

83  
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE

*Salmonella typhimurium* A DIFERENTES

LÍNEAS CELULARES EPITELIALES

**TESIS MANCOMUNADA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

P R E S E N T A N :

MARIA DE LOS ANGELES PADILLA MENDOZA

MARIA DE LOURDES PEÑA TORRES



México, D.F.

1995

**FALLA DE ORIGEN**



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.

JURADO ASIGNADO

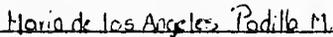
PRESIDENTE: PROF. ELDA BEATRIZ PENICHE QUINTANA  
VOCAL: PROF. RAUL GARZA VELASCO  
SECRETARIO: PROF. EMMA I. MELENDRO LOZANO  
1er. SUPLENTE: PROF. FERNANDO GARCIA TAMAYO  
2do. SUPLENTE: PROF. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

  
DRA. EMMA ISABEL MELENDRO LOZANO

SUSTENTANTES:

  
MARIA DE LOS ANGELES PADILLA MENDOZA

  
MARIA DE LOURDES PEÑA TORRES

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Emma Meléndro, por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo

A Oscar Leyva, por su gran apoyo, paciencia y sobre todo por su amistad.

A todas las personas del Departamento de Medicina Experimental que de una u otra manera colaboraron en la elaboración de esta tesis.

A la UNAM, especialmente a la Facultad de Química por los conocimientos recibidos.

A nuestros profesores por su apoyo y ayuda.

## **DEDICATORIA**

**A mis padres Francisco y Angela por  
apoyarme siempre**

**A Elena, Gaby, Adriana y Eugenia, por  
la alegría y fortuna de ser su hermana.**

**Angeles.**

A mis padres: Fidelity Torres Chávez y Alfonso Peña Ramírez, por el amor y apoyo brindado durante toda mi vida.

A mi hermano Oscar, gracias por tu cariño, paciencia y amistad.

A mis abuelitos: Gabriela, Mateo y Flor.

A Leonor y Martín, con gran afecto por el tiempo compartido.

A Israel con todo cariño, por los grandes momentos que pasamos juntos, por tu ayuda incondicional y por estar conmigo siempre.

Lourdes.

**A Dios, gracias por la vida, por la oportunidad de alcanzar nuestros sueños y por acompañarnos en todo momento.**

**A nuestros amigos: Maby, Tina, Jose E., Ana, Jose V., Israel, y Toño por su agradable compañía y por el camino que recorrimos juntos.**

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>GENERALIDADES</b>	<b>3</b>
Enfermedades producidas	4
Factores de virulencia	5
Respuesta inmune	12
Respuesta inmune humoral	13
<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
Material	15
Equipo	15
Reactivos	16
Medios de cultivo	17
Bacterias	17
Líneas celulares	18
Ensayo de adherencia e invasividad	19
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	20
Tinción del gel	21
Inmunoelectrotransferencia	21
Determinación de pesos moleculares	22
Análisis estadístico	23
<b>RESULTADOS</b>	
Ensayos de adherencia e invasividad	24
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	25
Inmunoelectrotransferencia	25
<b>DISCUSION</b>	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>34</b>

## INTRODUCCION

La gastroenteritis infecciosa, también denominada diarrea infecciosa persiste como el padecimiento que ocasiona mayor morbilidad y mortalidad en el mundo, con mayor incidencia en niños de países en desarrollo como México; sin embargo, en adultos ocurre con una frecuencia mayor a la esperada.

La gastroenteritis por *Salmonella* afecta al hombre a cualquier edad y se adquiere mediante la ingestión de microorganismos contenidos en alimentos y bebidas. Los portadores humanos que manipulan alimentos se consideran el principal reservorio; además, diversos animales de abasto en particular cerdos y gallinas pueden albergar a los microorganismos en su tubo digestivo, pudiendo ser el reservorio y fuente de infección más importante para el ser humano.

De los 2,200 serotipos de *S. enteritidis*, cuatro serotipos: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg* y *S. newport*, originan la mayoría de las infecciones, siendo *S. typhimurium* el agente más aislado en nuestro medio. En México en 1991, se señalaron 72 casos de infecciones por *Salmonella* por cada 100,000 habitantes siendo cinco veces mayor en niños que en sujetos de edad avanzada; la frecuencia también es mayor en adultos de más de 70 años de edad. Parece que en 1992, la incidencia de salmonelosis no tifoídica aumentó, sobre todo en sujetos de 20 a 36 años de edad; sugiriendo que los alimentos ingeridos en esta población son el vehículo más importante (45).

Se han desarrollado sistemas *in vitro* que permiten cuantificar la capacidad de *Salmonella* para adherirse e invadir células epiteliales en cultivo. En estos sistemas se ha observado que la bacteria interactúa con las células epiteliales y penetra en un proceso morfológicamente indistinguible al observado *in vivo*. Además, la capacidad

de diferentes cepas de *Salmonella* para invadir estas células en cultivo, parece correlacionar con su capacidad para invadir la mucosa intestinal *in vivo*.

Por otro lado, se ha encontrado que varias señales ambientales, afectan tanto la capacidad de las bacterias para invadir células epiteliales en cultivo, como la expresión de proteínas que pudieran estar involucradas en este proceso.

En el presente estudio se utilizaron células epiteliales en cultivo para analizar la capacidad invasora de dos cepas F1 y F3 de *S. typhimurium*, que muestran diferencias en su virulencia para el ratón; además se analizó si hay expresión de proteínas inmunogénicas inducibles por señales ambientales que pudieran ser importantes para conferir protección contra la enfermedad.

## GENERALIDADES.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, no capsulados, móviles y no son exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales obteniéndose colonias a las 18 ó 24 horas.

La clasificación del género *Salmonella* se ha simplificado recientemente en tres especies: *S. typhi*, *S. cholerae-suis* y *S. enteritidis*. Las primeras dos especies consisten de un sólo serotipo, mientras que se han descrito 2,200 serotipos diferentes de *S. enteritidis* (45, 49).

El género comprende una gran variedad de serotipos patógenos para el hombre o animales y habitualmente para ambos, causando fiebres entéricas, septicemias y gastroenteritis. El tipo de patología causada depende de la especie bacteriana, de sus serotipos y de la especie infectada (12, 49).

Las salmonellas se caracterizan inmunológicamente en base a tres antígenos de superficie celular, el "O" o de pared celular (somático), el antígeno "H" o flagelar y el antígeno "Vi" (capa de polisacárido externa) que se encuentra únicamente en las cepas de *Salmonella* que causan fiebre tifoidea.

El antígeno "O" está constituido por polisacáridos y forma parte de la endotoxina presente en los microorganismos Gram negativos.

El antígeno "H" o flagelar contiene varios constituyentes inmunitarios; para una misma especie de *Salmonella* los antígenos flagelares pueden presentarse en cualquiera de dos formas llamadas fase 1 o específica y fase 2 o no específica. El antígeno de fase 1 es específico de especie y el de fase 2 es compartido por muchos serotipos. Los microorganismos tienden a mudar de una fase a otra y esto se llama variación de fase.

El antígeno "Vi" de superficie está constituido por subunidades de ácido N-acetilgalactosaminurónico, se denomina factor de virulencia, correspondería a la cápsula de otros microorganismos, está presente solo en algunos de los miembros del género y puede desempeñar un papel en la prevención de la destrucción intracelular de estos microorganismos (12, 26).

### **Enfermedades producidas**

El género *Salmonella* puede causar en el humano gastroenteritis principalmente por *S. enteritidis*, septicemia principalmente causada por *S. cholerae-suis*; también causa fiebres paratifoideas producidas por *S. paratyphi* A, B y C y fiebre tifoidea producida por *S. typhi*.

**Gastroenteritis:** Se presenta después de haber ingerido alimentos contaminados con bacterias que se multiplican y alcanzan un número muy elevado. Tiene un período de incubación de 8-48 horas y entre los síntomas que se presentan están: ligero aumento de la temperatura, náuseas, vómito, diarrea y postración, la recuperación suele lograrse en pocos días (44).

**Septicemia:** La septicemia por *Salmonella* es prolongada y se caracteriza por fiebre, escalofríos, anorexia y anemia. Pueden desarrollarse lesiones focales en cualquier tejido produciendo osteomielitis, neumonía, absesos pulmonares, meningitis o endocarditis. La gastroenteritis es leve o está ausente, y rara vez se aísla al microorganismo en las heces. En este tipo de enfermedad con frecuencia se aísla *S. cholerae-suis* (59).

**Fiebre tifoidea:** La enfermedad usualmente comienza insidiosamente después de un período de incubación de 7-14 días, con malestar general, anorexia, dolor de cabeza seguido por la aparición de fiebre. Los microorganismos ingeridos se

multiplican en el tracto gastrointestinal, particularmente en las placas de Peyer, de donde pasan a la circulación diseminándose por todo el cuerpo, la bilis es un medio de cultivo excelente para *S. typhi*; la capacidad de éste para permanecer en el tracto biliar puede dar como resultado la aparición de portadores crónicos asintomáticos que continuamente excretan al microorganismo en las heces. La fiebre se acompaña generalmente con relativa bradicardia, la postración está usualmente presente, las distensiones son comunes. Pueden estar presentes tos y signos de bronquitis, la esplenomegalia y la leucopenia son frecuentes. En los casos de muerte las lesiones más prominentes encontradas en las autopsias son hipoplasia linfóide, ulceraciones de las placas de Peyer con hemorragias o perforación del intestino (55).

