



79
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
Cuautitlán

**“Redes idiotípicas generadas a partir
de anticuerpos monoclonales
anti-porinas de
Salmonella Typhi”**

Salmonella Typhi

T E S

Que para obtener el Título de :

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta :

Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 1989



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.

I N D I C E

1.0	Resumen	1
2.0	Introducción	2
3.0	Objetivos	25
4.0	Materiales y Métodos	26
4.1	Métodos analíticos	25
4.1.1	Determinación de Proteínas	25
4.1.2	Determinación de LPS	26
4.1.3	SDS-PAGE para porinas y PME	26
4.1.4	PAGE para LPS	27
4.1.5	Inmunotransferencia	28
4.1.6	Análisis Inmunoenzimático (ELISA)	29
4.1.7	Isoelectroforesis	30
4.1.8	Radio Inmuno-Ensayo en fase sólida	30
4.2	Métodos bacteriológicos	31
4.2.1	Comas bacterianas	31
4.2.2	Cultivo de bacterias	32
4.3	Métodos bioquímicos	32
4.3.1	Aislamiento de PME	32
4.3.2	Purificación de porinas	33
4.4	Obtención de anticuerpos monoclonales	34
4.4.1	Obtención de macrófagos de cav. peritoneal	34
4.4.2	Línea celular de mieloma	35
4.4.3	Células espéricas inmunes	35
4.4.3.1	Esquema de inmunización	35
4.4.3.2	Obtención de células de bajo	35
4.4.4	Fusión	36
4.4.5	Selección y clonación de hibridomas	37
4.4.6	Expansión de hibridomas	37
4.4.7	Almacenamiento de células	38
4.4.8	Purificación de anticuerpos monoclonales	38
5.0	Esquema de trabajo	40
6.0	Resultados	42
6.1	Aislamiento de PME	42
6.2	Purificación de porinas	42
6.3	Determinación de anticuerpos	46
6.4	Obtención de anticuerpos monoclonales	48
6.5	Determinación del isótipo	49
6.6	Especificidad del anticuerpo monoclonal	49
6.7	Purificación del anticuerpo monoclonal P1 a partir de sobrenadantes de hibridoma	51
6.8	Actividad del anticuerpo monoclonal P1P	53
6.9	Sistema de redes idiótipicas generadas contra el anticuerpo monoclonal	55
7.0	Discusión	57
8.0	Conclusiones	60
9.0	Bibliografía	61

INDICE DE FIGURAS

Cuadro	1	- Porinas de <i>E.coli</i> y <i>S.typhimurium</i>	12
Figura	1	- Envoltura Celular de Bacterias Gram (-)	13
Figura	2	- Organización de las Proteínas de Membrana Externa.	14
Figura	3	- Teoría de las Redes Idiotópicas	23
Figura	4	- Red Idiotópica e Imagen del Antígeno	24
Figura	5	- SDS-PAGE de Porinas y PME	43
Figura	6	- PAGE de LPS teñidas con nitrato de plata	44
Figura	7	- Perfil cromatográfico de purificación de porinas de <i>S.typhi</i> por exclusión molecular	45
Figura	8	- Determinación de anticuerpos anti-PME y anti-LPS.	47
Figura	9	- Secuencia de la determinación de anticuerpos en los sobrenadantes de los hibridomas que dieron origen al anticuerpo monoclonal P1.	48
Tabla	1	- Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal anti-porinas.	49
Figura	10-	Inmunotransferencia de PME de <i>S.typhi</i> revelada con sobrenadantes de cultivo de los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal P1 y SP2.	50
Figura	11-	Isoelectroenfoque de varias muestras	52
Figura	12-	Unión de P1P, P1LA y SP1LA a porinas por ELISA.	54
Figura	13-	Redes Idiotópicas generadas contra el anticuerpo monoclonal P1.	56

A B R E V I A T U R A S

- Ab3 - Suero de ratones inmunizados con PIP.
- Ab4 - Suero de ratones inmunizados con SPILA.
- ACF - Adyuvante Completo de Freund.
- AIF - Adyuvante Incompleto de Freund.
- CDR - Cluster Differentiation Region. (Región Determinante de complementariedad).
- DEM - Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DEM-S DEM suplementado con 15 % de SFB.
- EDTA- Acido Etilen Diamino Tetraacético.
- ELISA - Análisis Inmunoenzimático.
- Fab - Fracción de unión al antígeno de los anticuerpos.
- Fc - Fracción cristalizable de los anticuerpos.
- HAT - DEM suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina.
- HT - DEM suplementado con hipoxantina y timidina.
- HGPRT Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa.
- IEF - Isoelectroforesis.
- Kd - Kilodalton
- KDO - Acido 2-ceto 3-manoctulónico.
- LPS - Lipopolisacárido.
- Omp-A Outer Membrane Protein A. (Prot.modificable por calor).
- Pi - Anticuerpos monoclonales anti-porinas de *S.typhi*.
- PILA- Líquido Ascítico de ratón con tumor formado por hibridomas.
- PIP - Anticuerpos monoclonales anti-porinas purificados.
- PBS - Amortiguador de Fosfatos-Salina.
- PBS-T PBS con detergente Tween 20 al 0.1 % .
- PME - Proteínas de Membrana Externa.
- PNC - Papel de Nitrocelulosa.
- RIA - Radio Inmunoensayo.
- SDS - Dodecil Sulfato de Sodio.
- SDS-PAGE Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS
- SFG - Suero fetal Bovino.
- SPILA Suero de ratón productor de líquido ascítico.
- SSF - Solución Salina fisiológica.
- Tris-HCl Hidroximetil aminometano - Ac.clorhídrico.

1.0 RESUMEN.

Se purificaron dos proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* 9,12,d.V1, con pesos moleculares de 36,000 d a 38,000 d y que corresponden a las denominadas proteínas formadoras de poros (porinas), además contienen menos del 1% de contaminación con LPS. Estas preparaciones se emplearon para inmunizar ratones de las cepa Balb/c y las células de bazo inmunes, se fusionaron con la línea de mieloma murino Sp2/0. De los hibridomas resultantes de la fusión, se selecciono uno que secreta anticuerpos monoclonales que reconocen determinantes antigenicos compartidos por las dos porinas.

Ratones Balb-c inmunizados con el anticuerpo monoclonal purificado, o con suero de ratones productores de liquido ascítico demuestran que es factible la inducción de redes idiotópicas, siendo que tal vez uno de los hechos mas importantes fue la inducción de inmunidad activa contra el antígeno nominal (porinas de *S. typhi*).

2.0 INTRODUCCION.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por *Salmonella typhi*. Esta es una bacteria Gram negativa móvil de la tribu *Salmonellae* de la familia *Enterobacteriaceae*. De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D, el cual también se integra por otras especies con las cuales comparte los antígenos somáticos 9 y 12; sin embargo, se diferencia de ellas porque es la única que presenta antígeno "Vi". La fórmula: 9,12,d,Vi caracteriza a *S. typhi* en forma abreviada (8).

Las primeras descripciones de la fiebre tifoidea se le atribuyen a Thomas Willis en 1659; él describió los diferentes signos y síntomas de la enfermedad así como su duración y severidad. A pesar de esto, durante años, el padecimiento se confundió con el tifo y no fue sino hasta 1762 cuando Ruxham describió ambas enfermedades febriles como entidades clínicas diferentes: la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo) (20,55).

Jenner en 1850, en su libro titulado "Sobre la identidad y la no identidad de las fiebres tifoídica y tifoosa", estableció que las lesiones de las placas de Peyer y nódulos linfáticos eran específicas de la fiebre tifoidea (55).

William Budd, en 1856 determinó que la enfermedad es transmitida a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminadas con materia fecal proveniente de individuos enfermos (20).

Eberth, en 1880, describió la presencia del bacilo tifoidal en secciones histológicas de ganglios linfáticos mesentéricos y en hígado de pacientes con fiebre tifoidea; Pfeiffer, en 1885, realizó el primer aislamiento del bacilo a partir de heces (12). En el mismo año, Pfeiffer y Kölle demostraron que el suero de pacientes convalescientes protegía a los cobayos contra dosis letales de bacilo tifoidal y, en 1895, Widal describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de pacientes con fiebre tifoidea y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad (55).

Las primeras inmunizaciones experimentales con microorganismos vivos de *Salmonella typhi* fueron realizadas en conejos por Frankel y Simmons en 1886 y en ratones por Sauner y Peiber en 1887; posteriormente Kikovich empleó bacilos muertos con el mismo propósito. Los resultados obtenidos con las experiencias anteriores estimularon a Wright en Inglaterra y a Pfeiffer y Kölle en Alemania a utilizar, por primera vez en 1897, vacunas producidas con bacterias inactivadas, para la inmunización de humanos. La vacuna de Pfeiffer y Kölle, estaba hecha a base de bacterias tratadas con fenol e inactivadas por calor a 56°C (50). Estas vacunas cuando fueron utilizadas en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica produjeron una disminución significativa en la morbilidad y atenuación de los síntomas en los individuos inmunizados que adquirieron la enfermedad (49). En 1925, Besredka probó el

empleo de vacunas hechas a base de bacterias vivas atenuadas y administradas por vía oral. El efecto de las mismas fue estudiado en el ejército Francés; y sin embargo los resultados obtenidos con la misma, fueron malos pues hubo decesos entre los individuos vacunados (29).

Las vacunas tifoídicas elaboradas a base de bacterias muertas, se utilizaron durante décadas, sin poder demostrarse su efecto protector real, pues se carecía de modelos animales que probaran su eficacia y, no se relacionaba el efecto protector con algún indicador serológico. Esto, de hecho, no se logró sino hasta 1955 (49,29). A partir de esta fecha y bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética; en estos lugares se investigó la eficacia de vacunas preparadas con células enteras de *Salmonella typhi* inactivadas con acetona, calor y fenol o con alcohol. De los resultados obtenidos en estas investigaciones, se concluyó que la vacuna inactivada con acetona, designada con la letra K, resultó ser la mejor, ya que la protección conferida no sólo fue de mayor grado, sino también de mayor duración. La vacuna inactivada con calor y fenol, designada con la letra L, tuvo menor eficacia que la K y la inactivada con alcohol fue la menos efectiva. Se observó que la protección inducida con una sola dosis de las vacunas K y L era aceptable; sin embargo, el empleo de dos dosis proporcionaba una inmunidad más confiable y de mayor duración (25). Los estudios realizados por Hornick y cols. en voluntarios humanos (1968), usando las vacunas K y L, demostraron que la protección conferida por estas, estaba en función de

Las dosis a las que los individuos inmunizados estaban expuestos (18). El hecho de que las vacunas parenterales producían efectos colaterales indeseables motivó la búsqueda de nuevas fórmulas. Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran con bacterias vivas. Una de ellas se prepara con una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomocina y otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (designada por Germanier como Ty 213) (14,52). La efectividad de ambas vacunas fue valorada en voluntarios humanos, encontrándose resultados contradictorios en cuanto a la protección conferida por la cepa dependiente de estreptomocina (34). La vacuna de Germanier, protegió al 87% de los individuos inmunizados cuando la dosis de desafío fue de 10^7 bacterias (D150) (15). Los estudios de campo realizados con la vacuna de Germanier en Alejandría, Egipto, indicaron que era capaz de inducir protección en el 95% de la población estudiada (87). Sin embargo, esta misma vacuna fue aplicada a niños en Chile (1983) en tres dosis con intervalos de 2 ó 21 días entre cada una de ellas, sólo indujo protección del 51 y 67%, respectivamente (16).

