



11261
21
2e)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

PAPEL DE LA PORINA OmpC EN LA INMUNOGENICIDAD DE LA CEPA ATENUADA
Salmonella typhi CVD908

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
"INMUNOLOGIA"

PRESENTA EL ALUMNO

MARIO ISRAEL VEGA PAREDES

Tutor: Dr. César R. González Bonilla

MEXICO, D.F.

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. César Raúl González Bonilla.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CONTENIDO

I.	RESUMEN	4
II.	INTRODUCCION	5
II.1	Generalidades	5
II.2	Respuesta Inmune en Contra de <i>Salmonella typhi</i>	6
II.3	Proteínas de Membrana Externa	8
II.4	<i>Salmonella typhi</i> Como Acarreador Vivo de Antígenos	10
II.5	<i>Salmonella typhi</i> CVD908	11
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV.	OBJETIVOS	14
V.	HIPOTESIS	14
VI.	MATERIAL Y METODOS	15
1.	BACTERIOLOGICOS	15
1.1	Cepas Bacterianas	15
1.2	Cultivo de Bacterias	15
1.3	Determinación de Dosis Letal al 50%	15
1.4	Ensayo de resistencia a Cloramfenicol	16
2.	BIOQUIMICOS	16
2.1	Aislamiento de Proteínas de Membrana Externa	16
3.	ANALITICOS	17
3.1	Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
3.2	Inmunolectrotransferencia (Western Blot)	17
3.3	Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA)	17
3.4	Citometria de Flujo (FACS)	18
4.	INGENIERIA GENETICA	18
4.1	Determinación de la presencia del gene ompC por PCR	19
4.2	Cuantificación de DNA	19
4.3	Detección del gen por la técnica de Southern Blot	19
4.4	Determinación de mRNA por RT-PCR	19
4.5	Detección de mRNA por la técnica de Northern Blot	20
5.	METODOS INMUNOLOGICOS	20
5.1	Líneas Celulares	20
5.2	Animales de Laboratorio	20
5.3	Obtención de Suero Hiperinmune de Conejo Contra la Proteína OmpC Recombinante de <i>Salmonella typhi</i> .	20
5.4	Esquema de Inmunización	21
5.5	Ensayo de Protección	21
5.5	Ensayo de Proliferación	21
5.6	Ensayo de Citotoxicidad	21
VII.	RESULTADOS	23
VIII.	DISCUSION Y CONCLUSIONES	39
IX.	REFERENCIAS	42

I. RESUMEN.

Las porinas son proteínas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que constituyen canales de difusión de compuestos de bajo peso molecular y funcionan como receptores para fagos. Estas proteínas son capaces de inducir inmunidad protectora contra el reto con *Salmonella typhi* en ratones. *Salmonella typhi* CVD908 es una cepa $\Delta aroC \Delta aroD$, auxotrófica para aminoácidos aromáticos y *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63 contiene integrado en el locus *aroC*, el gene que codifica para gp63 de *Leishmania mexicana*. El patrón electroforético de las proteínas de membrana externa de estas cepas es distinto, pues *Salmonella typhi* CVD908 expresa menor cantidad de OmpC. Por lo que la cepa mutada de *Salmonella typhi* CVD908 es más resistente al Cloramfenicol, induce menores títulos de anticuerpos contra OmpC y respuestas proliferativas más pobres. *Salmonella typhi* CVD908 expresa en menor cantidad la porina OmpC en comparación a *Salmonella typhi* CVD908 Ω MGP63. No se ha aclarado por qué al integrar en el cromosoma un gene heterólogo *Salmonella typhi* CVD908 recupera la expresión de OmpC pero probablemente se deba a la introducción de un promotor en la región *aroC*, lo que sugiere que existe un vínculo regulatorio entre *aroC* y *ompC*. Esta observación es importante pues demuestra que al alterar el genoma bacteriano en un locus, pueden presentarse alteraciones inesperadas en otros loci. Esta diferencia fenotípica parece condicionar distinta inmunogenicidad en ambas cepas, lo cual debe tenerse en consideración en el diseño y desarrollo de vacunas.

II. INTRODUCCION.

II.1 Generalidades.

El género *Salmonella* comprende más de 2000 serotipos los cuales se agrupan en tres especies: *Salmonella choleraesuis* (con sólo un organismo), *Salmonella typhi* (constituido sólo por el bacilo de la tifoidea humana) y *Salmonella enteritidis* (a la cual pertenecen los demás serotipos). Las *Salmonellas* se pueden clasificar a través de la identificación serológica de los antígenos de superficie que presentan. *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhi* son microorganismos muy adaptados al cerdo y al hombre, respectivamente; sin embargo, ambos son capaces de infectar al ser humano. *Salmonella enteritidis* incluye serotipos adaptados y no adaptados a su hospedero, siendo estos últimos los causantes de la infección sistémica de muchos animales y de la diarrea en el hombre (1). Como ejemplos de las especies de *Salmonella* adaptadas al hospedero se puede mencionar a *Salmonella typhimurium* que causa la tifoidea del ratón, mientras que *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pollorum* causa la tifoidea aviar. En el humano, las *Salmonellas* no *typhi* son capaces de generar enfermedades invasivas en individuos muy jóvenes y en los de edad avanzada, así como en personas inmunosuprimidas. Los portadores asintomáticos de *Salmonella typhi* son el reservorio de la fiebre tifoidea humana. Algunas personas pueden convertirse en portadores temporales de otros serotipos de *Salmonella* y son los que generalmente ocasionan brotes de gastroenteritis a través de la contaminación de los alimentos, por lo que estas infecciones se consideran antropozoonosis (2).

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión masiva de *Salmonella typhi*. Se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen la hemorragia intestinal en el 2 al 8% de los casos y la perforación que se presenta en el 3 al 4%. La tasa de letalidad es alrededor de 1%; sin embargo, en los casos complicados puede ascender hasta el 30%. Ya que este microorganismo afecta sólo al ser humano y no hay reservorios animales, el elemento más importante en la cadena de transmisión es el portador asintomático.