Fiebres paratifoideas: Son parecidas a la tifoidea pero siguen un curso más leve, se caracterizan por un comienzo brusco, después de un período de incubación de uno a diez días con escalofríos y la mayor parte de los síntomas que presenta la tifoidea, pero en grado menor. El curso suele ser más breve y la mortalidad media más baja, pero el único medio seguro de distinguir la tifoidea de la paratifoidea, es aislando e identificando al microorganismo causal (5).

### **Factores de virulencia**

La patogenicidad de muchas bacterias, depende de la producción de toxinas. Entre las endotoxinas más conocidas de las enterobacterias, se encuentra el Lipopolisacárido (LPS), cuyas características y participación en la patogénesis han sido muy estudiadas; el LPS está formado por un componente lipídico denominado lípido "A", moléculas de polisacáridos compuestos de un "core" y cadenas laterales polisacáridicas denominadas Ag. "O". Se sabe por ejemplo que los efectos tóxicos del LPS dependen del componente conocido como lípido "A". El LPS participa de manera importante en la activación de la vía del complemento sérico; esta activación

puede darse: por la llamada "vía alterna" (unión directa a C3) o por la "vía clásica" (unión del lípido "A" del LPS a C1q) (25, 27, 28). Algunas bacterias han desarrollado varios mecanismos para escapar del efecto deletéreo del complemento; en el caso de *Salmonella* se ha visto que las cadenas laterales de polisacárido recubren las moléculas activadoras (12, 37). En estudios realizados con derivados isogénicos de *S. typhimurium*, se observó que los derivados carentes del polisacárido "O" no son virulentos, pueden ser fácilmente fagocitados y activan al complemento, por lo tanto se considera a éste como un determinante de la virulencia en *Salmonella* (25). También se ha demostrado que el polisacárido "O" de *Salmonella* impide que el complejo enzimático final del complemento (complejo de ataque final a la membrana, MAC) se una a la membrana externa de la bacteria imposibilitando su lisis (27, 28).

Otro factor de virulencia aún no muy estudiado, es la producción de exotoxinas por las enterobacterias. *Salmonella* produce una enterotoxina termolábil similar a la toxina colérica (16); sin embargo, Wallis en 1986 (56), no encontró correlación entre la enterotoxigenicidad *in vitro* de *S. typhimurium* y la capacidad para producir enfermedad *in vivo*. Se ha estudiado también el papel de las citotoxinas en la patogénesis de la infección por *Salmonella*, el cual no está del todo claro. O' Brien en 1982 (43) demostró la producción de citotoxinas en *S. typhimurium* y Ketyi en 1979 y Baloda en 1983 (30, 3) en *S. enteritidis*. Se ha observado que estas citotoxinas, actúan inhibiendo principalmente la síntesis de proteínas (31); hasta ahora se cree que estas citotoxinas pueden tener un papel importante en la patogénesis, produciendo daño local a nivel de mucosa intestinal (47). También se ha demostrado que la cantidad de toxina producida por diferentes especies de *Salmonella* puede estar relacionada con su capacidad de producir daño a nivel local (2). En un estudio reciente Reitmeyer y cols. demostraron que la citotoxina de *S. enteritidis*, es un componente de la membrana externa de la bacteria (46).

Los flagelos (antígeno H) de *S. typhimurium* se han involucrado como otro factor de virulencia, ya que le confieren movilidad a la bacteria y adhesión a la célula hospedero. Numerosas investigaciones realizadas *in vitro*, han demostrado que los flagelos parecen ser ventajosos para la bacteria, principalmente en los fenómenos de adherencia e invasión (11, 53); sin embargo, el papel de los flagelos como factor de virulencia *in vivo* permanece menos claro. Carsiotis y cols (10), utilizando cepas isogénicas de *S. typhimurium* Fla25 y motB, observaron *in vitro* su capacidad de sobrevivir en macrófagos y su virulencia en ratón; sus resultados mostraron que las cepas flageladas eran más virulentas para el ratón y tenían mayor capacidad de sobrevivir en macrófagos; sin embargo, también se observó que las cepas no flageladas eran igualmente eficientes en la colonización del tracto digestivo.

Posteriormente Carsiotis (10), describió que adyacente a los genes flagelares (Flg), se encuentra un fragmento cromosómico denominado mviS, este gen se piensa que pudiera ser el responsable de la virulencia *in vivo*. Por otra parte, la movilidad parece ser irrelevante como factor de virulencia e invasividad (39), ya que, cepas móviles de *S. typhimurium* son inmovilizadas por la viscosidad del moco del epitelio gastrointestinal (41) Se puede considerar que los flagelos y la movilidad tienen un papel importante en la capacidad de la bacteria para infectar monocapas celulares *in vitro* (39) pero no se pueden considerar factores de virulencia *per se* en la tifoidea murina.

Debido a que *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, es importante conocer los mecanismos por los cuales evade la acción microbicida de los macrófagos. Buchmeier y Heffron (8) observaron que *S. typhimurium* es capaz de inhibir la fusión fagolisosomal, lo cual depende de la viabilidad del microorganismo; al parecer la opsonización por el suero normal y la presencia de LPS no intervienen en el fenómeno; se ha observado que *Salmonella* se reproduce

preferentemente en fagosomas no fusionados. La capacidad de la bacteria para sobrevivir en los macrófagos está regulada genéticamente, aunque también depende de las células, ya que el crecimiento intracelular es mayor en macrófagos esplénicos que en macrófagos peritoneales (6) Por otro lado, Fields y cols. (15) identificaron un gen de *Salmonella*, asociado a la virulencia y a la capacidad de supervivencia intracelular de esta bacteria; estos investigadores demostraron que este gen tiene un papel importante en la resistencia a defensinas (péptidos microbicidas que se encuentran en neutrófilos y macrófagos) y posiblemente a otros mecanismos microbicidas de los fagocitos.

Una característica común de todas las especies de *Salmonella* es su capacidad de penetrar células epiteliales de la mucosa intestinal después de la ingestión oral. Debido a la importancia central de este proceso, varios laboratorios se han involucrado en el estudio de las bases bioquímicas y genéticas de la invasión de células epiteliales por bacterias del género *Salmonella*. Estudios realizados utilizando mutantes de *S. typhimurium* deficientes en invasividad han indicado que la genética que controla estos procesos es compleja. Se han identificado varios *loci* genéticos: los genes *inv ABC* (21), *inv D* (21), *inv E*(22), *inv FG* (29) e *invH* (1) están localizados al minuto 59 del cromosoma de *S. typhimurium*. Inmediatamente adyacente a esta región, está la región *spa* (24) que contiene por lo menos 6 genes de invasión. Además se ha reportado que mutaciones en un locus *hil*, dan lugar al fenotipo hiperinvasivo de *S. typhimurium* (36).

Debido a la localización cercana en el cromosoma bacteriano de los diferentes genes involucrados en invasividad, se ha sugerido que este proceso, en el caso de *Salmonella*, ocurre por medio de un complejo de invasión que contiene elementos regulatorios, de transporte, de ensamble y estructurales.

Se ha demostrado que las señales ambientales pueden regular coordinadamente los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de las

bacterias. Señales ambientales tales como cambios en la osmolaridad, pH, privación de nutrientes, fase de crecimiento, iones y concentración de dióxido de carbono, actúan como estímulos sensoriales que regulan la expresión de genes que forman parte de una red regulatoria global (13, 42).

En el caso de *Salmonella*, se han reportado varios factores de virulencia cuya expresión está regulada por señales del medio ambiente.

Se ha reportado que la síntesis de aproximadamente 30 proteínas de *S. typhimurium* se induce selectivamente durante la infección de los macrófagos. La expresión de estas proteínas aparentemente está controlada por varios genes reguladores que responden a las diferentes señales ambientales encontradas dentro de los macrófagos. Estas proteínas probablemente le confieren a la bacteria la capacidad de sobrevivir en los macrófagos (7).

Sistemas de captación de hierro: este sistema se caracteriza por la secreción de un sideróforo y la presencia de proteínas de membrana externa involucradas en el transporte del hierro. Este sistema es inducido de una manera coordinada, por el crecimiento de la bacteria en medios de cultivo con concentraciones limitantes de hierro (14).

Los sideróforos son moléculas pequeñas difusibles producidas por muchas bacterias aerobias y facultativas para solubilizar y asimilar el hierro del medio ambiente; pueden ser de dos tipos: hidroximato y fenolato. *S. typhimurium* secreta un sideróforo de tipo fenolato denominado enteroquelina (ENT) o enterobactina (4).

Aunque la cantidad de hierro presente en los fluidos del hospedero es más que suficiente para el crecimiento microbiano, las proteínas unidas al hierro (transferrina y ferritina en el suero, y lactoferrina en secreciones) secuestran esencialmente todo el hierro en estos ambientes. Un mecanismo por el cual un patógeno compete exitosamente con las proteínas unidas al hierro es a través de los sideróforos (16, 52).

Yancey y cols encontraron que la producción de ENT es necesaria para el crecimiento en suero y para la alta virulencia en ratón, y concluyeron que la ENT es un factor de virulencia para *S. typhimurium* ya que la pérdida de la síntesis del sideróforo redujo decisivamente la virulencia de una cepa mutante (58).