De las experiencias anteriores destaca el hecho de que se desconoce la naturaleza de los antígenos de *Salmonella typhi* relacionados directamente con la protección y, más aún, la respuesta inmune del humano a dichos antígenos. Han sido numerosas las investigaciones encaminadas a realizar la identificación de los antígenos responsables de la inmunidad protectora en la fiebre tifoidea; la mayoría de ellas se han dirigido hacia el estudio de

los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático "O" (endotoxina y/o lipopolisacárido), el flagelar "H" y el capsular "Vi". Durante mucho tiempo se pensó que el antígeno somático "O" jugaba un papel muy importante en la protección por lo que se elaboró una vacuna a base del oligosacárido de repetición del lipopolisacárido (LPS). La protección obtenida con esta vacuna fue escasa y de corta duración (25,30).

Por lo que respecta al antígeno flagelar "H", se ha demostrado que tampoco está relacionado directamente con la inmunidad protectora. Tully y cols. en 1962 observaron que al inmunizar chimpances con una cepa rugosa de *S. typhi*, se inducía la producción de anticuerpos contra el antígeno "H"; estos no conferían protección, aún en títulos elevados (65). Anderson, en 1968, encontró que los ratones inmunizados con una mutante de *S. typhi* sin flagelos obtenían el mismo grado de protección que los inmunizados con cepas móviles (1).

Se ha tratado de relacionar al antígeno "Vi" con los mecanismos de protección. Los primeros estudios datan de 1934; Felix y Pitt informaron de la presencia tanto de dicho antígeno en cepas de *S. typhi* aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, como la de sus anticuerpos homólogos en el suero de estas personas (12). La falta de relación de los anticuerpos anti-Vi con la respuesta inmune protectora se ha demostrado por varios investigadores (19,53,68). Sin embargo, en otras publicaciones se demuestra que el antígeno "Vi", por sí solo, es capaz de inducir protección (16,7). Es importante señalar la importancia que tiene el antígeno

Vi en la virulencia de la cepa infectante, así como la conveniencia de conservarlo durante la preparación de vacunas (18, 53, 81).

Youmans y Youmans, en 1965, demostraron que la fracción ribosomal de *Mycobacterium tuberculosis* era efectiva para inducir inmunidad protectora en el ratón contra el reto del microorganismo homólogo. Estos resultados condujeron a aislar estas fracciones de diferentes bacterias e investigar su capacidad protectora. Actualmente gran número de referencias señalan la inducción de protección que confieren los antígenos ribosomales de otros microorganismos tales como *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* (38, 70). En 1970, Venneman y cols. demostraron que, en el ratón, las fracciones ribosomales de *Salmonella typhimurium* generaban protección contra la bacteria virulenta (66). Resultados similares fueron obtenidos por Molinari y Larralde (43). En trabajos posteriores, Molinari y Cabrera demostraron que las fracciones ribosomales de *Salmonella typhi* también inducían protección en ratones (42).

Con el fin de encontrar a los antígenos responsables de la protección inducida por estas fracciones ribosomales se han venido realizando varios estudios, con resultados muy diversos. En los primeros trabajos al respecto, Venneman y cols. acreditaron el ARN ribosomal como el antígeno protector (66). Johnson presentó evidencias de que eran las proteínas ribosomales las que protegían a los ratones (24). Smith y Biglye sugirieron que ambos antígenos, el ARN y las proteínas, se requerían para obtener una buena pro-

tección (61); sin embargo, en trabajos efectuados por Eisenstein, Misfeld y Johnson, se demostró que las fracciones ribosomales de *Salmonella* se encontraban contaminadas con LPS y proteínas de la envoltura celular (10,39). Más aún, en trabajos posteriores, Misfeld y Johnson demostraron que las proteínas de la envoltura celular de *Salmonella typhimurium* protegían a los ratones contra la infección por esta bacteria, en un grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales (40). Estos experimentos ponen en duda la efectividad de las fracciones ribosomales y apoyan lo sugerido por Males y Yosipovici, en el sentido de que realmente los antígenos protectores de *Salmonella* se localizan en la superficie bacteriana (37).

En los últimos años, las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas han cobrado gran importancia y diversos investigadores han enfocado sus estudios hacia el establecimiento del papel que desempeñan en la relación huésped-parásito. Su importancia se pudo entender gracias al advenimiento de métodos específicos que permitieron separar la membrana externa de la citoplasmática. Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* empleando esferoplastos preparados con lisozima y EDTA. En su investigación, dichas estructuras fueron lisadas por choque osmótico y posteriormente su membrana externa se separó de la citoplasmática en un gradiente de sacarosa (41). El método anterior fue modificado por Osborn con el fin de disminuir la cantidad de LPS en las preparaciones de PME (46). Por su parte, Schnaitman describió un método que evita la obtención de esfero-

plastos y consiste en destruir las bacterias en una prensa francesa, antes de conseguir la sedimentación de la envoltura celular y, posteriormente, la solubilización de la membrana citoplasmática con un detergente no iónico.

La identificación de las PME se efectuó por medio de la electroforesis en geles de poli-acrilamida. Schnaitman fue el primero en reportar que *Escherichia coli* contenía una proteína principal, la cual constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana (57); poco después, él y otros investigadores (59,2,21), demostraron por electroforesis que en realidad no era una sino cuatro.

Schmitges y Henning describieron una proteína principal que se podía separar, electroforéticamente, en dos bandas (56). En la actualidad se sabe que el número de las PME varía dependiendo de la información genética de la bacteria y que su expresión puede verse afectada por factores tales como las condiciones de cultivo, temperatura, etc.

Las PME que más se han estudiado, son las de *E. coli* y *S. typhimurium*. Di Rienzo, Nakamura e Inouye (1978) y Osborn y Wu (1980), hicieron una revisión extensa de ellas y las clasificaron en proteínas principales y menores (9,47).

De las proteínas principales se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo se expresan 5 de ellas con más de 100 000 copias por célula. Dentro de las proteínas principales se cuentan:

1) Las proteínas matrices o porinas, que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana. En el cuadro 1, se muestran las características generales de las mismas.

2) La proteína modificable por calor, involucrada con los procesos de conjugación y que actúa como receptor de fagos y colicinas.

3) La lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la péptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

En la figura 1, se muestra la disposición de los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas y en la figura 2 el arreglo de las proteínas de la membrana externa.

Con respecto a las proteínas menores, se ha demostrado que éstas intervienen como acarreadores en el transporte activo de moléculas y que están relacionadas con la replicación celular. Entre las menores se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad enzimática (fosfolipasa A) (9,48).

Las evidencias de que las PME están expuestas al medio externo llevaron a investigar su eficacia como inmunógenos protectores; Frascch y cols. encontraron que las PME de *Neisseria meningitidis* grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos: los anticuerpos anti-PME de la bacteria presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento (13). Buchanan y

Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger a chimpancés contra uretritis gonocócica se encontraba presente en la membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* (5) y posteriormente, comprobaron que los anticuerpos dirigidos contra las PME conferían protección específica a cobayos en que previamente se había inducido una infección gonocócica experimental (4).

Kussi y cols. detectaron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S. typhimurium* protegían al ratón contra una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (31,32).

Isibasi y cols. (22) demostraron que la inmunización activa y pasiva con PME de *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi, protegían al ratón hasta 500 veces la dosis letal media (DL₅₀). En este modelo, las porinas y la ompA fueron las PME que jugaron el papel más importante en la protección; sin embargo, cómo estas proteínas estaban contaminadas con 8% de endotoxina había la duda en cuanto a su papel real como antígenos protectores *per se*. Para poder eliminar este problema se decidió obtener las proteínas en forma pura por varios métodos. Uno de los seleccionados por este grupo de investigación consiste en extraer a las porinas mediante inmunoadsorbentes específicos elaborados a base de anticuerpos monoclonales y por otra parte, la inducción de inmunidad activa mediante anticuerpos anti-idiotípicos generados contra dichos anticuerpos monoclonales.

CUADRO 1. FORMAS DE *E. coli* K-12 y D y *S. typhimurium* LT2

NOMBRE	P.M.	OTROS NOMBRES		GEN	POSICION EN EL MAPA	REGULACION DE SU SINTESIS	PRESENTE EN:			DIÁMETRO ESTIMADO (nm)	RECEPTORES PARA FACTOS Y COLICINAS EN:	
		K-12	LT2				B	K-12	LT2		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
O15F	36,306	Ia, Ia, O-9, b	36K	<i>ompF</i>	21	Reprimida en alta osmolaridad	+	+	+	1.15	T10a, T2, T11, T12, T15, C01A	
O11C	37,083	Ib, Ib, O-9, c	36K	<i>ompC</i>	47	Desreprimida en alta osmolaridad	-	+	+	1.06	T10b, M21, PA2, 491, SS1, T12, T15, T16	F112, F1105, H221
O11D (36,600)			31K	<i>ompD</i>	26	Dependiente de AMP cíclico	-	-	+	"		F111, F112, H21
H10E	36,782	Ic, c, E		<i>h10E</i>	6	Dependiente de la concentración de fosfatos.	?	+	+	1.16	TC23, T016	

Modificado de Mikaido y Vaara (45).

