurrent meningococcal infection: investigations of Irish family using a novel screening assay for complement activity an C7 M/N allotyping. *Epidemiol. Infect.* 113. pp. 275-281

Ferris F. G. and Beveridge T. J. September 1984. Binding of a paramagnetic metal cation to Escherichia coli K-12 outer-membrane vesicles, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 24, Issue 1. pp. 43-46

Figuerola J. Andreoni J. and Densen P. 1993. Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunol. Res.* 12. pp. 295-311.

Fischer Marc, George M. Carlone, Johan Holst, Derrick Williams, David S. Stephens and Bradley A. Perkins. 14 May 1999. Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane vesicle vaccine in adults with occupational risk for meningococcal

disease, Vaccine, Volume 17, Issue 19. pp. 2377-2383

Galla J. H. Theilen U. and Hartmann W. February 1979. Transversal mobility in bilayer membrane vesicles: Use of pyrene lecithin as optical probe, Chemistry and Physics of Lipids, Volume 23, Issue 3. pp. 239-251

Gold, R. I. Goldschneider, Lepow M. L. Draper T. F. and Randolph M. 1978. Carriage of Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica in infants and children. J. Infect. Di. pp. 112-121

Goldschneider L. E. Gotschlich C. and Artenstein M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. Part II. Development of natural immunity. J. Exp. Med. 129. pp. 1327-1348.

Gómez J. A. Hernández E. Criado M. T. and Ferreirós C. M. 17 October 1998. Effect of adjuvants in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of Neisseria meningitidis, Vaccine, Volume 16, Issue 17. pp. 1633-1639

Gómez J.A. Criado M. T. and Ferreirós C.M. 1998. Bactericidal activity of antibodies elicited against the Neisseria meningitidis 37 kDa ferric binding protein (FbpA) with different adjuvants. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 20. pp. 23-30.

Grenier D. and Belager M. 1991. Protective effect of Porphyromas gingivalis outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. J. infection and immunity.59: pp.3004-3005.

Hancock Robert E. Gary W. Decad M. and Hiroshi Nikaido. 5 July 1979. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa PA01, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Volume 554, Issue 2. pp. 323-331

Hart C. A. and Rogers T. R. 1993. Meningococcal disease. J. Med. Microbiol. 39. pp. 3-25.

Hasin Miriam, Shlomo Rottem and Shmuel Razin. 14 February 1975. He outer membrane of Proteus mirabilis I. Isolation and characterization of the outer and cytoplasmic membrane fractions, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Volume 375, Issue 3. pp. 381-394

Hijikata Takao, Noboru Fujimaki, Hidenobu Osawa and Harunori Ishikawa. 9 December 1998. The direct visualization of structural array from laminin to dystrophin in sarcolemmal vesicles prepared from rat skeletal muscles, Biology of the Cell, Volume 90, Issue 9. pp. 629-639

Lozier H. Richard, Werner Niederberger, Roberto A. Bogomolni, Sanbao Hwang and Walther Stoeckenius. 13 September 1976. Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments,

Halobacterium halobium cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 440, Issue 3. pp. 545-556

Keenan I. Jacqueline, Randall A. Allardyce and Philip F. Bagshaw. 1 April 1998. Lack of protection following immunisation with *H. pylori* outer membrane vesicles highlights antigenic differences between *H. felis* and *H. pylori*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 161, Issue 1. pp. 21-27

Jones R. M. and Jackson J. B. 9 August 1990. Proton efflux from right-side-out membrane vesicles of *Rhodobacter capsulatus* after short flashes, *Biochimica et Biophysica acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1019, Issue 1. pp. 51-58

Kadurugamuwa L. Jagath and Terry J. Beveridge. 1996. Bacteriolytic Effect of Membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens. *Conceptually New antibiotics. J. of bacteriology*. 178: pp. 2767-2768.

Kadurugamuwa L. Mayer J.A. Messner P. Sara M. Sleytr U. B. and Beveridge J. J. 1998. S-layered *Aneurini bacillus* and *Bacillus* spp. are susceptible to the lytic action of *Pseudomonas aeruginosa* membrane vesicles. *J. of Bacteriology*. 180: pp. 2306

Kadurugamuwa L. Jagath and Terry J. Beveridge. 1995. Virulence factor are released from *P. aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretion. 177: pp. 3998-3999

Kang Jung-Sook, Choi Chul-Min and Yun Il. 11 June 1996. Effects of ethanol on lateral and rotational mobility of plasma membrane vesicles isolated from cultured mouse myeloma cell line Sp2/0-Ag14, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1281, Issue 2. pp. 157-163

Keywords: 2000. Lack of protección following immunisation with *H. pylori* outer membrane vesicles highlights antigenic differences between *H. felis* and *H. pylori*. *Biolchem*. pp. 28.