Esta enfermedad continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos países industrializados, donde se presenta de manera endémica. Sin embargo, aún en los países con buena infraestructura sanitaria se pueden presentar brotes (3). Se estiman al rededor de 16 millones de casos anuales en el mundo, que causan mas de 600,000 muertes (4). La incidencia en Africa y Asia es de 500 casos/100,000 habitantes. En la región de las Américas alrededor de 1990, se presentaron 89,591 casos aproximadamente, que representan una incidencia de 20.8 casos/100,000 habitantes; la incidencia a llegado a ser hasta de 150 casos/100,000 habitantes en Chile. En México se reportaron 11,078 casos en 1987, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes. El grupo de edad más afectado por la enfermedad es el de los 15 a 44 años, donde se presentan aproximadamente el 58.62% de los casos, lo cual representa más de 500,000 días laborales perdidos. Hasta la semana 34 de 1996 se habían reportado ese año 4,351 casos, que comparados con 3,286 del año anterior, representan un incremento del 32% (5). Aunque se ha descrito que *Salmonella typhi* en todo el mundo constituye una sola clona con muy poca divergencia intraespecie (6,7) y algunos estudios muestran poca correlación entre las características genotípicas y la severidad de la enfermedad (8,9), otros autores sugieren que algunas diferencias genotípicas si pueden estar asociadas a la virulencia de algunas cepas (10).

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonella* y especie *typhi*, gram-negativo, móvil, mide de 2 a 3 μm , es citofílico, anaerobio facultativo, intracelular. Fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos. Tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno H o flagelar y el antígeno somático O que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica; de acuerdo a la clasificación de Kauffmann-White, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9,12; los flagelos contienen el antígeno d y en la superficie se encuentra el antígeno Vi, el cual forma parte de la membrana externa y es indicador de virulencia.

Salmonella typhi penetra al organismo a través de la boca, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, penetra a la membrana basal intestinal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por macrófagos y transportada a los ganglios linfáticos regionales donde se multiplica activamente, tiene una fase de bacteremia, se distribuye en el sistema fagocítico mononuclear, donde se reproduce y es liberada nuevamente al sistema circulatorio.

II.2 Respuesta Inmune en contra de *Salmonella typhi*.

Salmonella typhi no afecta de manera natural al ratón, pero la infección por *Salmonella typhimurium* tiene en este animal una patogenia semejante a la fiebre tifoidea en el humano, y por tanto se ha utilizado como modelo para estudiar las interacciones de la bacteria con el hospedero. Utilizando otros modelos, como la inoculación intraperitoneal de *Salmonella typhi* mezclada con mucina, es posible infectar macrófagos murinos (11).

La respuesta inmune que se genera en contra de *Salmonella* ha sido estudiada en los ratones, tanto resistentes como susceptibles a la infección por *Salmonella typhimurium* (12,13,14). Los ratones que expresan el alelo *ity* pueden sobrevivir a las primeras fases de la salmonelosis, mientras que los ratones susceptibles (*ity*^s) son incapaces de controlar la multiplicación temprana de *Salmonella* dentro de los macrófagos y mueren rápidamente por la enfermedad (15,16). El locus *Ity*, que se ha identificado también como *Lsh* o *Bcg*, se localiza en el cromosoma 1 y codifica para la proteína Nramp1 (12). Se trata de una proteína transmembranal que interviene en el transporte de intermediarios del NO hacia los fagolisosomas (17). Esta proteína juega un papel muy importante en el control de la infección temprana por microorganismos intracelulares como *Leishmania*, pues los ratones mutantes Nramp1^{-/-} controlan la infección tardía, sugiriendo que Nramp1 pertenece a mecanismos citotóxicos independientes a los que presentan los macrófagos activados (17). En las cepas de ratones susceptibles (BALB/c) a la infección por leishmania los macrófagos no se activan eficientemente y probablemente no producen cantidades suficientes de IL-12, impidiendo la diferenciación de linfocitos CD4⁺ hacia el linaje Th1.

La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio, en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar. Aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida, se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas es provocada por la liberación de endotoxina; entre otros efectos se ha comprobado que induce fiebre, hipertensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (18).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas, las cuales no necesariamente correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones, a excepción de algunos estudios que sugieren que los anticuerpos contra el antígeno H son un indicador de resistencia a la fiebre tifoidea (19).

Se ha descrito que los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de *Salmonella typhi*

a la pared intestinal; sin embargo, sólo son protectores ante inóculos pequeños de las bacterias. Frente a la gran invasión por grandes cantidades de *Salmonella typhi*, los mecanismos de inmunidad celular, fundamentalmente la activación de macrófagos, son indispensables para el control de la infección (20).

En el caso de la respuesta mediada por células, se ha estudiado la participación de las diferentes poblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$ (CD4⁺ y CD8⁺) y $\gamma\delta$ así como de los factores solubles que estas producen y la influencia de estos factores en la actividad microbicida del macrófago. Los linfocitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ participan en la activación de los macrófagos, en la estimulación para la producción de anticuerpos y en la inducción de hipersensibilidad retardada observada en los animales infectados con *Salmonella* (21,22).

En la búsqueda de los antígenos involucrados en la respuesta inmune contra *Salmonella typhi* se han analizado algunos de los componentes de la membrana externa como los son el lipopolisacárido (LPS) y las porinas. En el caso de *Salmonella typhimurium* se ha reportado que una mezcla de proteínas de la membrana externa (PME), o bien con porinas purificadas, son capaces de inducir un estado protector en los ratones (23,24). El LPS induce protección mediante el desarrollo de una respuesta de anticuerpos y aumentando la respuesta celular dirigida contra las porinas (25). La inoculación de porinas de *Salmonella typhimurium*, en el cojínete plantar de ratones inmunizados con dosis subletales de la misma bacteria, son capaces de generar una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) (26), la cual se considera una manifestación *in vivo* de la inmunidad celular. Algunos autores consideran que hay una correlación directa entre inmunidad protectora y el desarrollo de la DTH, sin embargo, en otros trabajos se ha encontrado que no en todos los casos hay correlación entre estos dos fenómenos, e inclusive se ha reportado que hay protección en ausencia de DTH (27).

Por otro lado en humanos el LPS y las porinas inducen la producción de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 α (IL-1 α) e IL-6 por monocitos, e IL-4 e interferón gamma (INF- γ), de manera dosis dependiente, por linfocitos (28).

Tanto las PME de *Salmonella typhi* (29), las porinas purificadas (30), así como la OmpC recombinante (31), inducen protección en ratones al reto con *Salmonella typhi*. En la protección observada participa la respuesta de anticuerpos, ya que el suero hiperinmune de conejo anti-PME protege pasivamente a ratones (29), al igual que los anticuerpos monoclonales anti-porinas (32), mientras que los anticuerpos monoclonales anti-LPS no tienen ningún efecto (33). En el humano se ha encontrado que los pacientes convalecientes de fiebre tifoidea producen IgG contra las porinas de *Salmonella typhi* (34). Por otro lado, las porinas también inducen inmunidad mediada por células, ya que activan específicamente linfocitos T en humanos y ratones (35,36) y promueven la activación de macrófagos. Debido a resultados mencionados, se considera que las porinas de *Salmonella typhi* son antígenos que pudieran formar parte de una vacuna un contra la tifoidea.