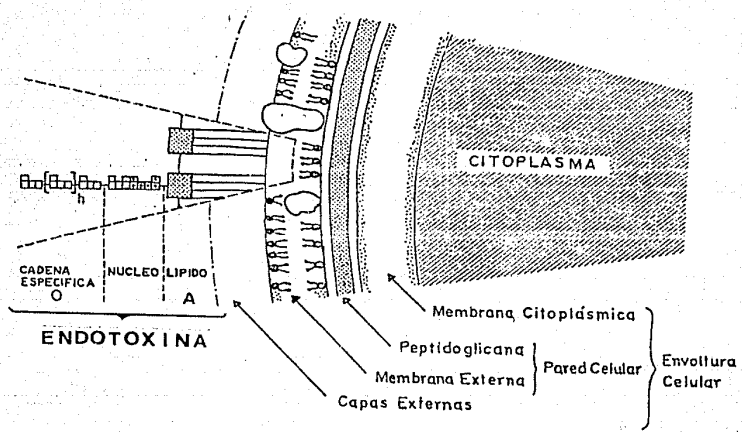


FIGURA 1

ESQUEMA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS (41).

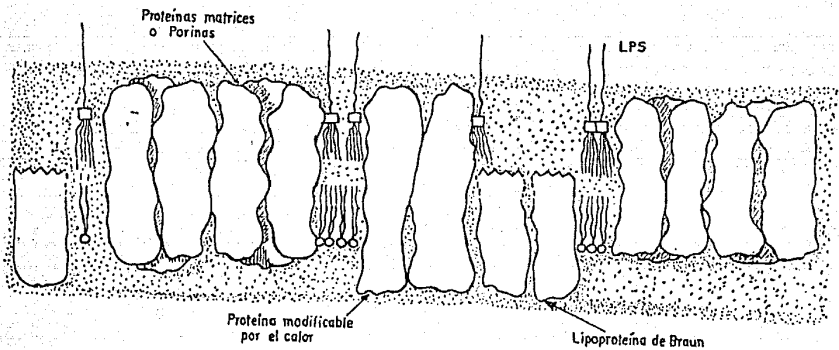


FIGURA 2
ORGANIZACION DE LAS PROTEINAS EN LA MEMBRANA EXTERNA (46).

La obtención de dichos anticuerpos monoclonales se basa en la técnica que fusiona una célula plasmática (productora de anticuerpo), con un plasmocitoma para formar un híbrido. Así, este producirá el anticuerpo que excretaba la célula plasmática, adoyando la capacidad del plasmocitoma en cuanto a desarrollarse *in vitro* e *in vivo* de manera indefinida (33).

Para la producción de hibridomas, es necesario seleccionar, en contra de la línea celular neoplásica, ya que las células linfoides normales tienen vida corta en las condiciones usadas para el cultivo de tejidos; es decir, se eliminan solas. Esto se consiguió aislando una línea celular de plasmocitoma de ratón, adaptable al cultivo de tejidos y además resistente a la 8-azoguanina. Esta resistencia denota la deficiencia en la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT), enzima que transforma a la hipoxantina en las bases precursoras de ADN por la vía metabólica llamada "vía metabólica de la salvación" para la síntesis de ADN. Normalmente, esta vía no es funcional en las células somáticas, pero cuando la ruta normal de la síntesis de nucleótidos está bloqueada por aminopterina, un análogo del ácido fólico, la vía metabólica de salvación rescata a la célula. Así pues, en el medio de cultivo HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) de Littlefield (35), perecen las células parentales de HGPRT resistentes a la 8-azoguanina. Sin embargo, al fusionar estas células con linfocitos B normales, los híbridos resultantes desarrollan de una manera selectiva, con frecuencia razonablemente alta y sobreviven porque la célula linfóide normal provee de HGPRT.

Debido a la selección clonal y al hecho de que un híbrido dado se forma esencialmente al fusionarse una célula normal con una de plasmocitoma, el híbrido secretará un anticuerpo homogéneo: anticuerpo monoclonal. Si la fusión se lleva a cabo entre una célula linfocítica de ratón y un plasmocitoma resistente a β -azoguanina, también de ratón, los híbridos se pueden propagar como tumores en ratones, rindiendo cantidades relativamente grandes de anticuerpo monoclonal.

Resulta de particular importancia asegurarse de que las células linfocíticas B seleccionadas en el procedimiento de fusión, sean aquellas que se están dividiendo y secretan anticuerpos activamente y éstas, por supuesto, corresponden a plasmablastos surgidos como consecuencia inmediata del reto antigénico. Esto significa que, llevar a cabo la fusión cuando las células de base de un ratón son extraídas 2 a 5 días después de la administración de un antígeno, rinde una alta cantidad de híbridos que secretan anticuerpos que reaccionan con dicho antígeno. Por supuesto que esta heterogeneidad de la respuesta total, se encontrará clonalmente distribuida en la población total de híbridos y así, se requerirá una serie de ensayos de selección y clonación adecuados para obtener, no solamente el anticuerpo de la especificidad deseada, sino también de la afinidad y clase de inmunoglobulina apropiadas. Una vez aislada, la clona debe ser propagada *in vivo* e *in vitro*. Si la aparición de variantes no productoras de anticuerpo resulta exagerada y ello amenazara el crecimiento del híbrido deseado, se deberá obtener la línea celular original con una nueva clonación.

Los idiotipos son determinantes antigenicos que estan relacionados con la especificidad de los anticuerpos producidos de cada molécula de inmunoglobulina que los lleva.

El fenómeno idiotipico fue descrito inicialmente por Kunkel y posteriormente por Quidin en conejos inmunizados con anticuerpos anti-salmonella producidos en otro conejo genéticamente emparentado (portadores de los mismos aliotipos); en este modelo las unicas diferencias antigenicas entre las inmunoglobulinas del donante y del receptor estaban relacionadas con la region variable especifica (idiotipo) de la salmonella utilizada. Como consecuencia de este descubrimiento se reconocieron especificidades idiotipicas en muchos otros sistemas.

Los determinantes idiotipicos estan situados en el fragmento Fab de la molécula de inmunoglobulina, principalmente localizados en la proximidad del sitio activo del anticuerpo (61).

El termino idiotipo denota las secuencias unicas de la region V (variable) de los anticuerpos producidas por cada clona de células formadoras de anticuerpos. Los determinantes antigenicos idiotipicos de las moléculas de inmunoglobulinas fueron identificados en animales inmunizados con anticuerpos especificos obtenidos contra un antigeno en particular en animales genéticamente semejantes. Las unicas diferencias antigenicas entre las inmunoglobulinas del donador y del receptor fueron las unicas secuencias de la región V de los anticuerpos relacionada con la especificidad del anticuerpo. Por lo tanto, las respuestas estuvieron restringidas a dichos determinantes (62).

Gracias al estudio de las proteínas de "memoria" han permitido situarlos con mayor precisión en las regiones hipervariables (94). Hace relativamente poco, Jerne en 1974 (23), propuso una nueva teoría involucrada en la regulación del sistema inmune. A esta teoría la denominó "Teoría de los nodos clonales" según la cual el sistema inmunológico sería una red de idiotipos y de anticuerpos anti-idiotipos; esto es, si designamos como (Ac 1) y anticuerpo dirigido contra un determinado antígeno exógeno, el organismo produce anticuerpos (Ac 2) con especificidad anti-idiotípica frente a los idiotipos del anticuerpo (Ac 1); igualmente habrá producción de anticuerpos (Ac 3) con un especificidad para los idiotipos del (Ac 2), etc. Fig. (3).

La red que se forma supone la conexión y probable dependencia de un elemento de la red hacia otro de la misma.

A su vez, Jerne emplea una nueva terminología que es la que a continuación se muestra:

Epitopo : Determinante antigénico dispuesto en un antígeno (Ajeno al organismo).

Paratopo : Sitio de combinación de un anticuerpo.

Idiotipo : Epitopo localizado en un anticuerpo.

Idiotipo : Conjunto de idiotipos de un anticuerpo.

Idiotipos : Especificidades antigénicas de los anticuerpos de un individuo o grupo de individuos en respuesta a un antígeno dado.

El sistema inmunológico interactúa con los determinantes antigénicos, denominados también epitópos, por conducto de los sitios de combinación para los antígenos presentes en las regiones hipervariables de los dominios V en las moléculas de inmunoglobulinas, ya sea que éstas estén en la superficie de los linfocitos o que sean secretadas por ellos. Descubrimientos importantes han demostrado en forma clara que una molécula de anticuerpo tiene un carácter doble, actúa para reconocer a un antígeno dado y a su vez, se vuelve ella misma inmunogénica, aún para el animal que produce ese anticuerpo. Las regiones variables de una inmunoglobulina dada pueden actuar solas como determinantes antigénicos para generar otro conjunto de anticuerpos que reconocen la individualidad de esa inmunoglobulina como distinta de anticuerpos con diferentes especificidades. Los conjuntos de determinantes antigénicos o epitópicos de las inmunoglobulinas se denominaron idiotipos y a los anticuerpos inducidos contra ellos se les llamo anti-idiotipos. Cada epitopo idiotípico localizado en diferentes porciones de la región se identifica como un idiotipo.

Se han descrito determinantes idiotípicos que son solo VL (región variable de la cadena ligera de un anticuerpo), sólo VH (región variable de la cadena pesada de un anticuerpo) o ambos, que intervienen ya sea en los sitios de unión del antígeno (regiones determinantes de complementariedad CDR) o en los sitios de los dominios V donde no se combinan (regiones de la estructura, RE) (62).

Las características duales de las moléculas de anticuerpo y la aparente presencia en el repertorio de un individuo con genes que codifican para otros productos de la región V motivó a Jerne para proponer en 1974 que las respuestas autoinmunitarias a los idiotipos propios podrían constituir la base de los sistemas inmunoreguladores de la red inmunológica en los cuales la homeostasia se preserva por una coparticipación funcional de interacciones idiотipo-anti-idiотipo.

De acuerdo a este modelo, un antígeno induce la producción de un anticuerpo (Ac1) caracterizado por su idiотipo (Id1). A su vez este último estimula la síntesis de un anticuerpo anti-idiотipico (anti-Id1 o Ac2) portador del idiотipo 2 (Id2) que puede desencadenar la producción del anticuerpo anti-anti-idiотipico (anti-Id2 o Ac3) y así sucesivamente (62).

Por otra parte, Jerne postula la existencia de imágenes del antígeno (Fig. 4), esto es, que un Ac2 (Ab2 o anti-idiотipo) puede ser la imagen del antígeno y ser reconocido por un Ab1 (idiотipo) o un Ab3 (anti-anti-idiотipo) así, según Jerne, la entrada de un antígeno al organismo desencadena una respuesta contra el epitopo (E) del antígeno, mismo que es reconocido por un anticuerpo con un paratopo P1 portador de un idiотipo (11).