Sin embargo, Benjamín y cols (4) al realizar nuevos estudios para determinar la importancia del sideróforo enterobactina producido por *S. typhimurium*, concluyeron que ésta no es importante en la patogénesis de la tifoidea murina y que quizás no sea importante en otras infecciones intracelulares, ya que encontraron que aunque la producción de enterobactina es necesaria para el crecimiento normal en suero de ratón esto no afecta la capacidad de *S. typhimurium* para causar tifoidea murina.

La adherencia e invasión de células epiteliales por *S. typhimurium*, al parecer está influenciada por varios estímulos ambientales tales como: contacto con células epiteliales, concentración de oxígeno, fase de crecimiento y osmolaridad. Finlay y cols reportaron que la invasión de células epiteliales por *Salmonella* es un proceso lento que requiere la síntesis adaptativa de nuevas proteínas inducidas por el contacto entre la bacteria y las células epiteliales (18). Sin embargo, posteriormente este mismo grupo de autores encontró que el crecimiento de *Salmonella* bajo condiciones apropiadas *in vitro*, da como consecuencia la expresión de factores que permiten la adherencia e invasión a células epiteliales. La inducción de la invasión bacteriana no requiere contacto con las células epiteliales, ya que el crecimiento de la bacteria en medio de cultivo de células de mamífero con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, induce la invasividad. La fase de crecimiento bacteriano, y la disponibilidad de oxígeno en el cultivo serían los factores importantes para que la bacteria pueda invadir las células epiteliales ya que la bacteria cultivada en bajas concentraciones de oxígeno fué de 10 a 100 veces más invasiva que la bacteria crecida en condiciones aerobias. Además, se observó una mayor capacidad invasiva de las

bacterias obtenidas durante la etapa de crecimiento logarítmico. Esta capacidad se encontró disminuida en las bacterias obtenidas durante la fase estacionaria del cultivo (35).

Otros autores reportaron datos similares, Ernst y cols (13) obtuvieron un alto grado de invasión con bacterias en fase logarítmica de crecimiento, y concluyeron que esto puede reflejar la necesidad de llevar a cabo síntesis de proteínas a niveles suficientemente altos para invadir eficientemente las células epiteliales. Schieman y Shope (51) reportaron que el crecimiento de *S. typhimurium* en condiciones limitadas de oxígeno resulta en un cambio de expresión de proteínas bacterianas y en una mayor capacidad de las bacterias para invadir células epiteliales en cultivo.

Por el contrario, Kusters y cols (32) no encontraron diferencias significativas en la invasividad de la bacteria en fase logarítmica y estacionaria cuando utilizaron una multiplicidad de infección igual para las bacterias obtenidas de las dos fases de crecimiento y sugieren que las diferencias encontradas por otros investigadores son debidas al inóculo inicial y no a la fase de crecimiento de la bacteria.

Recientemente Ginocchio y cols (23), observaron que el contacto de la bacteria con células del hospedero da como resultado la formación transitoria de apéndices en la superficie de *S. typhimurium* y la activación de la respuesta de las células hospedero dando lugar al plegamiento de la membrana celular y a la subsecuente entrada de la bacteria. Estas estructuras de superficie no se observan en microorganismos que no se han puesto en contacto con las células epiteliales. Las cepas de *Salmonella* con diferentes mutaciones en diversos genes *inv* fueron incapaces de formar el apéndice o no lo retrajeron. En este estudio, adicionaron cloramfenicol bajo condiciones probadas de inhibición de síntesis de proteínas, lo cual no tuvo efecto en la formación de apéndices en la superficie de *S. typhimurium*. Estos resultados sugieren que los componentes estructurales de los apéndices de superficie están disponibles antes del contacto bacteriano con las células epiteliales

y que la interacción entre ellas puede producir una señal para la formación de estos apéndices; por lo que se piensa que hay otro nivel de regulación del fenotipo de invasividad que no requiere la síntesis de proteínas y requiere contacto de los organismos con la célula hospedera. *Salmonella* juega un papel activo en el proceso de entrada, ya que microorganismos muertos por una variedad de métodos incluyendo luz ultravioleta, calor, cloroformo o tratamiento con antibióticos, no fueron capaces de entrar en cultivos epiteliales.

### **Respuesta inmune**

Los mecanismos de defensa desarrollados por el hospedero frente a *Salmonella*, han sido sujeto de los más variados estudios, sin embargo, no se conoce en su totalidad la participación de la respuesta inmune frente a la infección por dicha bacteria. Actualmente existe una amplia variedad de información en muchas ocasiones controvertida. Conforme se desarrolló el estudio de los principales mecanismos involucrados en la inmunología de las infecciones causadas por *Salmonella*, surgieron dos corrientes de pensamiento antagónico: una de ellas planteó la hipótesis de que siendo *Salmonella* un patógeno facultativo intracelular, el hospedero debía desarrollar preponderantemente una respuesta inmune de tipo celular. El otro grupo de investigadores planteó la posibilidad de que la inmunidad humoral pudiera ser la principalmente involucrada en la protección. Conforme se ha estudiado más la participación de la inmunidad frente a *Salmonella* se puede considerar actualmente, que, tanto la respuesta inmune humoral como la celular, son importantes y que ambas intervienen en el desarrollo de una adecuada inmunidad del hospedero frente a este microorganismo.

## Respuesta inmune humoral

Numerosos autores han demostrado que la inmunidad humoral contribuye de manera importante a la defensa del hospedero frente a *Salmonella*. Se realizaron estudios de transferencia pasiva de linfocitos T o B provenientes de animales inmunizados con la bacteria, encontraron que los últimos eran los más importantes para conferir resistencia contra el desafío con *S. typhimurium*, al menos en la etapa temprana de la infección; sin embargo, los linfocitos T eran necesarios para la eliminación de la bacteria de los tejidos del hospedero. Estudios recientes han confirmado que se requieren los dos tipos de linfocitos, T y B, para la protección contra *S. typhimurium* (38).

A pesar de que múltiples trabajos apoyan la importancia de la inmunidad humoral contra *S. typhimurium*, se desconocen en gran parte los antígenos relevantes de *Salmonella* para la inducción de una respuesta protectora. En la mayoría de los estudios se han utilizado extractos antigénicos crudos o un número reducido de antígenos puros como el antígeno "O", "H", "Vi" y recientemente porinas (33). En estos estudios no se ha encontrado una relación entre los títulos de anticuerpos a los antígenos mencionados y la protección a la infección por *S. typhimurium* (38). Esto podría deberse al menos en parte, a que no se ha estudiado la respuesta humoral contra antígenos que son importantes en la virulencia bacteriana, ya que éstos no se expresan en los medios de cultivo bacteriológicos comúnmente utilizados en el laboratorio.

En estudios realizados en el laboratorio, se han utilizado dos cepas de *S. typhimurium* que se aislaron de casos de gastroenteritis humana. La cepa F1 es de baja virulencia para el ratón ( $DL_{50}$  mayor de  $1 \times 10^{11}$ ), mientras que la cepa F3 es virulenta cuando se administra por vía intragástrica ( $DL_{50}$   $2.5 \times 10^7$ ). Se encontró que

la cepa F1 viable administrada por vía intragástrica induce una buena protección al desafío con la cepa virulenta; sin embargo, no se encontró una buena relación con los títulos de anticuerpos dirigidos contra la bacteria completa o un extracto protéico de ésta (9, 38).

En el presente estudio se analizó la capacidad invasora de las cepas F1 y F3 de *S. typhimurium*. Además se analizó si las proteínas de la bacteria cuya expresión es inducible por señales ambientales que afectan la capacidad de invasividad, son inmunogénicas.

### OBJETIVOS

Estudiar la capacidad de adherencia e invasividad *in vitro* de las cepas F1 y F3 de *S. typhimurium* en diferentes líneas celulares epiteliales.

Estudiar si las proteínas de *S. typhimurium* inducidas por señales ambientales, son inmunogénicas.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Material**

Botellas de cultivo.

Cajas de cultivo de 24 pozos.

Cajas Petri de plástico.

Filtros de papel de nitrocelulosa de 0.45 $\mu$ m (Bio-Rad).

Matraces Erlenmeyer de 500ml.

Micropipetas de 10 $\mu$ l, 200 $\mu$ l y 1000 $\mu$ l.

Papel filtro.

Pipetas de 5ml y 10ml.

Pipetas Pasteur.

Tela Scotch-brite 3M.

Tubos de 15ml y 50ml.

### **Equipo**

Cabezal Js 31.1.

Cámara de electroforesis modelo mini protean II (Bio Rad).

Cámara de transferencia (Bio Rad).

Campana de flujo laminar. VECO

Centrífuga Beckman modelo J2-21.

Espectrofotómetro Beckman DU 650.

Estufa bacteriológica. J.M. Ortiz..

Estufa de CO<sub>2</sub> (Napco E series model 302).

Fuente de poder modelo 200/2.0 (bio Rad).

Fuente de poder modelo EPS 500/400 (Pharmacia Fine Chemicals).

### **Reactivos**

4-cloro-Naftol (Sigma Chemical Co.).

Acido acético (J.T. Baker).

Acrilamida (Bio-Rad).

Agua destilada.

Amido negro (Calbiochem).

Aminoácidos esenciales (Gibco Lab.).

Aminoácidos no esenciales (Gibco Lab.).

Anticuerpos peroxidados anti-IgG y anti-IgA de ratón (Zymed Lab. Inc.).