En relación a la respuesta inmune contra *Salmonella typhi*, se puede concluir que para el control de la infección es necesario un efecto sinérgico entre la actividad del macrófago, los anticuerpos y los linfocitos T. Sin embargo, todavía no se ha aclarado completamente el papel que juegan cada uno de los componentes de la respuesta celular en la infección causada por *Salmonella typhi*; aunque la función de los linfocitos T CD8⁺ es el menos claro, es evidente que estas células participan en el control de infecciones por microorganismos intracelulares como es el caso de *Listeria*, *Mycobacterium*, *Chlamidia* y *Brucella* (37).

II.3 Proteínas de Membrana Externa (PME).

Al menos la mitad de la masa de la membrana externa son proteínas. Las proteínas constituyentes de la membrana externa son proteínas porínicas y no porínicas. Las porinas tienen un peso molecular de 31 a 42 Kda, su composición de aminoácidos proporciona una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45%, tienen un punto isoeléctrico de 4.5-4.6 (38). Reciben el nombre de porinas porque se arreglan en trímeros que forman poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa Figura B (39). Las porinas identificadas tanto en *Escherichia coli* en *Salmonella typhimurium* son OmpC, OmpF y PhoC; mientras que OmpD al parecer es exclusiva de *Salmonella typhimurium*. Estas proteínas son muy semejantes entre sí y tan solo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos. Las estructuras de las porinas presentan una gran estabilidad en presencia de detergentes como las sales biliares y el SDS, y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas (38).

Dentro de la familia de porinas de los géneros *Escherichia* y *Salmonella*, las más estudiadas son OmpF y PhoF de *Escherichia coli*, pero debido a su gran homología (más del 60%), se considera que la estructura de las otras porinas es muy similar. Están formadas por tres monómeros idénticos de forma cilíndrica semejante a un barril (Figura A). La entrada del poro se encuentra delimitada por largas prolongaciones del cilindro que restringen su acceso al inclinarse hacia el centro del canal. A la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior. Esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones hasta el otro extremo, el cual desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria (40).

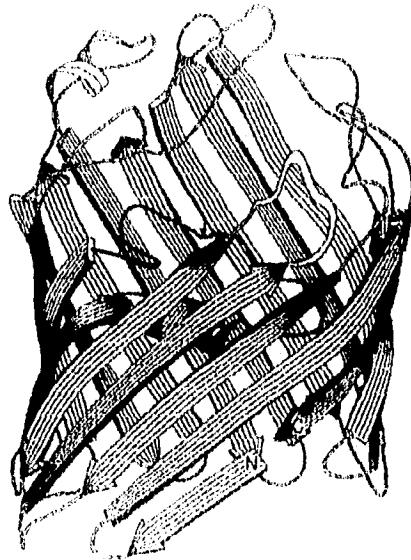


Figura A. Modelo de la estructura terciaria de la porina OmpF de *Escherichia coli*

El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio. Los estudios cristalográficos más recientes realizados en OmpF y PhoE, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril β formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras de β de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1(38). En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal. La entrada del poro está restringida por las asas largas y dispares que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 Å a 19 Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15 x 22 Å y está definida por las vueltas β . El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas y por tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros (38).

Las porinas se encuentran en la superficie de la bacteria en una cantidad relativamente elevada, (hasta 10^5 copias por célula), por lo que constituyen una de las proteínas más abundantes en la bacteria en términos de masa; pueden presentar hasta un 2% de la proteína total de la célula (38). Hasta el momento las porinas más estudiadas son las de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y sus principales características se muestran en la Tabla 1.

Las condiciones de crecimiento, como la actividad osmótica y la temperatura, regulan la expresión de las porinas. En un medio de cultivo común (que contenga fuentes de Carbono y Nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales) solo OmpF, OmpC y OmpD se producen; PhoE únicamente se expresa bajo condiciones de escasez de fosfatos. La expresión de OmpF se reprime por la temperatura y la osmolaridad elevadas; por lo que algunas cepas prácticamente no sintetizan esta proteína a 37°C y en presencia de aproximadamente 0.9% de NaCl. Por el contrario, la expresión de OmpC, se ve favorecida con niveles elevados de sales (38).

OmpC y OmpF son proteínas muy semejantes funcional y estructuralmente; sus poros tienen tamaños de exclusión similares ($M_r \approx 600$ dal.), y diámetros que varían entre 1.1 y 1.3 nm³. Se cree que estas dos proteínas y la porina PhoE evolucionaron de una proteína ancestral común, ya que las secuencias proteicas contienen un 63% de aminoácidos idénticos y que esta homología se incrementa hasta un 86% en el extremo carboxilo de ambas proteínas (41). Al realizar estudios *in vitro* en los que se reconstituyen las porinas en membranas lipídicas, se ha demostrado que las porinas de *Escherichia coli* son permeables a trisacáridos y tetrapéptidos; lo cual implica que permiten el paso de nutrientes y iones a través de la membrana externa de la bacteria. Además, la medición de la conductancia en estas membranas, ha permitido calcular el diámetro de los poros (42). No hay información que muestre la especificidad del poro hacia los solutos; sino que aparentemente son las propiedades fisicoquímicas de los solutos las que determinan su velocidad de difusión a través de la porina; siendo las principales el tamaño, la carga eléctrica y la hidrofobicidad del soluto (38).