El P1 además de reconocer a E, es capaz de reconocer o ser reconocido por un anticuerpo 2 (Ab2) que lleva un paratopo P2 y un idiотipo I2, este I2 es capaz de ser la imagen interna del antígeno.

Este hecho podría desencadenar una respuesta de (Ab3) cuyo Fc puede reconocer al antígeno o al I2 del Ab2 suprimiendo o magnificando la respuesta contra el antígeno.

Los modelos iniciales del sistema de la red sugirieron que ésta era abierta y de extensión ilimitada en tanto que estudios más recientes tienden a apoyar una configuración circular de conjuntos limitados de idiotipos y anti-idiotipos (62).

Experimentos recientes sugieren que las redes idiotípicas no tienden hacia el infinito sino que se restringen a una cascada cíclica que va de Ab1- Ab2- Ab3- Ab4- Ab1- etc (48). En la actualidad se aceptan diferentes clases de idiotipos (27) :

Idiotipos privados : Son los característicos de una sola inmunoglobulina, están codificados por los genes de la región D y J de las inmunoglobulinas y por ende se encuentran en la porción CDR3.

Idiotipos públicos : Se encuentran a lo largo de la porción variable del Fab, pudiendo encontrarse en la porción CDR2 o en regiones "framework" (regiones adyacentes a las regiones hipervariables) y es un idiotipo compartido por varios anticuerpos dirigidos contra el mismo antígeno.

De acuerdo a las teorías de la red, para cada paratopo, puede encontrarse un idiotipo complementario adecuado en otra molécula de anticuerpo y viceversa. Dicho idiotipo debe ser esterequímicamente semejante (tridimensional) al epítipo del antígeno contra el cual el anticuerpo estuvo dirigido originalmente.

Jerne llamó al subconjunto de moléculas inmunoglobulínicas que contienen estos idiotipos "conjunto interno en imagen" ; Lindenmann los llama homocuerpos (62).

Al Ab2 con función de "imagen del antígeno" capaz de desencadenar la respuesta de anticuerpos contra el antígeno nominal se le ha clasificado (3) ,atendiendo a sus características de reconocer o ser reconocido , fig. 4 :

Ab2 α (alfa) : Son aquellos que en su idiotipo no son la imagen interna del antígeno y que, sin embargo, son capaces de desencadenar una respuesta de Ab1.

Ab2 β (beta) : Son aquellas cuyo idiotipo es propiamente la imagen interna del antígeno por lo que pueden conferir inmunidad en diferentes especies animales.

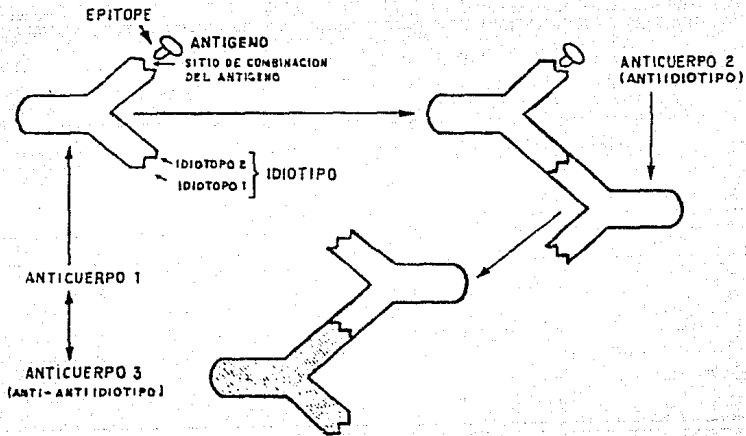


Figura 3. TEORIA DE LAS REDES IDIOTIPICAS.

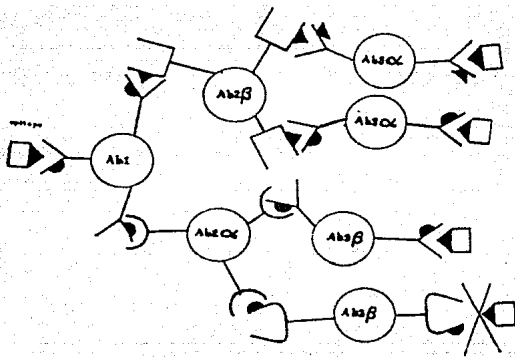


Figura 4. REG IDIOTIPICA E. IMAGEN DEL ANTIGENO.

3.0 OBJETIVOS.

El objetivo general es demostrar la generación de redes idiotípicas contra anticuerpos monoclonales que reconocen a antígenos proteicos de *S. typhi*.

Los objetivos particulares del presente trabajo son:

A. Obtener y caracterizar un anticuerpo monoclonal que reconozca las porinas de esta bacteria

B. Inducir una respuesta policlonal de redes idiotípicas contra el anticuerpo monoclonal obtenido.

C. Demostrar que en éstas redes idiotípicas se generan anticuerpos portadores de la imagen interna del antígeno (Ab 2-B).

4.0 MATERIALES Y METODOS.

4.1. Métodos Analíticos.

4.1.1. Determinación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas tanto en las preparaciones de PME como en las de porinas purificadas, se realizaron de acuerdo al método de Lowry (36) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

4.1.2. Determinación de LPS.

El contenido de LPS presente en las preparaciones de PME y porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto 3-manooctulónico (KDO) de acuerdo al método de Karxhanis (26). Empleando una curva patrón de KDO.

4.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE para PME y porinas se realizó en una unidad electrofóretica para geles verticales en placa (LKB Instruments), en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos (33). El gel separador contenía 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8

El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El amortiguador de muestra fue Tris 0.125 M pH 6.8 conteniendo SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 6 h empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente, los geles se tñeron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destañaron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel quedara transparente.

4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida para LPS.

La electroforesis para LPS se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments), en condiciones no reductoras, geles sin SDS y sistema de amortiguadores discontinuos (64, 60).

El gel separador contenía 14% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 6.8. El gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El amortiguador de muestra contenía Tris 0.125 M, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 8 h empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corriente Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 5.3. Al concluir la electroforesis, los geles se fijaron durante 18 h en una solución de etanol-acido acético-agua (40:10:50). Posteriormente se trató a cada gel, durante 15 min con 100 ml de una solución de ácido periodico al 0.7% en agua. El gel se lavó 4 veces, en intervalos de 15 min c/u, con agua desionizada, seguido de un tratamiento por 15 min con la solución de tinción [de esta solución se prepararon 200 ml agregando, gota a gota, 5 ml de nitrato de plata al 20 % a una solución de 2.8 ml de hidroxido de amonio concentrado y 42 ml de hidroxido de sodio al 0.36 % (durante este proceso se forma un precipitado café, el cual desaparece rápidamente) finalmente se afora a 200 ml con agua desionizada]. Posteriormente el gel se sometió a 3 lavados de 20 min con agua desionizada; después del último lavado se agregaron 100 ml de solución de revelado (500 ml de esta solución, contienen 25 mg de ácido nítrico y 0.1 ml de formaldehído al 37 %) permaneciendo en ella hasta que las bandas fueron visibles y el fondo del gel permaneció transparente.

4.1.5 Inmunotransferencia.

La electrotransferencia de PME o porinas de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se llevó a cabo durante 18 h a 100 mA en un equipo Transphor (LKB Instruments) empleando como amortiguador glicina 192 mM, metanol al 20% en Tris 20mM, pH 8.3 (61).

Al finalizar la transferencia, para comprobar que ésta se hubiera llevado a cabo, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250, de la misma manera, una parte del PNC se tiñó con tinta china (17). Otra parte del PNC se colocó 1 h a 37°C en solución de bloqueo [Gelatina al 0.25%, Tween 20 al 0.1% en PBS (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M pH 7.2)]; seguido de 4 lavados con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS). Posteriormente, el PNC se incubó 3 h a temperatura ambiente con el suero problema diluido 1:100 en PBS-G (gelatina al 0.25% en PBS); después de 4 lavados con PBS-T, el PNC se incubó 1.5 h a temperatura ambiente con la dilución óptima de antisuero de cabra conjugado a peroxidasa (anti-Ig's de conejo ó anti-Ig's humanas); seguido de 2 lavados en PBS-T y 2 en PBS, el PNC se colocó durante 20 min en la solución de sustrato (4-cloro 2-naftol 2 mM, H₂O₂ al 0.08% en PBS), posteriormente se lavó con agua, se secó al aire y se guardó en obscuridad para ser fotografiado.

4.1.6 Análisis inmunoenzimático (ELISA).

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-PME o anti-LPS en el suero de ratones o en los sobrenadantes de hibridomas, se empleó el método de ELISA (11). Para ello se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.) durante toda la noche a 4°C, con 50 µg/ml de PME o LPS en amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio-bicarbonato 0.1 M, pH 9.6), seguido de 1 lavado con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS), los pozos se incubaron durante 1 hr a 37°C con 200 µl de solución de bloqueo (gelatina al 0.25% en PBS). Posteriormente se agregaron 100 µl de la muestra problema y se incubaron por 3 hr a 37°C, seguido de 4 lavados con PBS-T las

placas se incubaron 1.5 hr a 37°C con la dilución óptima del antisuero de cabra conjugado a peroxidasa; después de 4 lavados con PBS-T se colocaron 100 µl de la solución de sustrato (o-fenilendiamina y H₂O₂ (30%) al 0.04% en amortiguador de carbonatos pH 5.0), a los 20 min la reacción se detuvo agregando 1 gota de ácido sulfúrico 2.5 M. Finalmente el desarrollo de color se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Dynatec).

4.1.7 Isoelectroenfoque (IEF)

Se empleó para verificar la pureza de las porinas y del anticuerpo monoclonal. En la técnica de isoelectroenfoque se separan las proteínas al alcanzar su punto isoelectrónico (punto en que la proteína tiene una carga neta igual a cero); el cual se establece mediante anfólinas y diferencias de potencial en el gel de poliacrilamida. El IEF se realizó en las unidades de electroforesis LKB 2117 Multiphor II y 2297 Macrodrive 5 acorde a las especificaciones del fabricante.

4.1.8 Radioinmunoensayo en fase sólida (RIA)

Para evaluar diversos sueros policlonales anti-idiotípicos, se realizó el método de RIA que consistió en lo siguiente:

Se recubrieron placas de 96 pozos con 100 µl de porinas (5 µg/ml) en solución de carbonatos pH 9.5 dejándolas en incubación a 37°C/1h y toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron

con PBS-Tween 20 al 0.1% y posteriormente se bloquearon con PBS-leche al 2% por 2h/37°C. Luego se volvieron a lavar y se dejaron incubar a 37°C 1.5 h con diluciones dobles seriadas de P1LA 100µl/pozo o con :

P1LA (1:2) 100µl/pozo.