Azul de bromofenol (Bio-Rad).

Azul de Coomassie brillante R-250 (Bio-Rad)

Bicarbonato de sodio (Gibco Lab.)

Cloruro de sodio (J.T. Baker).

Desoxicolato de sodio (Merck).

Etanol (J.T. Baker).

Gentamicina (Lilly).

Glicerol (Bio-Rad)

Glicina (Merck).

Glutamina (Gibco Lab.).

Hepes (Sigma Chemical Co.).

Insulina (Gibco Lab.).

Leche descremada (Nestlé).

Marcadores de pesos moleculares bajos (Bio-Rad).

Metanol (J.T. Baker).  
N,N-bis-metilén-acrilamida (bisacrilamida) (Bio-Rad).  
Peróxido de hidrógeno (Merck).  
Piruvato de sodio (Gibco Lab.).  
SDS (Bio-Rad).  
Suero de ratones inmunizados con *S. typhimurium*.  
Suero fetal bovino (Gibco Lab.)  
Sulfato de amonio (Bio-Rad).  
Temed (Bio-Rad).  
Tris base (Sigma Chemical Co.).  
Tris-HCl (Bio-Rad).

#### **Medios de cultivo**

Agar de soya tripticaseína (AST) (Bioxón de México).  
Caldo de soya tripticaseína (CST) (Bioxón de México).  
Dulbecco's Modified of Eagle's Medium (D-MEM) (Gibco Lab.).

#### **Bacterias**

Se utilizaron dos cepas de *S. typhimurium* serotipo B, denominadas cepa F1 de baja virulencia para el ratón,  $DL_{50}$  mayor de  $10^{11}$  cuando se administran por vía intragástrica (i.g) y la cepa F3 virulenta para el ratón,  $DL_{50}$  de  $2.5 \times 10^7$  bacterias cuando se administran por vía i.g. Ambas cepas fueron donadas por el doctor Leoncio Filloy, del Hospital Infantil de México y presentan las siguientes reacciones bioquímicas típicas de su género:

GLUCOSA	+	ROJO DE METILO	+
LACTOSA	-	VOGES PROSKAUER	-
SULFHIDRICO	+	GELATINA	-
INDOL	-	DESCARBOXILACION	
MOVILIDAD	+	DE LA LISINA	+
CITRATO	+	AMPICILINA	R (F3)
MALONATO	-	AMPICILINA	S (F1)
UREASA	-		

#### **Líneas celulares utilizadas**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares epiteliales:

MDCK: células epiteliales de riñón de perro.

IEC-18: células epiteliales de íleon de rata.

HT-29: células epiteliales de adenocarcinoma de colon humano.

CACO-2: células epiteliales de adenocarcinoma de colon humano.

J-774: células monocito macrófago de ratón.

Las células mencionadas anteriormente se cultivaron en medio D-MEM adicionado con piruvato de sodio al 2.5%, aminoácidos no esenciales al 1.25%, aminoácidos esenciales al 0.5% y glutamina al 1.25% a partir de soluciones concentradas, suero fetal bovino al 10%, bicarbonato de sodio 2g/l y Hepes 10mM.

En el caso de las células MDCK y J774 el medio se adicionó además con insulina al 0.8%, y para las células IEC-18 con insulina al 0.1%.

### **Ensayo de adherencia e invasividad**

Las bacterias utilizadas se obtuvieron de una colonia de *S. typhimurium* F1 y F3 cultivadas en agar de soya tripticaseína (AST) y se sembraron en tubos con 10 ml de caldo de soya tripticaseína (CST) , incubándose durante 18 horas a 37°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos. El botón se lavó tres veces con una solución de Hepes-Hanks por centrifugación como se mencionó previamente; posteriormente las bacterias se resuspendieron en 5ml de Hepes Hanks.

Las diferentes líneas celulares usadas se cultivaron en cajas de cultivo de 24 pozos incubándose a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener una monocapa confluyente; en este momento se lavaron 3 veces con Hepes-Hanks y se añadió 1ml de una dilución 1:200 de la suspensión bacteriana a cada pozo. Los cultivos se incubaron durante 2 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> . Las bacterias que no se adhirieron se eliminaron con una pipeta Pasteur y los pozos se lavaron tres veces con PBS. Las células se lisaron con 1ml de PBS conteniendo desoxicolato de sodio al 0.1%. Se realizaron diferentes diluciones de estas muestras y se sembraron en cajas petri con AST para determinar el número de bacterias que se adhirieron a las células epiteliales; a otros pozos se les añadió 1ml de medio de cultivo D-MEM adicionado con 100 µg/ml de gentamicina para evitar el crecimiento extracelular de las bacterias y se incubaron a diferentes períodos para analizar la invasividad. Al finalizar estos períodos las células se lisaron como se describió previamente y se sembraron varias diluciones para determinar el número de bacterias que fueron capaces de invadir las células epiteliales.

## **Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS**

Se analizó el corrimiento electroforético de las proteínas totales obtenidas de *Salmonella typhimurium* crecidas en: a) caldo de soya tripticaseína incubadas 18 horas a 37° C. b) medio D-MEM incubadas 18 horas a 37°C con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. c) Proteínas de las bacterias que fueron capaces de invadir células Caco-2 en cultivo.

Las bacterias se ajustaron a una densidad óptica de 0.2 a 560 nm, de esta suspensión se tomaron 0.5 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos.

La electroforesis de las muestras se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli (34). Se utilizó un gel concentrador al 4.8%, el cual contenía acrilamida al 30%, N,N-bis-metilen-acrilamida (bis-acrilamida) al 0.8%, tris-HCl 0.5M pH 6.8 y SDS al 10% y un gel separador al 10% con acrilamida al 30%, bis-acrilamida al 0.8%, tris-HCl 1.5M pH 8.8 y SDS al 10%, ambos geles se polimerizaron con sulfato de amonio y temed. Las muestras de los antígenos se resuspendieron en 20 µl de una mezcla de tris-HCl 0.5M, pH 6.8, SDS al 10%, glicerol al 10%, y azul de bromofenol. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares bajos, los cuales se resuspendieron y usaron de acuerdo a las especificaciones de la marca. El gel conteniendo las muestras de la bacteria y de los pesos moleculares se colocó en la cámara de electroforesis en presencia de un amortiguador de tris 0.2M, glicina 0.152M y SDS al 0.1%. El corrimiento se realizó durante 90 minutos a 20 miliAmp, con la fuente de poder.

## **Tinción del gel**

Azul de Coomassie. El gel se cubrió con una solución de azul de Coomassie brillante al 0.1% en etanol 10%, ácido acético 10% y metanol al 30% durante 12 horas a temperatura ambiente. Se retiró posteriormente esta solución y el gel se lavó con una solución de ácido acético al 10% hasta observar el patrón de corrimiento.

## **Inmunoelectrotransferencia**

Separados los antígenos de la cepa F3 por electroforesis según el método ya descrito, se procedió a transferir las proteínas del gel a un filtro de papel de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ , según el método de Towbin (54), para ello se utilizó una cámara de transferencia, con la siguiente distribución: el papel de nitrocelulosa hacia el cátodo y el gel SDS-PAGE hacia el ánodo, ambos cubiertos con tela Scotch-brite y papel filtro. La transferencia se realizó en presencia de un amortiguador de tris-base 20mM, glicina 150mM y metanol al 20%, por 1 hora a 4°C a 0.35Amper, con la fuente de poder.

Al término de la transferencia, el filtro de papel de nitrocelulosa se tiñó de manera reversible con amido negro al 0.1% y ácido acético al 0.5% y destiñó con H<sub>2</sub>O. Las tiras de papel de nitrocelulosa con el antígeno transferido se lavaron con una solución de tris-HCl 10mM, NaCl 150mM (TBS) y se bloquearon con una solución de leche descremada al 5%-TBS (TBSL) pH 7.4 por 12 horas. Las tiras ya bloqueadas, se lavaron por 5 minutos con TBS y se incubaron con 1ml de la dilución adecuada del suero de ratones inmunizados con *S. typhimurium* durante 12 horas a 4°C; posteriormente las tiras se lavaron dos veces durante 5 minutos con TBS y se incubaron nuevamente 12 horas a 4°C con 1ml de anticuerpos peroxidados anti IgG

y anti IgA de ratón diluidos en TBSL. Transcurrido este tiempo se lavaron las tiras tres veces durante 10 minutos en TBS y 5 minutos en una solución de tris-HCl 10mM pH 6.8 (TB) y posteriormente se revelaron con una solución de 4-cloro-naftol al 0.3%, metanol 1vol en 4 vol de TB y 0.33  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por ml de la solución. La reacción se bloqueó con H<sub>2</sub>O.

### **Sueros**

Para las pruebas de inmunoelectrotransferencia, se utilizó una mezcla de sueros de ratones balb/c que se inmunizaron con tres dosis de *S. typhimurium* F1 viable administrada por vía i.g. y desafiados con la cepa F3 (9).