TABLA A. Características de las porinas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

PORINA	RECEPTOR A FAGOS O COLICINAS	PESO MOLECULAR (Kda)	DIAMETRO APROXIMADO (nm)	REGULACION DE LA SINTESIS
OmpF	Tol, F2, F1, F27, F5, ColA	32 - 37 39 - 39	3 - 2 1 - 2	osmolaridad
OmpC	Tol, Mol, PA2, 434, S51, F22, F5, F6, PH42, PH105, PH221	26 - 28 30 - 35	1 - 1 1 - 3	osmolaridad
OmpD	PH31, PH42, PH51	33 - 33	1 - 3	AMPc
PhoE	TC23, TC45	36 - 38	1 - 2 1 - 2	PI

Las porinas son capaces de inducir inmunidad activa en ratones contra el reto de 500 DI₅₀ (30) y que el suero hiperinmune de conejo contra PME induce protección pasiva y es capaz de reconocer al grupo de las porinas (29). Las proteínas porínicas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* hasta ahora conocidas son: OmpB, OmpC, OmpD y las proteínas OmpF, NmpA, NmpB, NmpC y Lamb. El gene que codifica para OmpC de *Salmonella typhi* ya fue aislado y secuenciado (43,44). La porina OmpS1 de *Salmonella typhi*, que se logró identificar utilizando como sonda una secuencia de OmpF de *Escherichia coli*, es mas grande que OmpC y OmpF pues tiene 41 KDa, y se expresa en tan baja concentración que no es visible en electroforesis en acrilamida (45). Las proteínas no porínicas comprenden a la proteína OmpA, la proteína a y la lipoproteína. El peso molecular de la OmpA es alrededor de 33 KDa. Algunas evidencias sugieren que actúa como un receptor de bacteriocina y además juega un papel importante en el mantenimiento de la morfología celular y en la integridad de la membrana externa, posiblemente por sus interacciones con las peptidoglicanas. Es sensible a las proteasas. La función de la proteína a constituye un misterio, algunas evidencias sugieren que es probablemente una proteasa. La lipoproteína es un polipeptido que contribuye a la estabilización de la arquitectura del complejo membrana-peptidoglicana.

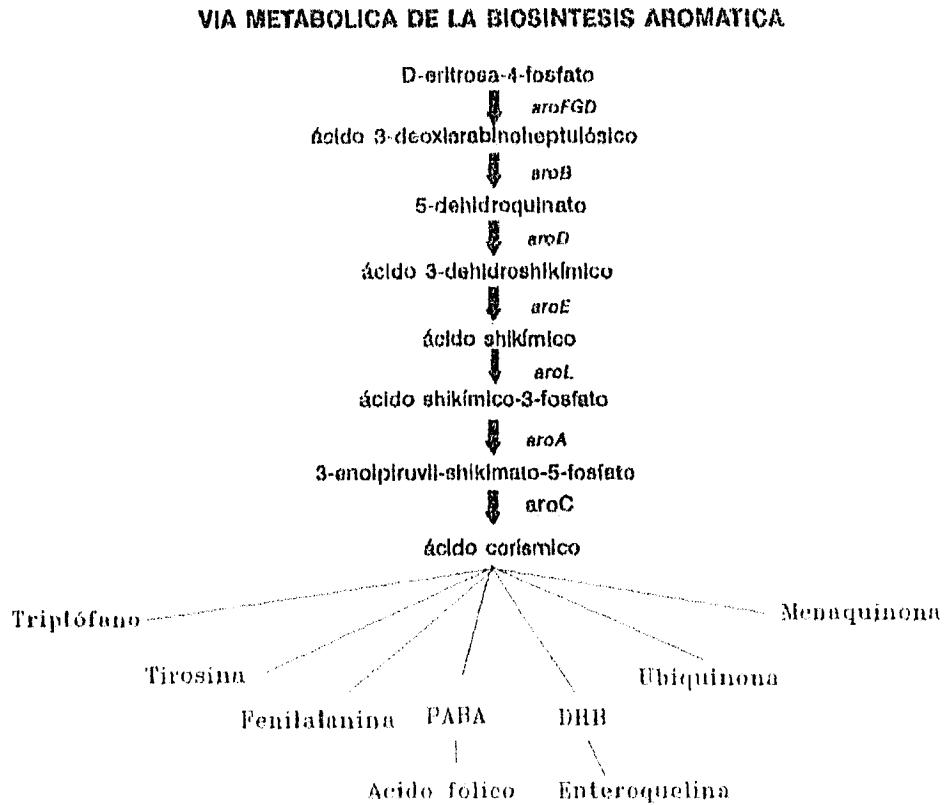
II.4 *Salmonella* como acarreador vivo de antígenos.

Las cepas atenuadas de *Salmonella*, que acarrean determinantes antígenicos de otros organismos, son de gran interés como alternativa en el desarrollo de vacunas, pues la administración oral de *Salmonella* viva puede inducir respuesta inmune secretora, humoral y mediada por células contra *Salmonella* y contra los antígenos que acarea y, consecuentemente, conferir protección en modelos animales. Sin embargo, para que estas cepas atenuadas de *Salmonella* puedan ser empleadas como acarreadores, se deben introducir genes foráneos que produzcan de manera estable la proteína recombinante, usualmente se utilizan plásmidos que confieren resistencia a antibióticos, facilitan su identificación y permiten la retención del plásmido por la bacteria. Aunque estos plásmidos se retienen de manera adecuada *in vitro*, son muy inestables *in vivo* aun cuando la bacteria se encuentra bajo la presión selectiva del antibiótico. Para resolver este problema se ha utilizado la integración del gene foráneo al cromosoma de la cepa acarreadora (46).

II.5 *Salmonella typhi* CVD908.

S. typhi CVD908 es una cepa derivada de *S. typhi* Ty2. En esta cepa se inactivaron por recombinación homóloga los genes *aroC* y *aroD* utilizando plásmidos suicidas. Estos genes codifican dos enzimas que intervienen en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y por tanto, es auxotrófica para estos compuestos (47) (Figura B). La cepa es incapaz de replicarse en los

Figura B



tejidos de los mamíferos porque en ellos no encuentra los metabolitos necesarios para la vía biosintética de compuestos aromáticos. Esta cepa fue bien tolerada en voluntarios humanos sanos a dosis orales altas y estimuló respuesta inmune de tipo sistémica y de mucosas (48). *S. typhi* CVD908 ha sido utilizada como acarreador en varios sistemas experimentales. Una cepa que expresa gp120 de HIV-1 fue capaz de evocar anticuerpos contra el virus al ser administrada a ratones BALB/c (49). Se ha logrado que *S. typhi* CVD908 exprese de manera simultánea los factores de colonización CFA/I y CS3 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (50). *S. typhi* CVD908 fue empleada como acarreador de la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*. La administración oral de este candidato a vacuna en voluntarios humanos, dio como resultado una respuesta de anticuerpos a la CSP y, más importante, en algunos voluntarios se identificaron linfocitos T citotóxicos dirigidos contra la CSP (51).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Salmonella typhi CVD908 es una cepa auxotrófica atenuada, que se obtuvo mediante ingeniería genética, realizando deleciones en los *loci arxC* y *aroD*, a partir de *Salmonella typhi* Ty2, lo cual la inhabilita para sintetizar aminoácidos aromáticos.