SP1LA (1:2) 100µl/pozo.

Sueros de ratones (1:2) inmunizados con P1P (Ab3) o SP1LA (Ab4) o SSF (control) o con mezclas de : P1LA-(Ab3), P1LA-SP1LA, P1LA-(Ab4) o P1LA-(control). El procedimiento de las mezclas incluyó la incubación de la mezcla a 37°C/1h y su posterior centrifugación a 6000 x g para luego tomar el sobrenadante y agregar 100µl de éste a los pozos como se mencionó antes.

Después de ése tiempo, se lavaron los pozos y luego se incubaron con 20000 ctas/min (50µl/pozo) de gamas de cabra anti-ratón marcadas con I-125 [el marcaje se hizo acorde a la metodología descrita por Weir, 1986 (69).] y se dejó incubar la placa por 1.5h/37°C y luego toda la noche a 4°C. Al siguiente día se lavó la placa y se leyó la placa cada pozo en contador gamma.

4.2. Métodos Bacteriológicos.

4.2.1 Cepas bacterianas.

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas: *Salmonella typhi* 90, donada por el Instituto Nacional de Higiene; así como *Salmonella typhi* 9, 12, d, VI aislada de un paciente con fiebre tifoidea.

4.2.2 Cultivo de Bacterias.

Las bacterias empleadas para la obtención de PME se cultivaron a 37°C durante 8 h (fase de crecimiento logarítmica) en medio mínimo A (57) suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa, en un incubador rotatorio (New Brunswick Scientific Co.) a 200 rpm. Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1650 x g durante 15 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

Las bacterias empleadas para la obtención de LPS se cultivaron durante 18 h a 37°C en tioglicolato de sodio (Bioxon); posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación, la pastilla bacteriana se seco con acetona y se guardo a temperatura ambiente hasta su uso.

4.3. Métodos Bioquímicos.

4.3.1 Aislamiento de PME.

La obtención de PME de las cepas trabajadas se realizó de acuerdo al método de Schnaitman (58), para ello las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una absorbancia de 1.0 a 660 nm; posteriormente se rompieron mediante sonicación a 180 watts (Lab Line Ultratrid Labsonic system sonicator) por períodos de 2 min en baño de hielo hasta disminu-

uir la absorbancia a 0.3. Para eliminar a las bacterias enteras se centrifugó la suspensión sonicada a 7000 x g/15 min. Del sobrenadante se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a 200 000 x g/45 min a 4°C (L8 60 ultracentrifuge Beckman Instruments, Inc.), ésta se solubilizó con Tritón X-100 al 2% en Hepes 0.01 M pH 7.4. La fracción insoluble en Tritón X-100 (membrana externa y peptidoglicana) se separó por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas y se resuspendió en Tris-HCl (pH 7.2) conteniendo 2% de Tritón X-100 y EDTA 5mM. Seguido de una incubación a 37°C durante 10 min, se ultracentrifugó a 200 000 x g/45 min./37°C. Las PME se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron.

4.3.2 Purificación de Porinas.

La obtención de porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaído (44). Las bacterias cosechadas en la fase logarítmica de crecimiento se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Labsonic System sonicator) en períodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Seguido de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 x g/15 min., la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 x g/ 30 min/ 20°C, ésta se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de 2% de SDS, se incubó 30 min a 32°C y se ultracentrifugó nuevamente. El sedimento se sometió a una segunda solubilización de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente y por ultracentrifugación se obtuvo la peptidoglicana, las

proteínas unidas a ella se extrajeron incubando 2 h a 37°C con Tris 50 mM, pH 7.7 adicionado de 2% de SDS, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y 0.05% de β -mercaptoetanol, después de centrifugar a 100 000 x g /30 min/25°C; el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (30 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 ml/h.

4.4 Obtención de Anticuerpos Monoclonales.

4.4.1 Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal.

Los ratones Balb/c anestesiados en una cámara de éter se fijaron boca arriba a una tablilla, cerca de un mechero Bunsen. Se abrió la piel para exponer la pared abdominal, con cuidado se inyectaron por vía i.p. 5 ml de solución de Hanks y se dió un masaje abdominal durante 5 min. Posteriormente, con una jeringa, se retiró el líquido de la cavidad peritoneal, el cual se centrifugó a 1200 rpm/15 min. El sedimento se resuspendió en 5 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM, glicina 0.3 μ M, 2-mercaptoetanol 50 μ M, estreptomocina 100 μ g/ml y penicilina 100 U.I./ml (DEM-5). Se colocaron 50 μ l de la suspensión en cada pozo de la placa de cultivo de 96 pozos (Nunc Co.) y se mantuvieron en un incubador, a 37°C, con atmósfera controlada de humedad y 5% de CO₂, hasta su uso.

4.4.2 Línea celular de mieloma.

Se empleó la línea de mieloma de ratón Sp2/D (deficiente en HGPRT). Las células Sp2 se mantuvieron en DEM-5 dentro un incubador, a 37°C, con atmósfera controlada de humedad y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron la fase de crecimiento logarítmico se cosecharon (200 x g/5min) para emplearlas en la fusión.

4.4.3 Células Esplénicas Inmunes.

4.4.3.1 Esquema de inmunización: ratones Balb/c fueron inmunizados, por vía intraperitoneal (i.p.), el día 0 con 70 µg de porinas emulsificadas en adyuvante completo de Freund y los días 30, 60 y 90 con 50 µg de porinas en Tris (50 mM)-EDTA (5 mM).

4.4.3.2 Obtención de células de bazo: cuatro días después de la última inmunización, en condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y se depositó en una caja de petri conteniendo 5 ml de solución de Hanks. Dentro de una campana de flujo laminar, con el objeto de liberar las células plasmáticas, se disgregó el bazo; la suspensión, así obtenida, se colocó en un tubo de centrifuga cónico (Nunc Co.) y se dejaron sedimentar los nódulos tisulares durante 5 min, el sobrenadante se recuperó en otro tubo y se centrifugó a 200 x g/5 min. El paquete de células de bazo se resuspendió en 5 ml de DEM-5 y se contó el número de células viables en una cámara de Neubauer, mezclando dos gotas de la suspensión de células con dos gotas de azul tripan al 0.2%.

4.4.4 Fusión.

La fusión entre las células de bazo y las células de mieloma se efectuó de acuerdo al método descrito por Köhler y Milstein (28). Para lo cual, en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml se mezclaron 6.6×10^6 cels. de bazo/ml y 3.3×10^6 cels. Sp2/ml, seguido de una centrifugación a $200 \times g/5$ min la pastilla celular se resuspendió en 0.1 ml de DEM-s y se agregó lentamente, 1 ml de polietilenglicol 4000. Después de dejar reposar la mezcla 1 min a 37°C , se agregaron 8 ml de DEM-s, gota a gota, y se dejó reposar 5 min a 37°C . Posteriormente se adicionaron 30 ml de DEM-s y después de 5 min se centrifugó a $150 \times g/5$ min. La pastilla se resuspendió suavemente en 5 ml de medio DEM-s y se colocaron 50 μl de esta suspensión en cada uno de los 96 pozos de una placa de cultivo (Nunc Co.), la cual 48 h antes de la fusión había sido recubierta con macrófagos murinos de cavidad peritoneal. A las 24 h se sustituyó el medio DEM-s por medio HAT (DEM suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina). Cada tercer día se alimentaron los cultivos, retirando la mitad del medio de cada pozo y reemplazándolo con el mismo volumen de HAT. De la misma manera, al décimo primer día de cultivo el medio HAT se substituyó por medio HT (DEM suplementado con hipoxantina y timidina) en el cual se mantuvieron las células hasta el día 17. Este mismo día se observaron al microscopio y se alimentaron, con DEM-s, los pozos donde fueron visibles colonias de híbridomas.

4.4.5 Selección y clonación de hibridomas.

Cuando los hibridomas cubrieron la tercera parte del fondo del pozo de cultivo, se tomó el sobrenadante para cuantificar por el método de ELISA, la presencia de anticuerpos específicos. Los hibridomas secretores de anticuerpos anti-purinas se clonaron dos veces por el método de dilución limitante, que consistió en lo siguiente: Las células se resuspendieron y se realizaron las diluciones necesarias, en DEM-5, para tener 25 células/2.5 ml. Esta suspensión se depositó en la mitad de una placa de cultivo de 96 pozos, agregando 50 μ l por pozo.

4.4.6 Expansión de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

A) Expansión *in vitro*. Este paso consistió en pasar las clones productoras a placas de 24 pozos y posteriormente a botellas de 25 cm^2 (Nunc Co.). Una vez que las células cubrieron la superficie de la botella se recuperó el sobrenadante de cultivo y las células se crecieron en botellas de 80 cm^2 . Los sobrenadantes se utilizaron para determinar la especificidad del anticuerpo por electroinmunotransferencia, para determinar los isotipos y para los ensayos de protección.

B) Expansión *in vivo*.

Ratones (C57 BL/6 \times Balb/c)F₁ inoculados un mes antes con 0.5 ml de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) fueron inyectados por vía i.p. con 5 ml de un cultivo de hibridomas en fase de crecimiento logarítmico. Cuando el tumor se hizo evidente (aprox. de 4 a 6 semanas) se obtuvo el líquido de ascitis mediante punción peritoneal.

4.4.7 Almacenamiento de células.

Con objeto de conservar a los hibridomas obtenidos, se congelaron 5×10^6 células en 1 ml de solución crioprotectora (9 partes de SF8 + 1 parte de dimetilsulfóxido). Las células se colocaron en un criotubo de plástico y se guardaron a -70°C durante 24 h, posteriormente se pasaron a nitrógeno líquido (-196°C).

4.4.8 Purificación de anticuerpos monoclonales

Los sobrenadantes liofilizados, reconstituidos, pasados por filtros AMICOM (Sigma) y dializados, se pasaron exhaustivamente por una columna de afinidad lograda con suero de cabra anti- μ c de IgM de ratón.

La obtención del suero de cabra anti-Fc de IgM de ratón requirió de los siguientes pasos secuenciales : Se sacrificaron 200 ratones NIH y a partir del suero se purificó la IgM mediante columnas de protamina y ACA-22 ; con la IgM obtenida se inmunizó una cabra (3 mg, 5 veces con una semana de intervalo; la primera vez en ACF, la segunda y tercera en AIF y las dos últimas en PBS)

El suero obtenido (dos semanas después de la última inmunización) se pasó exhaustivamente por una columna de afinidad de Sepharosa 4B-IgG normal de ratón (para eliminar anticuerpos de cabra anti cadenas ligeras de ratón), el suero de cabra anti-Fc-IgM de ratón resultante fue el que se empleó para elaborar el inmunoadsorvente.