Koch L. Arthur. March 1998. The Biophysics of the Gram-Negative Periplasmic Space, *Critical Reviews in Microbiology*, Volume 24, Issue 1. pp. 23-59

Korsyold E. G. Oftung E. F. Meyer L. Næss, Aase A. Wetzler L. Delvig A. Michaelsen T.E. May 1997. Rosenqvist. T cell epitopes from the meningococcal class 3 outer membrane protein recognized after vaccination with the Norwegian outer membrane vesicle (OMV) vaccine, *Immunology Letters*, Volume 56, Part 2. pp. 291

Kuipers J. A. Van der Ley J. P. and Poolman J. T. 1 May 1997. On the Interaction between a Bactericidal Antibody and a PorA Epitope of *Neisseria meningitidis* in

Outer Membrane Vesicles: A Competitive Fluorescence Polarization Immunoassay, Analytical Biochemistry, Volume 247, Issue 2. pp. 382-388

Levin M. and Pollard A.J. Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19 (2000), pp. 333–345.

Li Zusheng . Anthony J. Clarke and Terry J. Beveridge. 1996. A major autolysin of Pseudomonas aeruginosa: Subcellular distribution, potential role in cell growth and division, and secretion in surface membrane vesicles. *J. of bacteriology*. 178. pp. 2479-2480.

Li Zusheng . Anthony J. Clarke and Terry J. Beveridge. 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *Journal of bacteriology* 180. pp. 5478-5482

Dr. Mary Iliopoulou, Dr. Jiljana Pasa-olje, Gordon Anderson and Dr. Margaret Romine. 2000. Whole-proteome analysis of Shewanella oneidensis MR-1 membrane vesicles. *Science Highlights*

Mandrell R. E. Azmi F. C. and Granoff D. M. 1995. Complement mediated bactericidal activity of human antibodies to poly 2–8 N-acetylneuraminic acid, the capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis serogroup B. *J. Infect. Dis.* 172. pp. 1279–1289.

Matsuzaki Katsumi, Ken-ichi Sugishita and Koichiro Miyajima. 1999. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative bacteria, *FEBS Letters*, Volume 449, Issues 2-3. pp. 221-224

Matsuzaki Katsumi, Ken-ichi Sugishita, Mitsunori Harada, Nobutaka Fujii and Koichiro Miyajima. 1997. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1327, Issue 1. pp. 119-130

McQuillen DP, Gulati S, Rice PA. Complement-mediated bacterial killing assays. In: Clark VL, Baroil PM, editors. 1994. *Methods in enzymology*. London: Academic Press. pp. 137–47.

Meyer Lisbeth Næss, Tanja Aarvak, Audun Aase, Fredrik Oftung, E. Arne Høiby, Randi Sandin and Terje E. Michaelsen. 1999. Human IgG subclass responses in relation to serum bactericidal and opsonic activities after immunization with three doses of the Norwegian serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccine, *Vaccine*, Volume 17, Issues 7-8. pp. 754-764

Müller Heinz, Ursina Schmidt and Hans U. Lutz. 1981. On the mechanism of vesicle release from ATP-depleted human red blood cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 649, Issue 2. pp. 462-470

Dr.Mayer Andreas. 2000. New vaccine and disease treatments and High-tech humanities research. Research Group.

D. Mayrand y D. Grenier. 1989. Biological of outer membrane vesicles. Review synthese. pp. 607-611

Nassar Patricia Maria, Almeida Luis Eduardo and Tabak Marcel. 1997. Binding of dipyrindamole to phospholipid vesicles: a fluorescence study, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1328, Issue 2, 4. pp. 140-150

Oh Joon-Taek, Tina K. Van Dyk, Yolanda Cajal, Prasad S. Dhurjati, Myron Sasser and Mahendra K. Jain. 29 May 1998. Osmotic Stress in Viable Escherichia coli as the Basis for the Antibiotic Response by Polymyxin B, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 246, Issue 3. pp. 619-623

Park Keon, Kyoung Ryong Kim, Jee Yeun Kim and Yang Saeng Park. 1997. Effect of Cadmium on Na-P_iCotransport Kinetics in Rabbit Renal Brush-Border Membrane Vesicles, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 145, Issue 2. pp. 255-259

Patrick Sheila, James P. McKenna, Seamus O'Hagan and Dermott Evelyn. 1996. A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of Bacteroides fragilis whole cells and outer membrane vesicles, *Microbial Pathogenesis*, Volume 20, Issue 4. pp.191-202

Peeters M. C. A. Carla, Ivo J. T. M. Claassen, Margje Schuller, Gideon F. A. Kersten, Eileene M. Rouppe van der Voort and Jan T. Poolman. 1996. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of Neisseria meningitidis in mice, *Vaccine*, Volume 17, Issues 20-21. pp. 2702-2712

Peeters M. C. A. Carla, H. C. Rümke, L. C. Sundermann, E. M. Rouppe van der Voort, J. Meulenbelt, M. Schuller, A. J. Kuipers, P. van der Ley and J. T. Poolman. July 1996. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine, *Vaccine*, Volume 14, Issue 10. pp. 1009-1015

Peltola H., Meningococcal vaccines: current status and future possibilities. *Drugs* 55 (1998), pp. 347-366

Perera V. Y. Penn Y. C. and Smith H. 1980. The use of specific antiserum induced by lectin-antigen complexes to investigate the outer membrane antigens of Neisseria gonorrhoeae, *Journal of Immunological Methods*, Volume 37, Issue 2. pp. 175-184

Pintor M. Ferrón L. Gómez J. A. Powell N. B. L. Ala'Aldeen D. A. A. Borriello S. P. 1996. et al., Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in Neisseria meningitidis. *Microb. Pathog.* 20. pp. 127-139

Poolman J. T. Feron C. Dequensne G. Denoel P. A. Desoi S. Goraj K. K. 2000. Outer membrane vesicles and other options for a Meningococcal B. vaccine. J. Biochemical.