### **Determinación de pesos moleculares**

La determinación de pesos moleculares tanto para el corrimiento electroforético del antígeno como para las bandas reconocidas en la inmunoelectrotransferencia, se realizó mediante el método de Weber y Osborn (57). En base a marcadores de peso molecular conocido, se calculó la distancia de migración de cada banda entre la distancia total de migración (rf), posteriormente se graficó el logaritmo del peso molecular contra el rf correspondiente, el valor del antilogaritmo determinó el peso molecular de cada banda. Las distancias de las bandas problema se analizaron de la misma forma, mediante la prueba de análisis de regresión. Los marcadores utilizados contienen fosforilasa b (97,400 Da), albúmina sérica bovina (66,200 Da), ovoalbúmina (42,699 Da), anhidrasa carbónica (31,000 Da), inhibidor de tripsina (21,500 Da), lisozima (14,400 Da).

## Análisis estadístico

Para analizar los resultados de los experimentos de adherencia e invasividad se utilizó la prueba estadística t de Student de la siguiente manera:

Con los datos obtenidos a partir de los ensayos de adherencia e invasividad para cada una de las líneas celulares utilizadas, se calculó el promedio y la desviación estándar y se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n} + \frac{s_2^2}{n}}}$$

en donde n= número de datos,  $\bar{x}_1$ = media de los valores obtenidos con la cepa F1,  $\bar{x}_2$ =media de los valores obtenidos con la cepa F3, s= desviación estándar, con g.l.=  $n_1 + n_2 - 2$ , y  $p= 0.05$  se obtiene la t teórica.

Si la t teórica es mayor que la t experimental la diferencia no es significativa.

Para la determinación de los pesos moleculares de las bandas obtenidas se determinó la ecuación que relacionara la distancia de migración (rf) y el peso molecular de cada una de las bandas de los marcadores; una vez obtenida dicha ecuación se sustituyó en (x) el valor de rf de cada una de las bandas problema.

La ecuación utilizada es la siguiente:  $y= mx+b$ ,

en donde  $y=\log.$  del peso molecular,  $m$ =pendiente,  $b$ =ordenada al origen,  $x=rf$  de la banda problema.

## RESULTADOS

### Ensayos de adherencia e invasividad

La adherencia e invasividad de las dos cepas de *S. typhimurium* F1 y F3 en diferentes líneas de células epiteliales se muestra en las tablas 1-4. Tanto la adherencia como la invasividad de las dos cepas bacterianas F1 y F3 fueron muy similares, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre estas dos cepas cuando se utilizaron las líneas epiteliales intestinales IEC-18, HT-29 y Caco-2 tablas 1-3. Cuando se utilizó la línea MDCK con más de 40 pases *in vitro*, la adherencia de las dos cepas fue muy similar pero se encontraron marcadas diferencias en cuanto a la invasividad; la cepa F3 mostró una capacidad invasora de 100 a 1,000 veces mayor que la cepa F1 (tabla 4). Sin embargo, cuando se utilizó la línea celular MDCK con 4 a 8 pases *in vitro*, se encontró que las diferencias en cuanto a la invasividad no fueron significativas (tabla 5).

La capacidad de las dos cepas bacterianas para sobrevivir intracelularmente en la línea de macrófagos J774 se muestra en la tabla 6; tanto la cepa F1 como la F3 sobrevivieron de manera similar durante las cinco horas del ensayo.

**TESIS SIN PAGINACION**

**COMPLETA LA INFORMACION**

TABLA 1. ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE LAS CEPAS F1 Y F3 DE *S. typhimurium* EN CELULAS IEC-18.

Log. del número de bacterias/ pozo<sup>a</sup>

Cepa de <i>S. typhimurium</i>	Inóculo	Adherencia	Invasividad <sup>b</sup>	
			2hr	4hr
Exp.1				
F1	6.47	5.56 ± 0.098	3.30 ± 0.194	3.48 ± 0.159
F3	6.47	5.75 ± 0.122	3.69 ± 0.151	4.18 ± 0.100
Exp.2				
F1	7.04	5.60 ± 0.049	4.24 ± 0.187	4.13 ± 0.122
F3	6.90	5.54 ± 0.077	4.22 ± 0.066	4.30 ± 0.038

a. Los valores representan el promedio ± D.E. de las muestras por triplicado.

b. Tiempo transcurrido a partir de que se añadió la gentamicina a los cultivos.

TABLA 2. ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE LAS CEPAS F1 Y F3 DE *S. typhimurium* EN CELULAS HT-29.

Log. del número de bacterias/ pozo<sup>a</sup>

Cepa de <i>S. typhimurium</i>	Inóculo	Adherencia	Invasividad <sup>b</sup>	
			2hr	4hr
Exp. 1				
F1	6.96	5.89 ± 0.045	4.47 ± 0.074	4.39 ± 0.231
F3	6.69	6.07 ± 0.135	4.57 ± 0.163	4.84 ± 0.065
Exp. 2				
F1	6.69	5.44 ± 0.054	3.69 ± 0.073	3.76 ± 0.061
F3	6.54	5.37 ± 0.019	4.25 ± 0.071	4.66 ± 0.042

a. Los valores representan el promedio ± D.E. de las muestras por triplicado.

b. Tiempo transcurrido a partir de que se añadió la gentamicina a los cultivos.

TABLA 3. ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE LAS CEPAS F1 Y F3 DE *S. typhimurium* EN CELULAS CACO-2

Log. del número de bacterias/ pozo<sup>a</sup>

Cepa de <i>S. typhimurium</i>	Inóculo	Adherencia	Invasividad <sup>b</sup>	
			2hr	4hr
Exp. 1				
F1	6.74	5.49 ± 0.139	4.68 ± 0.085	5.20 ± 0.023
F3	6.73	5.53 ± 0.049	5.20 ± 0.292	5.43 ± 0.218
Exp. 2				
F1	6.50	6.11 ± 0.024	5.26 ± 0.138	5.22 ± 0.123
F3	6.50	6.39 ± 0.044	5.68 ± 0.049	5.60 ± 0.087

- a. Los valores representan el promedio ± D.E de las muestras por triplicado.  
 b. Tiempo transcurrido a partir de que se añadió la gentamicina a los cultivos.

TABLA 4 ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE LAS CEPAS F1 Y F3 DE *S.typhimurium* EN CELULAS MDCK CON MAS DE 40 PASES *IN VITRO*

Log. del número de bacterias/pozo<sup>a</sup>

Cepa de <i>S.typhimurium</i>	Inóculo	Adherencia	Invasividad <sup>b</sup>	
			2 hr	4 hr
Exp. 1				
F1	7.72	5.11 ± 0.125	3.21 ± 0.052 <sup>xc</sup>	2.28 ± 0.147 <sup>x</sup>
F3	7.64	-	5.30 ± 0.025	5.36 ± 0.139
Exp. 2				
F1	6.17	4.91 ± 0.079	2.11 ± 0.141 <sup>x</sup>	1.96 ± 0.259 <sup>x</sup>
F3	6.69	4.91 ± 0.080	5.07 ± 0.065	5.11 ± 0.055
Exp. 3				
F1	6.87	6.36 ± 0.423	2.27 ± 0.220 <sup>x</sup>	2.60 ± 0.155 <sup>x</sup>
F3	6.47	5.20 ± 0.343	4.27 ± 0.030	4.70 ± 0.021

- a. Los valores representan el promedio ± D.E. de las muestras por triplicado  
b. Tiempo transcurrido a partir de que se añadió gentamicina  
c. P < 0.05 por la t de student

TABLA 5. INVASIVIDAD DE LAS CEPAS F1 Y F3 DE *S.typhimurium* EN CELULAS MDCK CON 4-8 PASES *IN VITRO*

Log. del número de bacterias/pozo<sup>a</sup>

Cepa de <i>S.typhimurium</i>	Inóculo	Invasividad <sup>b</sup> 4 hr
Exp. I		
F1	6.81	4.69 ± 0.100
F3	6.84	5.41 ± 0.115
Exp.2		
F1	6.87	5.79 ± 0.205
F3	7.04	5.91 ± 0.165

a. Los valores representan el promedio ± D.E. de las muestras por triplicado.

b. Tiempo transcurrido a partir de que se añadió la gentamicina a los cultivos.

TABLA 6. CAPACIDAD DE LAS CEPAS F1 Y F3 DE *S. typhimurium* PARA SOBREVIVIR INTRACELULARMENTE EN LA LINEA DE MACROFAGOS J774

Log. del número de bacterias/ pozo<sup>a</sup>

Cepa de <i>S. typhimurium</i>	Inóculo	Sobrevivencia bacteriana	
		30min	5hr <sup>b</sup>
<b>Exp.1</b>			
F1	6.95	5.59 ± 0.234	6.01 ± 0.203
F3	6.74	5.63 ± 0.105	6.38 ± 0.096
<b>Exp.2</b>			
F1	6.90	5.47 ± 0.054	5.23 ± 0.820
F3	6.97	5.56 ± 0.147	5.53 ± 0.166
<b>Exp.3</b>			
F1	7.11	5.97 ± 0.046	6.27 ± 0.029
F3	7.09	6.23 ± 0.083	6.30 ± 0.630

- a. Los valores representan el promedio ± D.E de las muestras por triplicado.  
b. Tiempo transcurrido a partir de que se añadió la gentamicina a los cultivos.

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS**

En la figura 1 se muestra el corrimiento electroforético de las proteínas de *S. typhimurium* crecida en CST y en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>. Como se puede observar con el crecimiento de la bacteria en medio D-MEM se induce la expresión de varias proteínas que no se expresan, o se expresan en menor proporción cuando la bacteria se crece en medio CST. Por el contrario, la expresión de otras proteínas se ve claramente disminuida. En la tabla 7 se muestran los pesos moleculares de las principales proteínas de *Salmonella* cuya expresión cambió notablemente cuando la bacteria se creció en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>.