El patrón electroforético de los extractos proteicos crudos de *Salmonella typhi* CVD908 son diferentes a los de *Salmonella typhi* Ty2. En condiciones usuales de cultivo *Salmonella typhi* CVD908 carece de la banda que pudiera corresponder a OmpC. Existen diversos motivos que pueden explicar la falta de detección de esta proteína. Debido a que esta cepa se obtuvo mediante métodos de ingeniería genética, que implican recombinación homóloga en el cromosoma, se pudo haber causado una deleción inesperada en el gene *ompC*; o bien, es probable que se produzca anormalmente el RNA mensajero de esta proteína en *Salmonella typhi* CVD908. Otra posibilidad, es que la alteración en las vías biosintéticas de los aminoácidos aromáticos influya de manera indirecta en el grado de expresión de la proteína OmpC, por un mecanismo regulatorio aún no descrito.

Independientemente de la identidad de la proteína que no se observa en el patrón electroforético de *Salmonella typhi* CVD908, es posible que esta diferencia fenotípica contribuya al distinto comportamiento biológico de ambas cepas. Considerando que OmpC tiene un papel importante en la inducción de inmunidad protectora, el hecho de que *Salmonella typhi* CVD908 exprese de manera deficiente esta proteína, bajo determinadas condiciones de cultivo, ofrece la oportunidad de confirmar su papel en la respuesta inmune que induce la infección por *Salmonella typhi*.

IV. OBJETIVOS

✓Generales:

Identificar la proteína que no se observa en patrón electroforético de *Salmonella typhi* CVD908. Determinar si la diferencia fenotípica entre *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 se asocian con distintas propiedades biológicas.

✓Particulares.

- 1.- Caracterizar el patrón de proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* CVD908.
- 2.- Establecer si *Salmonella typhi* CVD908 contiene alguna mutación en el locus *ompC*.
- 3.- Determinar si *Salmonella typhi* CVD908 produce RNA mensajero del gene *ompC*.
- 4.- Comparar la protección que genera *Salmonella typhi* CVD908 en el modelo murino en relación con otras cepas de *Salmonella typhi* que expresan normalmente OmpC.

V. HIPOTESIS

La inmunización de ratones con la *Salmonella typhi* Ty2 genera mayor protección al reto con *Salmonella typhi* Ty2, comparado con los ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908, ya que esta última tiene una baja expresión de la proteína OmpC y esta es un antígeno inmunodominante en la respuesta contra *Salmonella typhi*.

VI. MATERIAL Y METODOS

I. Bacteriológicos.

1.1 Cepas bacterianas.

Salmonella typhi Ty2 de la colección de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (UIMI).

Salmonella typhi CVD908. Mutante $\Delta aroC \Delta aroD(47)$ (donada por el Dr. Myron Levine, Center for Vaccine Development, Universidad de Maryland, Baltimore, USA).

Salmonella typhi CVD908 Ω MGP63. Contiene integrado en el *locus aroC* el gene que codifica para la GP63 de *Leishmania mexicana* (52) (construida en la UIMI).

Escherichia coli UH302. Cepa mutante deficiente en porinas (53) (donada por el Dr. Henning, U.)

Se realizó la caracterización bioquímica de todas las cepas en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA.

1.2 Cultivo de Bacterias.

Las cepas bacterianas se crecieron en medio de Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BJOXON) durante toda la noche y se realizó una resiembra al día siguiente sustituyendo el medio anterior por medio nuevo, a 37°C con agitación constante en un Environ-Shaker (Lab-Line). Las cepas se crecieron hasta lograr una fase logarítmica.

1.3 Determinación de la dosis letal al 50% (DL₅₀).

El cultivo bacteriano de *Salmonella typhi* Ty2, fue cosechado en la fase de crecimiento logarítmico se ajustó a una concentración de 10^9 bacterias/ml (0.6 de D.O a 540 nm) y partir de esta suspensión, empleando para ello un factor de dilución constante, se prepararon las siguientes concentraciones: 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 1.6×10^4 , 3.2×10^3 y 6.4×10^2 bacterias/ml, 0.5 ml de las bacterias resuspendidas en mucina (mucina gástrica de cerdo al 5% en solución salina estéril) se inocularon por vía intraperitoneal (i.p) a grupos de 5 ratones BALB/c de 18 a 20 g de peso. Como grupo testigo se emplearon ratones inyectados con 0.5 ml de mucina. Para *Salmonella typhi* Ty2 se registró la sobrevivencia tres días después de la administración del inóculo bacteriano.

La DL₅₀ se determinó de acuerdo al método de Reed y Muench (54), según la siguiente fórmula:

$$\text{Log DL}_{50} = \text{Log dil (50\% - D.P.)} \times \text{Log factor de dilución}$$

en donde:

Log dil <50% = Logaritmo de la dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

$$\text{Distancia Proporcional} = \frac{50\% - <50\%}{>50\% - <50\%}$$

50%= dilución de la concentración que mata al 50% de la población.

<50%= dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

>50%= dilución inmediata superior a la dilución que mata al 50% de la población.

1.4 Ensayo de resistencia a cloramfenicol

Se determinó la resistencia a cloramfenicol de las cepas *Salmonella typhi* Ty2, CVD908, CVD908ΩMGP63, de acuerdo al método descrito por Toro (55). Brevemente, se crecieron las diferentes cepas bacterianas en medio BHI en matraces nefelométricos con un inóculo de 100µl de un cultivo que contenía 1×10^9 /ml bacterias, adicionándoles una concentración de cloramfenicol (Sigma) de 40µg por ml. Las lecturas se hicieron cada 100 min hasta los 500 min en un espectrofotómetro a una longitud de 600 nm.

2. Bioquímicos.

2.1 Aislamiento de proteínas de membrana externa.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Schnaitman (56) y modificado en la UIMI (29). Cada una de las cepas bacterianas se inóculo a partir de placas que contenían medio BHI agar, el inóculo se depositó en tubos de plástico que contenían 40 ml de medio líquido de BHI y se crecieron por 6 hrs a 37°C en agitación (1,500rpm) y se cosecharon de la siguiente manera: se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min a 4°C en una centrifuga Sorvall RC5B Plus (Sorvall Instruments Du Pont), el sobrenadante se desechó. Se lavaron las pastillas dos veces con PBS estéril pH 7.7, centrifugando bajo las mismas condiciones. Posteriormente, las pastillas se resuspendieron en una solución amortiguadora de Hepes 10mM pH 7.7, ajustando la densidad óptica entre 1 y 1.5 a 660nm (espectrofotómetro Beckman DU-640). Se hicieron alícuotas de 80 ml y se sometieron a la prensa French o a sonicación (Sonicator Ultrasonic Procesor XL, MISONIX) a 180 W (190 db), con ciclos de dos min, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 660 nm, siempre se sonicó en baño de hielo. Las bacterias intactas se eliminaron por centrifugación a 6,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante que contenía las membranas celulares y el citosol, se trató con DNasa y RNasa (Sigma) 25 µg/ml, adicionando una gota de MgCl₂ por cada 10 ml, enebando a 37°C durante 45 min.