S.O ESQUEMA DE TRABAJO

A. Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra porinas de *S. typhi*.

B. Purificación de anticuerpos monoclonales: Se purificaron anticuerpos monoclonales (denominados PIP) y se observó la especificidad de unión al antígeno (porinas) mediante ELISA. La pureza del monoclonal PIP se corroboró mediante IEF. Por otra parte se inocularon por vía intraperitoneal ratones Balb-c con el híbrido PIP y el líquido ascítico resultante se denominó P1A, se demostró su capacidad de unión al antígeno mediante ELISA y RIA en fase sólida.

C. Se tomó el suero de ratones productores de líquido ascítico (denominado SP1A) y se observó su unión al antígeno (por ELISA y RIA). Además se corrió en IEF empleando como testigos sueros de ratones normales.

D. Se inmunizaron ratones con el PIP en bazo, al suero obtenido se le denominó Ab3.

E. Se inmunizaron ratones con el SP1A en bazo, al suero obtenido se le denominó Ab4.

F. Se inyectó solución salina fisiológica (SSF) en el pecho de ratones Balb-c cuyo suero fue denominado "control".

G. Se probó la unión de P1P, P1LA, SP1LA, Ab3, Ab4 y control al antígeno, mediante RIA en fase sólida.

H. Se probó la capacidad de inhibición de P1LA a las porinas con SP1LA, Ab3, Ab4 y control mediante la técnica de RIA en fase sólida.

6.0 RESULTADOS

6.1.- Aislamiento de PME.

Las preparaciones de PME de *Salmonella typhi* aisladas mediante el método de Schnaitman, contenían 1 mg/ml de proteína y un 6% de LPS como contaminante. El peso molecular de estas proteínas, determinado por SDS-PAGE, se encontró dentro del intervalo de 14 000 d a 80 000 d (fig. 5), destacándose la presencia de proteínas con pesos moleculares de 14 000 d, 28 000 d, 38 000 d y 40 000 d. La heterogeneidad del LPS contaminante se observa en la figura 2, mostrándose el lípido A con peso molecular de aproximadamente 12 000 d y con diversos pesos moleculares las unidades oligosacáridicas de repetición.

6.2.-Purificación de porinas.

Las porinas de *Salmonella typhi* se obtuvieron de acuerdo al método de Nikaído, el perfil cromatográfico de purificación por exclusión molecular se observa en la fig.7. Las porinas se recolectaron en la fracción 1, que eluyó inmediatamente después del volumen vacío, éstas contenían menos del 1% de LPS como contaminante (fig. 5).

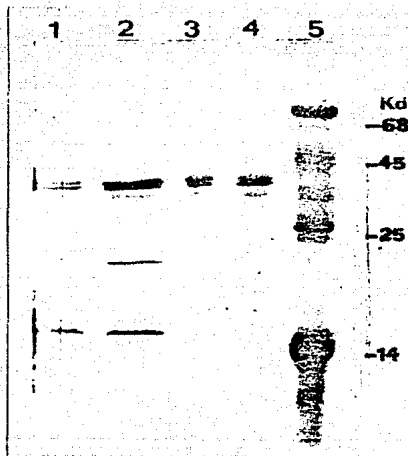


Figura 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, teñidas con azul de Coomassie, de: PME de *Salmonella typhi* aisladas por el método de Schnaitman [30 μ g carriles 1 y 2]; porinas de *Salmonella typhi* [30 μ g carriles 3 y 4], obtenidas por el método de Nikaido. Marcador de pesos moleculares, carril 5.

1 2 3



Figura 6. Electroforesis de LPS en geles de acrilamida teñidas con nitrato de plata: carril 1, *S. typhi* 9.12.d.Vii; carril 2, *S. typhi* 901 y carril 3, *S. typhimurium* (5ug en cada carril).

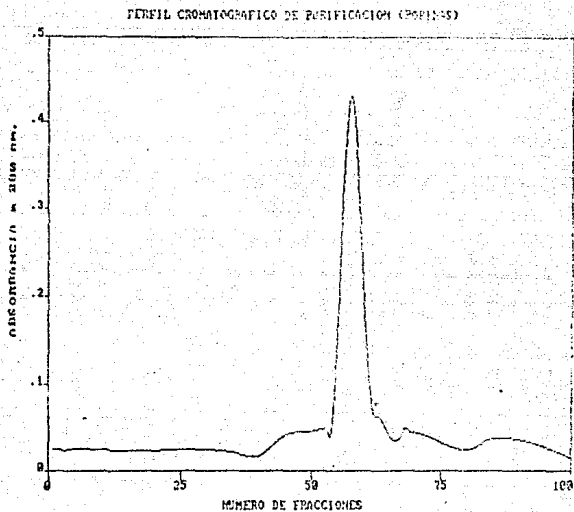


Figura 7. Perfil cromatografico de purificación de porinas de *S. typhi*, por exclusión molecular. Columna de Sephacryl S-200 (Pharmacia Chemical Co.), con una velocidad de flujo de 4 ml/h.

6.3.-Determinación de anticuerpos.

En la figura 8 se muestran las curvas de titulación de: suero de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi* y suero de ratones preinmunes. Como se puede observar el suero de los ratones inmunizados reconocieron a las porinas con una absorbancia de 1.0 a una dilución de 1:400, a la misma dilución la reactividad, de esos sueros, contra el LPS fue de 0.8, mientras que en el suero preinmune no se encontró reactividad en contra de ambos antígenos (Absorbancia de 0.02).

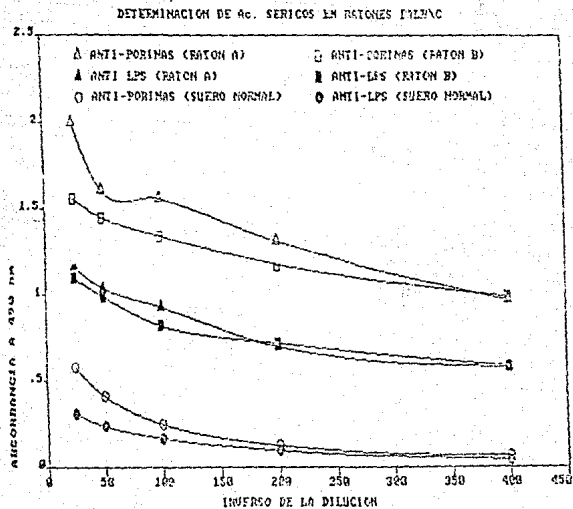


Figura 8. Determinación de anticuerpos anti-PME y anti-LPS en suero de ratones Balb/c por el método de ELISA.

6.4.- Obtenición de Anticuerpos Monoclonales.

El desarrollo para la obtención del anticuerpo monoclonal P1 se muestra en la siguiente figura:

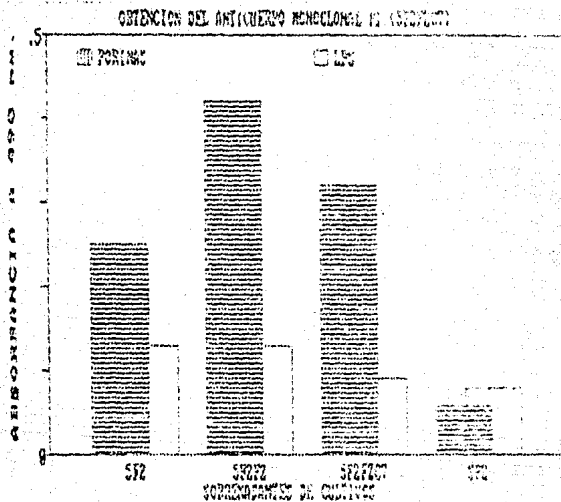


Figura 9. Secuencia de la determinación de anticuerpos en los sobrenadantes, de los híbridos que dieron origen al anticuerpo monoclonal P1.

6.5.-Determinación del Isotipo.

La determinación del isotipo se efectuó mediante la técnica de ELISA. Como se observa en las tabla 1, el anticuerpo monoclonal anti-porinas es de clase IgM.

Tabla 1. Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal anti-porinas.*

	P ₁	Sp2
Anti-Ig's polivalente	0.30 - 0.38	0.02 - 0.03
Anti-Ig M	1.10 - 1.18	0.03 - 0.06
Anti-Ig G	0.02 - 0.02	0.04 - 0.07

* Resultados por duplicado.

6.6.- Especificidad del Anticuerpo Monoclonal.

La especificidad del anticuerpo monoclonal anti-porinas se determinó empleando el método de inmunoelectrotransferencia. En la figura 10 se observa que el monoclonal P₁ solamente reconoce las bandas que corresponden a las proteínas formadoras de poros en el PNC que contenía a todas las PME. (Figura 10)

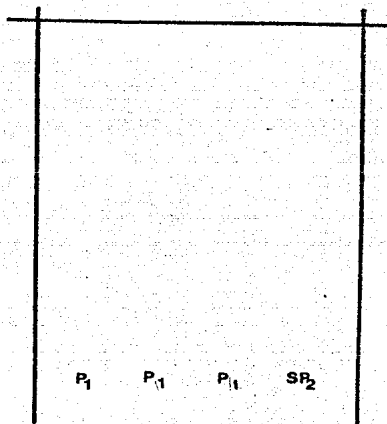


Figura 10. Inmunotransferencia de PME de *S. typhi* 9,12,d.VI revelada con sobrenadante de cultivo de los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal P₁ y SP₂; Sp2 es el sobrenadante de cultivo del mieloma Sp2/0.

6.7.- Purificación del anticuerpo monoclonal Pt a partir de sobrenadantes de hibridomas.

Para ello se realizó un inmunoadsorbente con suero de cabra anti-Fc de IgM de ratón.

En la figura 11 se muestra el isoelectroenfoque del anticuerpo monoclonal Pt purificado (PIP) y de varias muestras.

A) DEM

B) SFB

C) Suero Normal de Raton.

D) Anticuerpo Monoclonal Purificado (PIP).

E) Suero de ratón productor de Líquido Ascítico (SP1A).
(anticuerpo anti-anti idiótipo)

F,G,H) Líquido ascítico de ratón con tumor formado por hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales (P1A).

I) Línea celular de mieloma (SP2).