En la figura 2 se muestra la comparación entre proteínas de la bacteria crecida en CST y las bacterias que invadieron las células epiteliales; se observó una sobreexpresión de las proteínas con pesos moleculares de 32, 33, 37 y 42 kDa. Sin embargo, debido a que la recuperación de bacterias en los ensayos de invasividad es baja, se dificultó observar claramente las proteínas expresadas.

## **Inmunoelectrotransferencia**

Para determinar si las proteínas de *Salmonella* inducidas por el crecimiento en medio D-MEM-CO<sub>2</sub> son inmunogénicas; se realizó una inmunotransferencia utilizando una mezcla de sueros de los animales inmunizados. Como se puede observar se reconocieron múltiples componentes de la bacteria (figura 3).

Debido a que se utilizó un extracto total de la bacteria y la reactividad a muchas proteínas puede estar enmascarada por la respuesta al LPS, se hicieron múltiples adsorciones de la mezcla de sueros con el extracto de proteínas de la

bacteria crecida en CST; esto nos permitió observar más claramente la presencia de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la bacteria que se inducen por el proceso de invasión, o el crecimiento en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>. Se encontró una respuesta de anticuerpos de clase IgG contra proteínas de 29, 32, 37 y 160 kDa, obtenidas de las bacterias que invadieron las células epiteliales. Esta reactividad no se observa o es muy tenue, con las proteínas obtenidas de la bacteria crecida en CST. En el caso de las bacterias crecidas en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>, la reactividad fue muy parecida a la observada con las proteínas que invadieron las células epiteliales, sin embargo se encontró además reactividad contra una proteína de 56 kDa.(figura 4)

En el caso de anticuerpos de clase IgA las proteínas reconocidas principalmente, obtenidas tanto de las bacterias que invadieron, como de las crecidas en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>, tienen un peso molecular de 32, 37 y 65 kDa (figura 5).

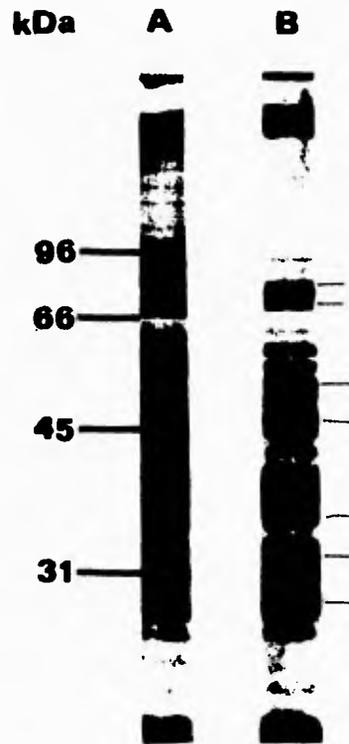


Fig 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS 10% teñido con azul de Coomassie A. proteínas totales de *S. typhimurium* F3 crecida en CST B. proteínas totales de *S. typhimurium* F3 crecida en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>.

FALLA DE ORIGEN

TABLA 7. CAMBIO DE EXPRESION DE PROTEINAS DE *S. typhimurium* PRODUCIDO POR EL CRECIMIENTO DE LA BACTERIA EN MEDIO D-MEM-CO<sub>2</sub>

Proteínas cuya expresión se induce o aumenta kDa	Proteínas cuya expresión disminuye kDa
77	94
67	66
56	62
51	45
37	
32	
29	

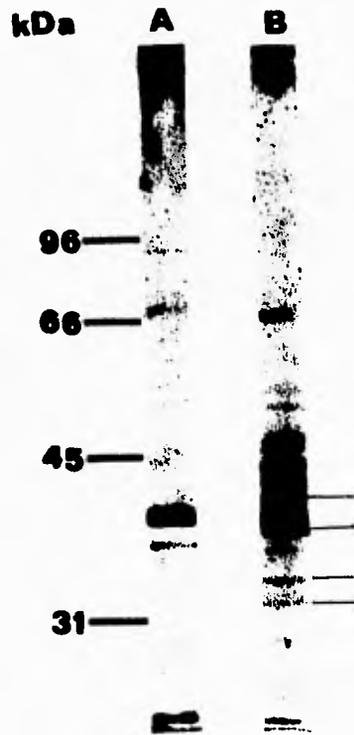


Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10% teñido con azul de Coomassie. A. Proteínas totales de *S. typhimurium* F3 crecida en CST. B. Proteínas totales de *S. typhimurium* F3 que invadieron células Caco-2 *in vitro*.

FALLA DE ORIGEN

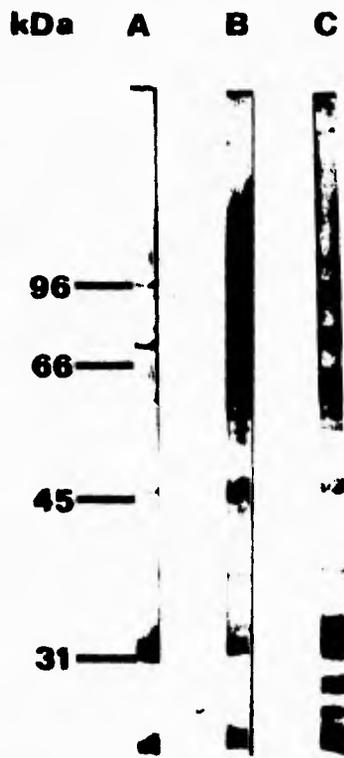


Fig. 3. Reactividad por inmunoelectrotransferencia de anticuerpos IgG en el suero de ratones inmunizados con *S. typhimurium* contra las proteínas de A. *S. typhimurium* crecida en CST. B. *S. typhimurium* que invadió células Caco-2 *in vitro*. C. *S. typhimurium* crecida en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>.

FALLA DE ORIGEN



Fig. 4. Reactividad por inmunoelectrotransferencia de anticuerpos IgG en el suero de ratones inmunizados con *S. typhimurium*, adsorbido con las proteínas de la bacteria crecida en CST. A. *S. typhimurium* crecida en CST. B. *S. typhimurium* que invadió células Caco-2 *in vitro*. C. *S. typhimurium* crecida en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>

FALLA DE ORIGEN

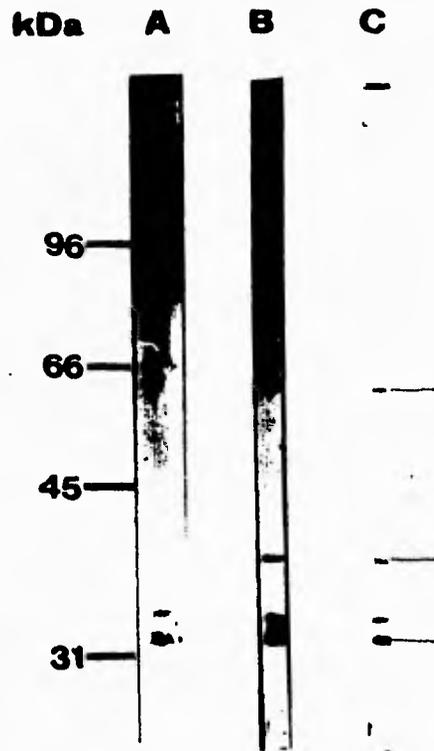


Fig. 5. Reactividad por inmunoelectrotransferencia de anticuerpos IgA en el suero de ratones inmunizados con *S. typhimurium*, adsorbidos con las proteínas de la bacteria crecida en CST. A. *S. typhimurium* crecida en CST. B. *S. typhimurium* que invadió células Caco-2 *in vitro*. C. *S. typhimurium* crecida en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>

FALLA DE ORIGEN

## DISCUSION

*S. typhimurium* al igual que otras bacterias enteropatógenas invasivas, inicia la infección al hospedero después de la ingestión oral, pasa por el lumen intestinal para alcanzar sitios más profundos; el sitio inicial de infección de *Salmonella* es el ileon distal donde se asocia con células epiteliales y células M de placas de Peyer adyacentes. La interacción entre el hospedero y el patógeno durante la enfermedad es un proceso dinámico en donde las estrategias del microorganismo para sobrevivir y multiplicarse enfrentan a las defensas del sistema inmune (22, 35, 50).

El contacto entre la bacteria y las células epiteliales ocasiona cambios en la célula epitelial, incluyendo la disrupción del borde en cepillo celular, la fosforilación de proteínas, la movilización de calcio y la movilización de actina. Como consecuencia de estos eventos celulares, *Salmonella* es internalizada por la célula epitelial dentro de una vacuola en un proceso parecido a la fagocitosis. Aparentemente, la interacción extracelular con *Salmonella* provoca la transducción de una señal en la célula epitelial la cual inicia cambios celulares y permite la invasión bacteriana.

Los cultivos de células animales son modelos muy usados para el estudio de la adhesión e invasión de *S. typhimurium* en células epiteliales, en donde la bacteria interactúa con ellas y penetra en las células en un fenómeno morfológicamente indistinguible del observado *in vivo* (35). Usando estos sistemas *in vitro* se encontró que el hospedero participa activamente en el proceso; se observa un plegamiento en la membrana en el sitio de entrada de la bacteria y un cambio en las proteínas asociadas al citoesqueleto, como alfa-actina, tropomiocina, ezrina y talina, lo cual puede deberse a señales transmitidas por la bacteria hacia la célula infectada (48).