Se colectaron las membranas celulares por ultracentrifugación a 45,000 rpm durante 45 min a 5°C (Ultracentrifuga Sorvall Pro 80 Du Pont) para sedimentar la envoltura celular: la pastilla resultante se resuspendió en Hepes 10mM pH 7.4 volviéndose a ultracentrifugar bajo las mismas condiciones. La envoltura celular contenida en la pastilla se resuspendió en una solución

amortiguadora de Tritón X-100 al 2% en Hepes 10mM pH 7.4. Con el propósito de solubilizar y eliminar la membrana citoplásmica se centrifugó a 45,000 rpm durante 45 min a 5°C. La pastilla resultante se solubilizó en una solución de Tritón X-100 al 2% en Tris 50mM EDTA 5mM pH 7.8 y se enebó a 37°C. De esta forma el sobrenadante contenía principalmente a las PME. La cuantificación de PME se realizó mediante la técnica de "BCA-Protein Assay Reagent" (PIERCE) (57)

3. Analíticos.

3.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de las PME y extracto crudo de cada una de las diferentes cepas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo al método de Laemmli (58). Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. El gel superior contenía 2.5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel separador contenía 12% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. Las bacterias se ajustaron espectrofotométricamente a 1×10^9 /ml. Las muestras se resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 8.8, SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%), las muestras se hirvieron por 10 min. El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante aproximadamente 5 hrs empleando 5 v/cm², y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.195 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 1 hr en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fue transparente.

3.2 Inmuno-electrotransferencia ("Western blot").

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ (Micon Hybond-C de Amersham), en una unidad de transferencia electrónica (LKB 2005 TRANSPHOR) por 3 hrs a 0.5 A de acuerdo al método de Towbin (59). Posterior a esto el papel de nitrocelulosa se bloqueó por 1 hr con PBS-leche al 5%, y después se lavó tres veces con PBS y otras tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y se puso en contacto con un anticuerpo monoclonal contra la porina OmpC de *Salmonella typhi*60) (donado por el Dr. Felipe Cabello, New York Medical College, Valhalla, NY, USA). El anticuerpo se empleó en una dilución 1:1000 en PBS-leche al 5% durante 1 hr a 37°C y se procedió a lavar en las mismas condiciones que se mencionan arriba y se adicionó el segundo anticuerpo revelador que fue un anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido 1:1000 durante 45 min. La reacción se reveló con α -4-Cloro naftol-H₂O₂. Todo esto se realizó a una temperatura de 37°C.

3.3 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Se realizó de acuerdo al método de Engvall (61). Se recubrieron placas para microtitulación con 15 μ g de una proteína OmpC recombinante, para lo cual se resuspendió en amortiguador de carbonatos pH 9.5, y se enebó por 2 hrs a 37°C y posteriormente se dejaron toda la noche a 4°C. Para bloquear se adicionaron 100 μ l/pozo de una solución de PBS-leche al 5%, por 1 hr. Se le adicionó el primer anticuerpo, que consistió en el suero de los grupos de ratones inmunizados de acuerdo al esquema anteriormente mencionado. Los sueros se emplearon diluidos 1:200 en PBS-leche 5%. Se incubó la placa a 37°C por 2 hrs, y se adicionó el segundo anticuerpo que fue

un conjugado IgG1 de ratón diluido 1:1000 y se incubó 1 hrs. Se adicionó como sustrato o-fenilendiamina (H₂O₂) de un stock de 6mg/1.2ml. para preparar la mezcla se empleó amortiguador de citratos de pH 5.6. Se detuvo la reacción a los 10 min de incubación adicionando 50 µl por pozo de H₂SO₄. Se midió la absorbancia a 492 nm. Entre cada paso se realizaron 4 lavados con una mezcla de PBS-Tween 20 al 0.1%.

3.4 Citometría de Flujo (FACS)

La presencia de la proteína OmpC en la superficie de *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* Ty2 se determinó por inmunofluorescencia indirecta empleando un suero hiperimmune de conejo inmunizado con OmpC recombinante y un anticuerpo monoclonal contra OmpC de *Salmonella typhi* (60). Como segundo anticuerpo se empleó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína. La intensidad de fluorescencia se determinó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA.) analizando 10⁴ bacterias de cada una de las muestras.

4. Ingeniería Genética

La manipulación de DNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook (62).

4.1. Determinación de la Presencia del gene de OmpC por PCR.

Se purificó DNA genómico de *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63, según el método de Frankel (63) y procedió a amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(64) el gene *ompC*, utilizando como iniciadores o "primers" los siguientes oligonucleótidos: (72) 5'CGG GAA GCT TAG GAG TAA TTA AAA TGG ATA TCG TCG AAA TTT ATA ATA AAG ACG GCA ACA AA 3' y (74) 5'CGG GGG ATC CTT AGA ATT CGA ACT GGT AAA CCA GAC CCA G 3'. Empleando como control el plásmido pST13. La amplificación se realizó en un termociclador (Robocycler, Stratagene), bajo las siguientes condiciones:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
DNA cromosomal de <i>Salmonella typhi</i>	0.1 µg
"primers"	50 pg
Mezcla de dNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	1.3 mM
Taq DNA polimerasa	1.5 U
Amortiguador de reacción 10X	10 µl
Agua inyectable c.b.p.	100 µl

Numero de ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	92	4	40	2	72	2
20	92	1	40	1:10	72	1
1	92	2	40	1	72	4

4.2 Cuantificación de DNA.

El DNA se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 nm. Las muestras se diluyeron 1:100 en agua inyectable. Las concentraciones de DNA se determinaron mediante la siguiente fórmula:

Conc. de DNA = 50 µg/ml X factor de dil X D.O a 260 nm

4.3 Detección del gene por la técnica de "Southern blot".

La hibridación de DNA genómico con una sonda de DNA plasmídico se realizó de acuerdo al método descrito por Southern (65). Se digirieron 10 µg de DNA cromosomal purificado a partir de *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63, toda la noche con KpnI y se corrió un gel de agarosa al 1% conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml) en TAE 1X. El gel se sumergió en solución desnaturalizante de DNA por 45 min (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 N), con agitación constante. Se lavó el gel con agua desionizada y luego se neutralizó, con solución de lavado (Tris 1M pH 7.4, NaCl 1.5 M) por 30 min a temperatura ambiente, se repitió la operación por 15 min. Se transfirió el DNA a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad empleando como amortiguador de transferencia una solución de 10X SSC. Se lavó el papel con una solución 10X de SSC. La membrana de nitrocelulosa con el DNA fue expuesta en un entrecruzador (Stratagene UV, Stratalinker™, 1800). La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X, DENHARDT 10%, SDS 20%), y la sonda radioactiva previamente desnaturalizada (fragmento 0.8 Kb KpnI-KpnI del plásmido pST13) encubando toda la noche a 68°C. posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 15 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso en una película (Kodak) durante 24 hrs.

4.4 Detección de RNA mensajero por RT-PCR.

Se extrajo RNA acuerdo al método descrito por Chomczynski (66). Una alícuota de 200 µl de suspensión bacteriana (1×10^8 bacterias/ml) se diluyó en 200 µl de TRIzol™ (GIBCO BRL) (1:1) (isotiocianato de guanidinio) se mezcló e incubó a temperatura ambiente 5 minutos. Se agregaron 40 µl de cloroformo (200 µl por cada ml de TRIzol™ utilizado), se mezcló vigorosamente por 15 segundos. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 10,000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo y se adicionaron 100 µl de isopropanol (500µl por ml de TRIzol™ utilizado). Se mezcló vigorosamente por 10 segundos y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 10,000 xg por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 75% (1 ml de etanol por cada ml de TRIzol™ utilizado). Se mezcló vigorosamente por 10 segundos y se centrifugó a 7,000 xg por cinco minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó al vacío. La pastilla conteniendo el RNA se resuspendió en

50 ml de agua libre de RNAsas, y se incubó a 56 °C durante 30 minutos. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman) a 260 nm, haciendo una dilución 1:100 de la muestra.

La retrotranscripción se realizó acuerdo a las recomendaciones de "Reverse Transcription of RNA and PCR Amplification of cDNA" de Perkin Elmer Cetus. En la retrotranscripción se utilizó el "primer" reverso específico de *ompC* y en la amplificación los "primers" 72 y 74.

4.5. Detección de mRNA, por "Northern blot".

El RNA total purificado por la técnica de Chomczynski (66) utilizando TRIzol™, se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 nm, y se corrió en un gel de agarosa al 1% (1 gr de agarosa, amortiguador de corrimiento 1X, formaldehído 2.2 M) 50 µg de RNA total, se realizó corrimiento previo de 5 min a 5 v/cm². Se corrieron las muestras hasta 3/4 de el gel total. Se transfirió cada muestra por difusión capilar a una membrana de nitrocelulosa y se expuso en un entrecruzador (Stratagene UV, Stratalinker™, 1800). La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X, DENHARDT 10%, SDS 20%), y la sonda radioactiva previamente desnaturalizada, fragmento 0.8 Kb KpnI-KpnI del plásmido pST13, incubando toda la noche a 68 °C, posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 15 min a 68 °C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso en una película (Kodak) durante 24 hrs.

5. Inmunológicos.

5.1 Líneas celulares.

P815 (ATCC TIB 64), Mastocitoma de ratón DBA/2 (H 2^d); se utilizó como una línea celular "blanco" para ensayos de citotoxicidad de células TCD8⁺.

P815ΩOmpC construida en la UIMI (67). Esta línea celular murina contiene el gene que codifica para la proteína OmpC de *Salmonella typhi*, ya que fue transfectada con el plásmido PFM92.1-OmpC que expresa de manera constitutiva dicha proteína.

5.2 Animales de laboratorio.

Ratones BALB/e de 20 g aproximadamente, de ambos sexos.

Conejo Nueva Zelanda.

Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

5.3 Obtención de suero hiperinmune de conejo contra la proteína OmpC recombinante de *Salmonella typhi*.

Se obtuvo suero hiperinmune de conejo contra la proteína OmpC recombinante de *Salmonella typhi*. Se utilizó un conejo de la cepa Nueva Zelanda el cual fue inmunizado por vía interescapulovertebral con OmpC recombinante. Se le administró una dosis cada semana de 1 mg/ml en 500 µl de SS mezclados con 500 µl de adyuvante incompleto de Freund (SIGMA) durante 12 semanas. El conejo se sangró el día cero para obtener el suero control. La titulación de anticuerpos se realizó en la semana 12 mediante ELISA, para lo cual las placas se sensibilizaron con 10 µg/ml de proteína OmpC recombinante en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 1 hr a 37 °C. La placa se bloqueó con PBS-leche al 5% por 2 hr a 37 °C. El suero de conejo se agregó por duplicado en cinco diluciones (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700 y 1:8100) y se incubó por 1 hr a 37 °C. Finalmente, la placa se incubó con un suero de cabra anti-

IgG de conejo conjugado a peroxidasa (SIGMA) durante 1 hr a 37°C. Posteriormente se agregó el sustrato *o*-fenilendiamina (H_2O_2) se estabilizó el color con H_2SO_4 2N y se leyó la D.O. a 490 nm. Entre las cuencabaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01%. Para utilizar este suero hiperinmune en la evaluación de la expresión de OmpC por *Salmonella typhi* CVD908, se purificó IgG mediante una columna afinidad de proteína A de *Staphylococcus aureus*, de acuerdo al método descrito (68,69).

5.4 Esquema de inmunización.

Se inmunizaron tres grupos de diez ratones, de aproximadamente 2 meses de edad, con las cepas *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63 resuspendidas en PBS. Diez min antes de administrar la bacteria se les administraron 100µl de bicarbonato de sodio y posteriormente se les dio 1×10^8 bacterias en 100µl por vía oral (v.o.), los días cero, siete y treinta y cinco.

5.5 Ensayos de protección.

Para estos ensayos se utilizaron siete grupos de diez ratones BALB/c. Seis grupos fueron inmunizados con 1×10^8 bacterias de las cepas *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63 en 100µl de PBS (dos grupos por cepa). Al séptimo grupo se le administró 100µl de PBS, el esquema de inmunización fue como ya se mencionó. Después de la última dosis se dejó pasar una semana para después retarlos por inoculación i.p. con la DL₅₀ de *Salmonella typhi* Ty2 que es de 1×10^6 en 100 µl de muestra al 5% (Type II Sigma). Los ratones se observaron durante 10 días después del reto.