Poolman J. T. 1995. Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis. 4. pp. 13–28. 25

Reyes Aguayo Maricruz Reyes. 19 Septiembre 2002. Tesis sobre Determinación de vesículas de Actinobacillus seminis y Brucella ovis mediante microscopia electrónica de barrido y transmisión. pp. 45-57

Riedo F. X. Plikaytis B. D and Broome C.V. 1995. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. Pediatr. Infect. pp. 643–657.

Ross S. C and Densen P. 1984. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of Neisserial and other infections in an immune deficiency. Medicine 63. pp. 243–273.

Rune Svein Andersen, Gunnar Bjune, E. Arne Høiby, Terje E. Michaelsen, Audun Aase, Unni Rye and Erik Jantzen. August 1997. Outer membrane vesicle vaccines made from short-chain lipopolysaccharide mutants of serogroup B Neisseria meningitidis: effect of the carbohydrate chain length on the immune response, Vaccine, Volume 15, Issue 11. pp. 1225-1234

Sánchez S. Troncoso, Kolberg J. Rosenqvist E. Veiga M. Ferreirós C. M. 2001. et al., Analysis of the expression of the putatively virulence-associated neisserial protein Rmp (class 4) in commensal Neisseria and Moraxella catarrhalis strains. FEMS Microbiol. Lett. 199. pp. 171–176.

Sánchez S. Troncoso, Moreda M. Criado M. T. and Ferreirós C. M. 2002. Antigenic cross-reactivity between outer proteins of Neisseria meningitidis and commensal Neisseria species. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 27. pp. 103–109

Sánchez S. Troncoso, Ferreirós C. M. and Criado M. T. 2000. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and commensal Neisseria. Vaccine 19. pp. 3390–3398.

Sedgwick G. Edward and Philip D. Bragg. 17 December 1987. Distinct phases of the fluorescence response of the lipophilic probe N-phenyl-1-naphthylamine in intact cells and membrane vesicles of Escherichia coli. Biochimica et Biophysica acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 894, Issue 3. pp. 499-506

Smith P. K. Krohn R. I. Hermason G. T. Mallia A. K. Gartner F. M. Provenzano M. D. 1985. et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150. pp. 76–85.

Srisatjaluk R. Doyle R. J. and Justus D. E. August 1999. Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis inhibit IFN-mediated MHC class II expression by human vascular endothelial cells, *Microbial Pathogenesis*, Volume 27, Issue 2. pp. 81-91

Takezoe Hideo and Yu Hyuk. February 1981. Dynamic kerr effect measurements on photoreceptor disk membrane vesicles, *Biophysical Chemistry*, Volume 13, Issue 1. pp. 49-54

Toropainen Maija, Helena Käyhty, Leena Saarinen, Einar Rosenqvist, E. Arne Høiby, Elisabeth Wedege, Terje Michaelsen. 4 June 1999. The infant rat model adapted to evaluate human sera for protective immunity to group B meningococci, *Vaccine*, Volume 17, Issues 20-21. pp. 2677-2689

Van Heerikhuisen Harm, Mieke Boekhout and Bernard Witholt. 1 November 1977. Proline transport activity in Escherichia coli membrane vesicles of different buoyant densities, *Biochimica et Biophysica acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 470, Issue 3. pp. 453-464

Van Der Ley P. and Poolman J. T. July 1996. Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine, *Vaccine*, Volume 14, Issue 10. pp. 1001-1008

Whitmire M. Willia and Claude F. Garon. 1993. Specific and Nonspecific Responses of Murene B cells to membrane blebs of Borrelia burgdoferi. *J. Infection and immunity*.61: pp. 1460-1462.

Wood JN. 1984. Solid-phase screening of monoclonal antibodies. In: Walker JM, editor. *Methods in molecular biology*. Clifton: Human Press. pp. 279-286.

Zhou Leah, Ratchapin Srisatjaluk, Justus D. E. and Doyle R. J. 15 June 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 163, Issue 2. pp. 223-227

Zorgani A. A. James V. S. Stewart J. Blackwell C. C. Elton R. A and Weir D. M. 1996. Serum bactericidal activity in a secondary school population following an outbreak of meningococcal disease: effects of carriage and secretor status. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14. pp. 73-81.

Zhou Leah, Ratchapin Srisatjaluk, Justus D. E. and Doyle R. J. 15 June 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 163, Issue 2. pp. 223-227