Se ha reportado que el proceso de invasividad por *Salmonella* se puede dividir en dos etapas: adherencia y penetración. Los factores de *Salmonella* involucrados en estas dos etapas son diferentes, ya que mutantes de *Salmonella* con alteraciones en varios de los genes de invasividad, aunque mostraron deficiencias en la penetración de células epiteliales se adhirieron eficientemente a estas células (32).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de adherencia e invasividad de las cepas F1 y F3 de *S. typhimurium* cuando se utilizaron las células Caco-2, IEC-18 y HT-29. Sin embargo, cuando se utilizaron células MDCK con más de 40 pases *in vitro*, la cepa F3 fue significativamente más invasiva que la cepa F1. Esta diferencia no se observó cuando se utilizaron células MDCK que tenían sólo de 4 a 8 pases de cultivo *in vitro*.

El proceso de invasión de células epiteliales por *Salmonella* requiere de la participación activa tanto de la bacteria como de las células. Debido a la gran cantidad de genes identificados (por lo menos 14) que intervienen en el mecanismo de invasividad, se ha sugerido que *Salmonella* puede utilizar mecanismos alternos de invasión. Es probable que la cepa F1 utilizada en este estudio, sea deficiente en alguno de estos mecanismos y que los múltiples pases de las células MDCK *in vitro* hayan alterado alguna propiedad de las células MDCK, dando como resultado que la eficiencia de invasión de la cepa F1 sea menor.

Se ha reportado que la capacidad de las cepas de *Salmonella* para invadir células epiteliales en cultivo correlaciona con su capacidad para invadir la mucosa intestinal *in vivo* (35).

El estudio de los mecanismos de invasión por *Salmonella*, involucra la identificación y caracterización de mutantes que presentan una capacidad alterada para invadir células epiteliales en cultivo. Estas mutantes de invasión se han

seleccionado y estudiado, utilizando una gran variedad de líneas epiteliales en cultivo, incluyendo HEp 2, Henle 407, Caco y MDCK.

Sin embargo, se debe tener precaución en la interpretación de estos estudios *in vitro* en cuanto a su significado biológico (sobre todo si se utiliza una sola línea celular); ya que se ha encontrado que algunas mutantes de *Salmonella cholerae-suis* deficientes en su capacidad para invadir células MDCK *in vitro*, fueron tan virulentas como la cepa parental cuando se administraron por vía oral a ratones (19, 40). También se ha reportado que la capacidad invasiva de algunas cepas de *Salmonella* puede ser diferente si se utilizan células MDCK con diferentes números de pases en cultivo (35).

La cepa F1 es muy poco virulenta para el ratón cuando se administra por vía i.g.  $DL_{50} > 10^{11}$ ; por el contrario, la cepa F3 es altamente virulenta  $DL_{50} = 10^3$  (9). Los resultados encontrados en el presente estudio indican que esta diferencia en la virulencia entre las dos cepas, probablemente no se debe a su capacidad para invadir la mucosa intestinal, ya que las dos cepas invaden de manera similar las células epiteliales estudiadas, con excepción de las células MDCK con más de 40 pases *in vitro*. Además, se encontró que cuando las bacterias se administraron por vía i.g. a ratones, se aisló una cantidad similar de bacterias de las dos cepas a partir de las placas de Peyer de los animales infectados (9).

Debido a que *S. typhimurium* es una bacteria intracelular facultativa, la capacidad para sobrevivir en los macrófagos constituye un mecanismo de virulencia importante. La línea celular de macrófagos J774, se ha usado para el aislamiento de mutantes de *S. typhimurium* deficientes en su capacidad para sobrevivir en los macrófagos (8). Debido a que estas mutantes se comportan de manera similar en las células J774 y en macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones normales, se ha sugerido que probablemente las células J774 contienen productos microbicidas similares a los de los macrófagos peritoneales (6, 20).

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de sobrevivencia de las bacterias de la cepa F1 y F3 utilizando esta línea celular. Sin embargo, no se puede descartar totalmente que la diferencia en la virulencia de estas dos cepas observadas *in vivo*, puedan deberse por lo menos en parte a diferencias en la resistencia a sobrevivir intracelularmente en macrófagos; ya que se ha reportado que *S. typhimurium* sobrevive mejor en los macrófagos esplénicos del ratón. Esta capacidad para sobrevivir mejor en los macrófagos del bazo puede contribuir a la severidad de la infección en vivo, ya que el bazo es uno de los principales órganos donde *Salmonella* se replica. La falta de eficacia de los macrófagos del bazo comparados con los peritoneales para controlar infecciones intracelulares no es una característica generalizada, ya que se ha reportado que *Toxoplasma gondii* se multiplica mejor en los macrófagos peritoneales (6). Se conoce poco sobre los mecanismos microbicidas de los macrófagos que son efectivos contra *Salmonella* pero se ha sugerido que éstos pueden variar dependiendo de los tejidos de donde provengan.

Por otro lado, las diferencias en la virulencia de las dos cepas F1 y F3 de *S. typhimurium* podrían deberse a otros factores, como por ejemplo la susceptibilidad a la lisis por complemento (25, 27, 28, 37).

En estudios anteriores se encontró que la administración por vía i.g. de bacterias viables de la cepa F1 de *S. typhimurium* indujo protección contra el desafío con la cepa virulenta F3; sin embargo, no se encontró una relación entre los títulos de anticuerpos séricos o anticuerpos de fluido intestinal y la protección obtenida. Aunque se conoce que los anticuerpos juegan un papel importante en la protección contra *S. typhimurium*, no se ha encontrado una buena relación entre los títulos de anticuerpos dirigidos contra varios antígenos de *Salmonella* y la protección inducida (38). Esto podría deberse a que muchos de los factores importantes involucrados en

la virulencia bacteriana, no se expresan en las bacterias crecidas en los medios de cultivo utilizados de rutina en los laboratorios, para la obtención de antígenos.

Finlay y cols (18) reportaron que bacterias como *S. cholerae-suis* que invadieron células epiteliales en cultivo, expresan proteínas diferentes a las de las bacterias crecidas en medios bacteriológicos. Estas proteínas podrían ser las mismas a las expresadas por las bacterias crecidas en medios de cultivo de células de mamíferos con atmósfera de CO<sub>2</sub> (35); debido a que las bacterias crecidas en estas condiciones son altamente invasivas, se ha sugerido que estas proteínas podrían ser importantes en el proceso de invasividad.

Cuando se compara el patrón electroforético de las proteínas de *S. typhimurium* F3 crecidas en medio D-MEM-CO<sub>2</sub> con las expresadas por las bacterias crecidas en medio CST, se observa que las bacterias crecidas en D-MEM sobreexpresan proteínas (29, 32, 37, 51, 56, 67 y 77 kDa) de pesos moleculares similares a los reportados por Finlay y col para *S. cholerae-suis*. La mayoría de las proteínas expresadas por las bacterias que invadieron parecen ser las mismas que las expresadas por las bacterias crecidas en D-MEM. El que los pesos moleculares de las proteínas expresadas en *S. typhimurium* y los reportados por Finlay y cols (18) para *S. choleraesuis* sean similares, no es un hecho inesperado ya que se ha reportado que hay un alto grado de homología en el ADN de los genes *inv* para todas las especies y serotipos de *Salmonella*.

Los resultados de la inmunotransferencia mostraron que los anticuerpos de animales inmunizados con la bacteria viable reconocen varias de las proteínas expresadas preferentemente de las bacterias que invadieron o que se crecieron en condiciones que favorecen la invasividad. Ya que los animales fueron inmunizados con la bacteria crecida en medio CST, estos resultados demuestran que la bacteria viable expresa estas proteínas *in vivo* en los animales infectados.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre la cepa F1 y F3 de *S. typhimurium* en cuanto a su capacidad invasiva, o de sobrevivencia en la línea de macrófagos J774, que expliquen las diferencias de virulencia observadas *in vivo*. Se encontraron diferencias en la expresión de proteínas de las bacterias capaces de invadir células epiteliales *in vitro* y se demostró que estas proteínas son inmunogénicas. Es probable que los anticuerpos dirigidos contra estas proteínas jueguen un papel importante en la protección contra *S. typhimurium*.