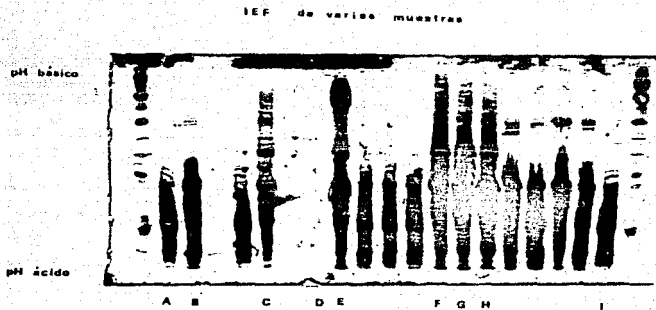


Figura 11.- Isoelectroenfoque del anticuerpo monoclonal purificado (P1P) a partir de sobrenadantes de cultivo del hibridoma productor del anticuerpo P1; SP2 es el sobrenadante de cultivo del mieloma SP2/O.

6.8. Actividad del anticuerpo monoclonal P1P

Una vez puro el anticuerpo monoclonal (del cual se obtuvo 1ml.1 mg), se probó su capacidad de unirse a porinas mediante ELISA (Fig. 12); debido tal vez a las condiciones de purificación, se observa que el monoclonal P1P perdió su capacidad de reconocer al antígeno. Sin embargo como se observa en esa misma figura, el suero de ratones productores de líquido ascítico (SP1A) muestra una notable capacidad de unión a su antígeno comparable a la del líquido ascítico (P1A). El isoelectroenfoque de la fig. 11 también muestra que este suero (SP1A) presenta bandas muy marcadas en la región de la IgG que no están presentes en los sueros normales.

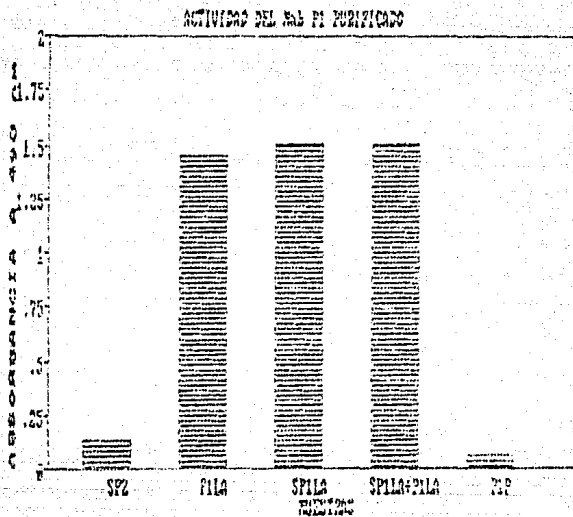


Figura 12. Unión del anticuerpo monoclonal PIP a porinas : en la misma figura se muestra la actividad del líquido ascítico (PILA) y el suero de ratones productores de líquido ascítico (SPILA).

6.9.- Sistema de redes idiotípicas generadas contra el anticuerpo monoclonal P1P.

El hecho de que se observara que el suero del ratón productor de líquido ascítico era capaz de unirse a las porinas y que, además, este mostraba por IEF bandas muy marcadas de IgG's, sugería que se había montado una respuesta inmune contra el anticuerpo monoclonal P1 presente en el líquido ascítico, de esta manera se procedió a montar el experimento de generar redes idiotípicas contra el anticuerpo monoclonal P1, empleando como sistema de detección el radioinmunoanálisis (RIA en fase sólida).

Al suero del ratón productor de líquido ascítico SP1LA (S), el suero de ratón inmunizado con el propio P1P en bazo, ahora denominado Ab3 (3); los sueros de ratones inmunizados con SP1LA en bazo, ahora denominados Ab2 ó Ab4 (4) y el suero de un ratón inyectado con SSF, suero denominado "control" (C), se les determinó su capacidad de unión al antígeno nominal (porinas), además, de que en éste mismo sistema se intentó probar la capacidad de inhibición de la unión de P1LA (P) a las porinas de *S. typhi*. (fig. 13).

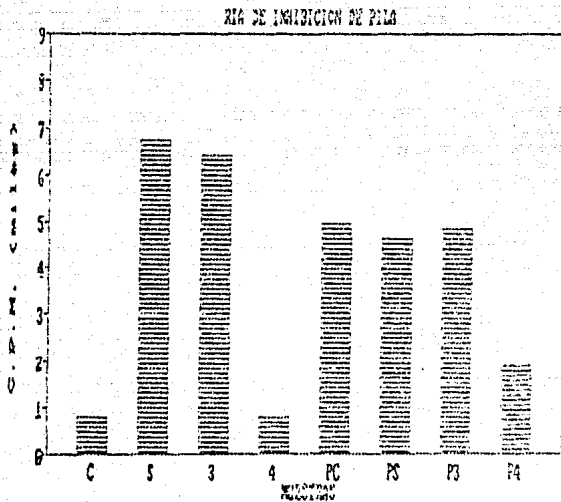


Figura 13. Redes idiotípicas generadas contra el anticuerpo monoclonal P1.

El suero SPILA (S) y el Ab3 (3) son capaces de unirse al antígeno y no así el suero Ab4 (4). Por otra parte, en esta misma figura, se puede observar (en la mitad derecha de la figura), que en la mezcla de P con las demás muestras el suero 4 es el único capaz de interferir la unión de P1LA (P) al antígeno. C es el suero del ratón testigo.

7.0 DISCUSION.

El agente causal de la fiebre tifoidea es la *S. typhi* y se ha demostrado que las proteínas de membrana externa de esta bacteria inducen protección de un 100% al reto de hasta 500 veces la O150 en ratones de la cepa NIH; por otra parte, se observa que en inmunoelectrotransferencia el suero hiperinmune (de conejo anti-PME) reconoce con mayor intensidad las bandas protéicas correspondientes al grupo de PME denominadas porinas (proteínas formadoras de poros). Por ese motivo decidimos obtener anticuerpos monoclonales contra las porinas, en donde la primera etapa de este trabajo consistió en purificar a las porinas, mediante exclusión molecular, la segunda parte en obtener y caracterizar a los anticuerpos monoclonales dirigidos contra esas proteínas y por último la inducción de las redes idiotópicas contra este monoclonal.

Empleando el método de Nikaido, que ha sido utilizado en la purificación de porinas de *Salmonella typhimurium* (44) y que combina la solubilización de las PME con un detergente iónico (SDS) en un amortiguador de fuerza iónica alta (NaCl 0.4 M), se lograron purificar dos proteínas, de peso molecular entre 36 y 38 Kd las cuales, contienen menos de 1% de LPS como contaminante (26). Estas proteínas corresponden a dos porinas de *Salmonella typhi*.

Las porinas purificadas se emplearon para inmunizar ratones de la cepa Balb/c, los cuales respondieron con títulos elevados en contra de la porinas (Abs. = 1.0 dil. 1:400) y aunque el LPS se encontraba en baja concentración en las preparaciones de porinas, también hubo respuesta de anticuerpos en contra de esa molécula (Abs. = 0.6 dil. 1:400). Como se observa, la respuesta contra el LPS, fue menor pero con un valor elevado, debido a que probablemente el LPS forma un complejo de LPS-porinas (acarreador-hapteno) dando como resultado una elevación de la respuesta en contra del LPS. Esta es la razón por la que se obtuvieron hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales anti-porinas y anti-LPS.

El anticuerpo monoclonal anti-porinas reconocen, por inmunotransferencia, a las bandas proteicas correspondientes a las dos porinas. Sin embargo, para establecer la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-porinas, es necesaria la obtención de mapas peptídicos de las porinas purificadas e identificar, por inmunotransferencia, los péptidos que se unen al anticuerpo monoclonales y solo con ello se identificara al epítipo que está siendo reconocido por el monoclonal.

Como se puede ver, los anticuerpos P1 purificados (P1P) perdieron su capacidad de unión al antígeno; sin embargo, cuando se inmunizó con el monoclonal a ratones, el suero de estos fue capaz de reconocer al antígeno y no de bloquear la unión del P1A a las porinas debido a que el anticuerpo P1P perdió actividad, pero no

la capacidad de ser reconocido, de ésta forma indujo la producción de un Ab2 y por encontrarse en una concentración elevada se llegó a una respuesta de tipo Ab3; mas aún, el suero de los ratones productores de P1LA también fue capaz de reconocer al antígeno, teniendo además, un patrón por isoelectroenfoque distinto al observado en sueros de ratones normales; de tal manera que se sugiere que por las dosis altas de P1 se llegó a la inducción de anticuerpos anti-anti-idiotípicos (Ab3). Esta inducción no radica en un idiotipo situado en el sitio activo de P1 sino tal vez en un idiotipo regulatorio no asociado al sitio de combinación del anticuerpo. Por otra parte, debido tal vez a cuestiones óptimas de concentración, el suero del ratón inmunizado con 8P1LA no se unió al antígeno pero si fue capaz de inhibir (en aproximadamente el 40%) la unión de P1LA a las porinas, lo cual sugiere la inducción de un probable Ab4 con características de Ab2 beta (pudiendo existir también Ab2 alfa dado que la inhibición no fue del 100%).

El trabajo realizado, ratifica de una manera gruesa lo observado por otros investigadores, sugiriendo que es posible la obtención de anticuerpos anti-idiotípicos con características de Ab2 β y Ab2 α , los cuales podrían tener aplicaciones variadas como por ejemplo el detectar si la fiebre tifoidea conlleva un idiotipo Ab1 en particular, lo que sería de importancia diagnóstica; otra de las aplicaciones de éstos anti-idiotipos (imágenes del antígeno) sería el inducir inmunidad activa contra un patógeno como es el caso de *S. typhi* en donde las vacunas que se emplean en la actualidad provocan en parte efectos secundarios indeseables como lo es la fiebre (provocada por el LP3), malestar general y además de que no se pueden administrar a infantes.

ESTE TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8.0 CONCLUSIONES.

Las porinas purificadas empleadas para inmunizar ratones inducen la producción de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS, lo anterior se determinó por ensayo de ELISA.

Los anticuerpos monoclonales se elaboraron siguiendo la técnica de fusión de Milstein y Köler y se seleccionaron las clones productoras de anticuerpos anti-porinas por ELISA. También se determinó que el isotipo de los anticuerpos es IgM, su pureza se determinó por IEF y reconocen por inmunotransferencia las bandas correspondientes a las porinas.

Los anticuerpos monoclonales perdieron su capacidad de unión al antígeno porinas al ser purificados.

El hibridoma productor de anticuerpos monoclonales inoculado por vía intraperitoneal a ratones Balb/c, indujo la producción de líquido ascítico denominado P1A y éste se unió al antígeno (porinas) por ELISA. Además el suero de esos ratones productores de líquido ascítico (SP1A) también se une al antígeno y por IEF revela bandas abundantes en la región de IgG.