## CONCLUSIONES

- 1.- No se encontraron diferencias entre la adherencia e invasividad a células epiteliales de las dos cepas de *S. typhimurium*.
- 2.- No se encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de sobrevivencia de las dos cepas en la línea de macrófagos J774.
- 3.- Se encontró un cambio en la expresión de proteínas de las bacterias que invadieron las células epiteliales y las crecidas en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>, en comparación con las expresadas por las bacterias crecidas en medio de cultivo bacteriológico.
- 4.- Varias de las proteínas inducidas son inmunogénicas.
- 5.- La mayoría de las proteínas inducidas (por crecimiento en medio D-MEM-CO<sub>2</sub> o por el proceso de invasividad) que fueron inmunogénicas, parecen ser las mismas.
- 6.- Las bacterias que invadieron expresan dos proteínas de 33 y 42 kDa que no se expresan ni en las bacterias crecidas en medio D-MEM-CO<sub>2</sub>, ni en las crecidas en medio bacteriológico. Estas proteínas no fueron inmunogénicas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Altmeyer R.M., McNern J.K., Bossio J.C., Rosenshine I., Finlay B. B., Galán J.E. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 7: 89-98. 1993.
2. Ashkenazi S., Cleary T., Murray B., Wanger A., Pickerin L. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains . *Infect Immun.* 56: 3089-3094. 1988.
3. Baloda S.B., Faris A., Krovacek K., Wadstrom T. Cytotoxic enterotoxins and cytotoxic factors produced by *S. enteritidis* and *S. typhimurium* . *Toxicon* 21: 785-790. 1983.
4. Benjamin W.H., Turnbough C.L., Posey B.S., Briles D.E. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterbactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect Immun.* 50:392-397. 1985.
5. Brock D.T., Brock G.B., Ward D.M. *Basic Microbiology*. 3rd Ed. Prentice-Hall. USA. 1986.
6. Buchmeier N., Heffron F. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. Immun.* 57: 1-7. 1989.
7. Buchmeier N., Heffron F. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Infect Immun.* 730-732. 1990.
8. Buchmeier N., Heffron F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 59. 2232-2238. 1991
9. Calderón G.M., Pérez. C., Ximénez C. and Melendro E. Humoral immune response against *S. typhimurium* antigen fractions and protection. In; *Recent*

- advances in mucosa immunology. Parte B. Mc. Ghee J. Mestecky, Tlaskalova, H. Sterzl, J. Ed, Plenum Publishing Corporation. 1659-1662. 1995.
10. Carsiotis M., Stocker B.A D., Weinstein D.W., O'Brien A.B. A *Salmonella typhimurium* virulence gene linked to flg. *Infect. Immun* 57: 3276-3280. 1989.
  11. Carsiotis M., Winstein D., Karch H., Holder I. A., O'Brien A.D. Flagella of *Salmonella typhimurium* are a virulence factor in infected C57BL/6J mice. *Infect. Immun.* 46: 814-818. 1984.
  12. Einstein T; Sultzer B M. Immunity to *Salmonella typhimurium*. *Adv. Exp. Biol. Med.* 162: 261-296. 1983.
  13. Ernst R.K., Dombroski D.M., Merrick J.M. Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 58:2014-2016. 1990.
  14. Fernández B.M.E., González C. McIntosh M.A., Cabello F. C. Immune response to the iron-deprived-induced proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Infect Immun.* 57:1271-1275. 1989.
  15. Fields P., Groisman E. A., Heffron F. A *Salmonella* locus that controls resistant to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science.* 243: 1059-1062. 1989.
  16. Finkelstein R.A., Marchlewicz R.J., McDonald R.J. Isolation and characterization of cholera-related enterotoxin from *S. typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 17:239-241. 1983.
  17. Finkelstein, R. A., Sciortino, C. V., McIntosh, M.A. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* 5:8759-8777. 1983.
  18. Finlay B.B., Heffron F., Falkow S. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 24:940-943. 1989.
  19. Finlay B.B., Stambach M.N., Francis C.L., Stocker B.A.D., Chatfield S., Dougan G., Falkow S. Identification and characterization of TnphoA mutants of

- Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. *Mol. Microbiol.* 2:757-766. 1988.
20. Gahring L.C., Heffron F., Finlay B.B., Falkow S. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* 58:443-448. 1990.
  21. Galán J.E. , and Curtis III R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allows *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 86:6383-6387. 1989.
  22. Ginocchio C., Pace J. , Galán J.E. Identification and molecular characteritaton of a *Salmonella typhimurium* gene involved in trigggering the internalization of *Salmonellae* into cultured epithelia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89. 5976-5980. 1992.
  23. Ginocchio C.C., Olmsted S.B., Wells C.L., Galán J.E. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell.* 76:717-724. 1994.
  24. Groisman E. A., Oclman H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* *EMBO J.* 12: 3779-3787. 1993.
  25. Grossman N., Leive L. Complement activation via the alternative pathway by purified *Salmonella* lipopolisaccharide is affected by its structure but not its O-antigen length. *J. Immunol.* 132:376-385. 1984.
  26. Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A. *Manual de Microbiología Médica.* 12ª Ed. Editorial El Manual Moderno. México. 1987.
  27. Joiner K. A., Hammer C.H., Brown E. J., Frank M. M. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. II. C8 and C9 released C5b67 from the surface of *Salmonella minnesota* S218 because the terminal complex does not insert into the bacterial outer membrane. *J. Exp. Med.* 155:809-819. 1982.

28. Joiner K.A., Schmetz M.A., Goldman R.C., Leive L. Mechanism of bacterial resistance to complement mediated killing: insert C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O11B4 varying in O-antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. *Infect. Immun.* 45: 113-117. 1984.
29. Kangia K. J., Bossio C., Galán J.E. The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and Pull D family of proteins. *Mol. Microbiol.* 13: 555-568. 1994.
30. Ketyi I., Pacsa S., Emody L., Verteryi A., Kocsis B., Kuch B. *Shigella dysenteriae* 1 like cytotoxic enterotoxins produced by *Salmonella* strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci.H.* 26: 217-223. 1979.
31. Koo F.S., Peterson J.W., Houston C.W., Molina N.C. Pathogenesis of experimental Salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect. Immun.* 43: 93-100. 1984.
32. Kusters J. G., Geraldina A.W.M., Mulders-Kremers Van Doornik E.M.C., Van Der Zeijst B.A.M. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 61:5013-5020. 1993.
33. Kuusi N., Nurminen M., Saxén H., Makela H. Immunization with major outer membrane protein (porins) preparations in experimental murine salmonellosis: effects of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332. 1981.
34. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685. 1970.
35. Lee C.A., Falkow S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:4304-4308. 1990.
36. Lee C.A., Jones B.D. Falkow S. Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1847-1858. 1992.

37. Liang-Takasaki C. J; Grossman N., Leive L. Phagocytosis of bacterial by macrophages: changing the carbohydrate of macrophages. *J. Immunol.* 128:1229-1235. 1982.
38. Lindberg A., Robertsson J.A. *Salmonella typhimurium* infection in calves: cell mediated and humoral immune reaction before and after challenge with live virulent bacterial in calves given live or inactivated vaccines. *Infect Immun.* 41: 751-757. 1983.
39. Lockman H.A., Curtis III R. *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in Balb/c mice. *Infect. Immun* 58: 137-143. 1990.
40. Lodge J., Douce G.R., Amin I.I., Bolton A.J., Martin G.D., Chatfield S., Dougan G., Brown N.L., Stephen J. Biological and genetic characterization of TnphoA mutants of *Salmonella typhimurium* TML in the context of gastroenteritis. *Infect. Immun.* 63:762-769. 1995
41. McCormick B.A., Stocker B.A.D. , Laux D.C. Cohen P.S. Roles of motility, chemotaxis and penetration through and growth in intestinal mucus in the ability of an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* to colonize the large intestine of streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 56: 2209-2217. 1988.
42. Mekalanos J.J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacterial. *Journal of Bacteriology.* 174:1-7. 1992.
43. O'Brien A.D. La Veck G.D., Thompson M.R., Formal S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146:763-769. 1982.
44. Pelczar M.J., Chan E.C.S., Krieg N.R. *Elements of Microbiology* 5th Ed. McGraw-Hill USA. 1986.
45. Ramiro, M.H., Saita-Kamino, O. (eds) *Temas de Medicina Interna*. Vol. 1. No. 3. *Enfermedades infecciosas II*. Ed Interamericana McGraw-Hill, Inc. México 1993.

46. Reitmeyer J.C., Peterson J.W., Wilson K.J. *Salmonella* citotoxin: a component of bacterial outer membrane. *Microb. Pathog.* 1: 503-510. 1986.
47. Remels M.B., Levine M.M. Classical bacterial diarrhea: perspectives and update- *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Pediatr. Infect. Dis.* 5: 5091-5100. 1986.
48. Rosenshine I., Ruschkowski S., Foubister V. Finlay B.B. *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells: role of induced host cell tyrosine protein phosphorylation. *Infect. Immun.* 62:4969-4974. 1994.
49. Schaechter M, Medoff G. y Eisenstein B.I. Mechanisms of microbial disease. 2nd Edition Ed. Williams and Wilkins, Baltimore USA pp 264-280. 1993.
50. Schiemann D.A. Association with MDCK epithelial cells by *Salmonella typhimurium* is reduced during utilization of carbohydrates. *Infect. Immun.* 63:1462-1467. 1995.
51. Schiemann D.A., Shope S.R. Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 59:437-440. 1991.
52. Stoker B. A. D., Makela, P. H. Genetic determination of bacterial virulence with special reference to *Salmonella*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 124: 149-172. 1986.
53. Tomita T., Kanegasaki S. Enhanced phagocytic response of macrophage to bacterial by physical impact caused by bacterial motility or centrifugation. *Infect. Immun.* 38: 865-870. 1982.
54. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354. 1979.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

55. Volk W.A., Wheler M.F. Basic Microbiology. 5th Ed. Harper and Row Publishers. USA. 1984.
56. Wallis T.S., Starkey W.G., Stephen J., Osborn M.P. Enterotoxin reduction by *S. typhimurium* strains of different virulence. J. Med. Microbiol. 21: 19-23. 1986.
57. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:4406-4412. 1969.
58. Yancey J.R., Breeding S.A.L., Lankford C.E. Enterochelin (Enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 24: 174-180. 1979.
59. Zinsser, H., Joklik, W.K., Willett, H. P., Amos, D. B. Microbiología. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. 1986.