Se genera un sistema de redes idiotípicas al inocular en bazo de ratones: P1A para obtener SP1A; P1P para obtener el Ab3 y SP1A para obtener el Ab4, usando como control testigo un ratón inoculado con SSF. El sistema fue analizado por RIA.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, E.S. 1966. Proporsal use of a non-motile variant of *Salmonella typhi* for the preparation of vaccine against typhoid fever. Symposio Series in Immunobiological Standardization. 15:79-86.
- 2.- Bragg, P.D. y Hov, C. 1972. Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta. 274:478-488.
- 3.- Bona C. y Moran T. 1985. Idiotypic vaccines. Ann. Inst. Pasteur. 136:299-312.
- 4.- Buchanan, T.M. y Arko, R.J. 1977. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs. J. infect. Dis. 135:879-887.
- 5.- Buchanan, T.M.; Pearce, W.A.; Schoolnick, G.K. y Arko, R.J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified Dii. J. Infect. Dis. 136(supl):132-137.
- 6.- Capra, J.D. 1977. Towards a chemical definition of idiotyp. Fed. Pro. 36:204-206.
- 7.- Chen Szu, S.; Stone, A.L.; Robbins, J.D.; Schneerson, R. y Robbins, J.B. 1987. Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. J. Exp. Med. 166:1510-1524.
- 8.- Davies, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Gingberg, H. S. y Wood, W.B. 1983. Tratado de Microbiología. Ed. Salvat Editores. Barcelona, Esp.
- 9.- Di Rienzo, J.M.; Nakamura, K. e Inouye, M. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. Annu. Rev. Biochem. 47:491-532.
- 10.- Einsenstein, T.K. 1975. Evidence for O antigen as the antigenic in "ribosomal vaccines" prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 12:364-377.
- 11.- Engval, E. y Perlman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochem. 8:674-679.
- 12.- Felix, A.; Krikorian, K.S. y Reitler, R. 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigens in case of typhoid fever and of Vi antibody in their sera. J. Hyg. 35:421-427.
- 13.- Frasch, C.E. y Robbins, J.D. 1978. Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. J. Exp. Med. 147:629-644.
- 14.- Germanier, R. y Furer, E. 1975. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E mutant Ty 21a: Acandidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 131:553-558.
- 15.- Germanier, R. 1977. Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea. Bol. of Sanit. Panam. 82:300-311.
- 16.- Germanier, R. 1986. The live oral typhoid vaccine Ty 21a: Recent field trial results. Sciavo International Conference on Bacterial Vaccines and Local Immunity. Siena, Italy. pp. 10-12.
- 17.- Hancock, K. y Tsang, V.C.W. 1963. Indian ink staining of proteins on nitrocelulose paper. Anal. Biochem. 133:157-162.

- 18.- Hornick,R.B.; Dupont,H.L.; Dawkins,A.T.; Snyder,M.J. y Woodward,T.L. 1968. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Simposio Series in Immunobiological Standardization. 15:143-150.
- 19.- Hornick,R.B.; Greisman,S.E.; Woodward,T.E.; DuPont, H.L.; Dawkins,A.T. y Snyder,M.J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. *Engl. J. Med.* 283:688-691, 739-746.
- 20.- Huckstep,R.L. 1983 Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed. E. y S. Livingstone, Ltd, London. pp. 4-9.
- 21.- Inouye,M. y Yec,M.L. 1973. Homogeneity of envelope proteins of *Escherichia coli* separated by gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 113:304-312.
- 22.- Isibasi,A.; Calva,C.; Ortiz,V.; Fernández,M.; Hernandez,A. y Kumate,J. 1985. Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antigenos de membranas externas. Simposio Avances en el Uso de Vacunas 1985-1985. págs. 109-115. México,D.F.
- 23.- Jerne N.K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Rev. Immunol. (Inst. Pasteur)* 1250:373-389.
- 24.- Johnson,W. 1972. Ribosomal vaccines. Immunogenicity of ribosomal fractions isolated from *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 5:947-952 Johnson,W. 1972.
- 25.- Joo,I. 1982. Present status and perspectives of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b diseases mediated by monoclonal antibody directed against a *Haemophilus* outer membrane protein. *Lancet* 1:366-368.
- 26.- Karkhanis,T.O.; Zeltner,J.Y.; Jackson,J.J. y Carlo,D.J. 1978. A new improved microassay to determine 2-keto 3-deoxy octonate in lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85:595-601.
- 27.- Kohler,H.; Levitt,D. y Bach,M. 1981. A non -galilean view of the immune network. *I. Today* 2:58-60.
- 28.- Kohler,G. y Milstein,C. 1975. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- 29.- Kumate,J. Inmunidad, inmunización y vacunas. Primera edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. 1970 pp.227-247.
- 30.- Kumate,J. 1979 Inmunidad, inmunización y vacunas. Segunda edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. pp. 227-247.
- 31.- Kussi,N.; Nurminen,M.; Saxén,H.; Valtonen,M. y Makela,P.H. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 29:857-862.
- 32.- Kussi,N.; Nurminen,M.; Saxén,H. y Makela,P.H. 1982. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in experimental murine salmonellosis: Effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.
- 33.- Lucmill, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 34.- Levine,M.H.; DuPont,H.L.; Hornick,R.B.; Snyder,M.S.; Woodward,W.; Gilman,H.R. y Libonatti,J.P. 1978. Attenuated, streptomycin dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: Potential deleterious effects of lyophilization. *J. Infect. Dis.* 133:424-429.
- 35.- Littlefield,J.W. 1964. Selection of hybrids from making of fibroblast *in vitro* and their presumed recombinant. *Science* 145:709-710.

- 36.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 37.- Mates, A. y Yosipovici, H. 1976. Localization of the protective antigens in *Salmonella typhimurium*. *Microbios.* 16:81-90.
- 38.- Misfeldt, M.L. y Johnson, W. 1976. Variability of protection in inbred mice induced by a ribosomal vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 14:652-659.
- 39.- Misfeldt, M.L. y Johnson, W. 1977. Role of endotoxine contamination in ribosomal vaccines prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 17:90-104.
- 40.- Misfeldt, M.L. y Johnson, W. 1978. Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 24:808-816.
- 41.- Miura, T. y Mizushima, S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membranes of *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta.* 150:159-161.
- 42.- Molinari, J.L. y Cabrera, R. 1974. Inmunidad inducida con una preparación ribosomal obtenida de *Salmonella typhi* Ty2. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 16:199-204.
- 43.- Molinari, J.L. y Larraalde, C. 1974. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 16:189-197.
- 44.- Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels form bacterial and mitochondrial outer membranes. *forms and phage lambda receptor protein.* *Methods in Enzymology.* 97:85-100.
- 45.- Nikaido, H. and Vaara, M. 1987. Outer membrane in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology.* Washington, D.C.
- 46.- Osborn, M.J.; Gander, J.E.; Parisi, E. y Carson, J. 1972. Mechanism and assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* 247:3962-3972.
- 47.- Osborn, M.J. y Wu, H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:369-422.
- 48.- Paul, W. y Constantine, B. 1982. Regulatory molecules and immune networks: a hypothesis. *I. Today.* 3:230-234.
- 49.- Perez, M.A. y Cabrera, R. 1974. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoidea. *Rev. Salud Pública de México.* XV:185-194.
- 50.- Pfeiffer, R. y Kölle, W. 1896. Ober die spezifische Immunitäts Reaktion der Typhusbazillen. *Z. Hyg. Infekt.-kr.* 21:202-206.
- 51.- Pittman, M. y Bohner, H.J. 1966. Laboratory assays of different types of field trial typhoid vaccines and relationship to efficacy in man. *J. Bacteriol.* 91:1713-1723.
- 52.- Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. *J. Infect. Dis.* 117:101-107.
- 53.- Robbins, J.D. y Robbins, J.B. 1984. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J. infect. Dis.* 150:436-449.

54.- Park, K.H., Monforte, J., Davis, J.M., & Green, G.A.G. 1987. Construction of an extended range-primordial antibody library by electron microreceptor analysis of microheteroduplex antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4981-4985.

55.- Schindler, G.A. 1979. Infectious diseases. Ed. Burgess, Pub. Co. U.S.A. pp. 58-130.

56.- Schindler, G.A. & Seehaus, U. 1978. The major proteins the *Escherichia coli* outer membrane envelope. *Membranes: Heterogeneity of protein* (Ed. Cur. J. Biochem. 83:4-22).

57.- Schindler, G.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by ultracytology and ultracytology. *Journal of Bacteriology* 104:882-889.

58.- Schindler, G.A. 1971. Effect of ethylenediamine, Nitrocellulose, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 104:853-863.

59.- Schindler, G.A. 1974. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 81:443-453.

60.- Schindler, G.A., Kaufmann, J., Wirth, G.C., & Seehaus, U. 1969. Immunocytochemical analysis of membrane antibodies of *Escherichia coli* by electron microscopy. *Journal of Microbiology Methods* 7:293-316.

61.- Smith, R.A. & Siegel, N.O. 1973. Ribonucleic acid protein fractions of *Escherichia coli* *typhimurium* as protective immunogens. *Infect. Immun.* 4:373-383.

62.- Smith, R.A., Siegel, N.O., & Siegel, N.O. 1971. Immunogenicity of a basic protein of *Escherichia coli* *typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 104:161-163.

63.- Towbin, T., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979. Electroblotting: transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.

64.- Tsai, C.M., & Frazer, G.C. 1983. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119:115-119.

65.- Tully, J.G., Daniels, J., & Tigrett, W.O. 1955. Studies on infection and immunity in *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 57:1-14.

66.- Vennerman, M.S., Aronoff, N.J., & Avery, L.J. 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1:74-82.

67.- Wadwan, M.H., Seale, G., & Siegel, N.O. 1971. Serological strain T, 219: oral vaccine against typhoid. Three years' results. *J. Infect. Dis.* 148:293-294.

68.- Warren, J.W. & Honick, R.S. 1979. Immunization against typhoid fever. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 30:407-411.

69.- Weir, D.M. Hand book of experimental immunology. Vol. Immunogenicity. Taylor & Francis, London. Scientific Publications, Oxford, 1986. pp. 34.1 - 34.9.

70.- Woumans, A.S., & Kaufmann, G.P. 1955. Immunogenicity of a ribonucleic acid fraction obtained from *Escherichia coli* *typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 64:40-50.