5.6 Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación se realizaron de acuerdo al método descrito con anterioridad (36). Grupos de 10 ratones BALB/c se inmunizaron con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63 como se menciona anteriormente. 8 días después de la última dosis se preparó una suspensión de esplenocitos por medio de disgregación del bazo en tela de organza. Los eritrocitos se eliminaron mediante el empleo de un amortiguador de lisis (0.15 M de NH_4Cl , 1.0 mM de $KHCO_3$, 0.1 Mm de Na_2EDTA , pH 7.4) durante 3 min. Los esplenocitos se lavaron con solución de HANKS (Gibco), y se ajustaron a $30 \times 10^6/10$ ml de RPMI complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina y piruvato de sodio. Las células se colocaron en placas de microcultivo de 96 pozos y fondo plano (NUNC) y se cultivaron en presencia de 50 µg/ml de proteína OmpC recombinante de *Salmonella typhi*. Los cultivos se encubieron 5 días a 37°C y 5% de CO_2 . Dieciocho hrs antes de terminar el cultivo se agregó 1 µCi de 3H -Timidina (Amersham, Int. Berkshire, England) por pozo. Las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio y la incorporación del material radiactivo se cuantificó en un contador de Centelleo Líquido (Beckman LS 5801, Beckman, Ins. Stanford CA, USA). Los resultados se encuentran expresados en c.p.m.

5.7 Ensayos de citotoxicidad.

Se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de Wunderlich (70).

a) Preparación de células efectoras.

Se obtuvieron las células de bazo de los ratones B6.M.B/c inmunizados como se describió previamente. Se cultivaron 3×10^7 de dichas células en 10 ml de medio DMEM suplementado con glutamina, piruvato, β mercaptoetanol y SFB al 20%, en presencia de 100 μ g/ml de OmpC recombinante de *Salmonella typhi*, durante cinco días. Después de esto, las células fueron cosechadas a 1.200 rpm durante 5 min, se resuspendió en 5 ml de medio RPMI y se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron para tener 3×10^6 células/ml.

b) Preparación de células blanco.

A partir de un cultivo en fase logarítmica de células P315 y P315-OmpC se cosecharon a 1.200 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS, se contaron y ajustaron a 1×10^6 células en 200 μ l de medio suplementado con SFB al 20%, se adicionaron 200 μ l de ^{51}Cr , equivalente a 200 μ Ci. Se incubó a 37°C durante 2 hr. Transcurrido el tiempo se lavaron dos veces con PBS, se contaron y ajustaron a 3×10^4 células/ml en medio RPMI.

c) Ensayo de liberación de cromo.

En una placa de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo se colocaron 100 μ l de las suspensiones de células blanco en medio RPMI. A estas células se les adicionaron las células efectoras a diferentes diluciones quedando relaciones célula blanco:célula efectora de 1:100, 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25. Como testigo de liberación espontánea de Cr^{51} se prepararon pozos con 100 μ l de medio RPMI y 100 μ l de células blanco; como testigo de liberación máxima de Cr^{51} se prepararon pozos con 100 μ l de células blanco y 100 μ l de SDS al 20%. Las muestras se analizaron por triplicado.

Una vez que se preparó la placa con las células efectoras y blanco, ésta se incubó durante 4 hrs 30 min a 37°C, 5% de CO_2 y atmósfera húmeda. Transcurrido el tiempo se cosecharon las muestras y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma (Beckman 5500).

Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad específica de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{cpm problema} - \text{cpm liberación espontánea}}{\text{cpm liberación máxima} - \text{cpm liberación espontánea}} \times 100$$

VI. RESULTADOS.

6.1 Comportamiento electroforético de *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63.

Se crecieron las diferentes cepas bacterianas en medio BHII agar durante toda la noche y se sembraron en cultivo agitado, hasta alcanzar una fase logarítmica. Las bacterias se lavaron en PBS y se ajustaron a 1×10^9 bacterias/ml. 1.5×10^9 bacterias se reuspendieron en 30 µl de amortiguador de corrimiento y se separaron por electroforesis en condiciones reductoras. La Figura No. 1 muestra el patrón electroforético que se observó consistentemente en experimentos independientes. Se analizaron *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63. Se incluyeron como controles OmpC recombinante, *Escherichia coli* UH302 y *Escherichia coli* UH302 transformada con el plásmido pST13. *Escherichia coli* UH302 (carril 7) es una mutante que carece de la porina OmpC, por tanto no se observa la banda de 36 KDa (carril 5). Cuando esta cepa se transforma con el plásmido pST13 se restituye la banda de 32 Kda (carril 6). *Salmonella typhi* Ty2 (carril 3) tiene un patrón semejante a *Escherichia coli* UH302-pST13 en la región de 30 a 35 KDa, presenta la banda correspondiente a OmpC. En cambio, *Salmonella typhi* CVD908 (carril 2) se comporta de manera semejante a *Escherichia coli* UH302. Sin embargo, *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 (carril 4), que proviene de CVD908 pero tiene integrado en el locus Δ ompC el gene que codifica para GP63 de *Leishmania mexicana* bajo el promotor pTae, tiene un patrón electroforético semejante a *Salmonella typhi* Ty2 y a *Escherichia coli* UH302-pST13, aparentemente recuperando la expresión de la proteína de 36 KDa que pudiese corresponder a OmpC.

Posteriormente, se purificaron PME por el método de Schmittman (56) que consiste en una solubilización de las proteínas membranales utilizando Tritón X110 y se corrieron 30 µg en una electroforesis den condiciones reductoras. En la Figura No. 2 se presenta el patrón de PME de las diferentes cepas bacterianas. Se incluyeron gliceraldeido-3-fosfato dehidrogenasa (carril 1) y ovoalbúmina (carril 2) de 36 y 45 Kda, respectivamente. *Salmonella typhi* Ty2 (carril 5) presenta la banda que corresponde a OmpC (carriles 3 y 4). Se observa una clara diferencia entre los patrones de *Escherichia coli* UH302 (carril 7) y *Escherichia coli* UH302-pST13. *Salmonella typhi* CVD908 (carril 9) no presenta la banda de 36 KDa, en tanto que en la cepa *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 (carril 8) si se observa.

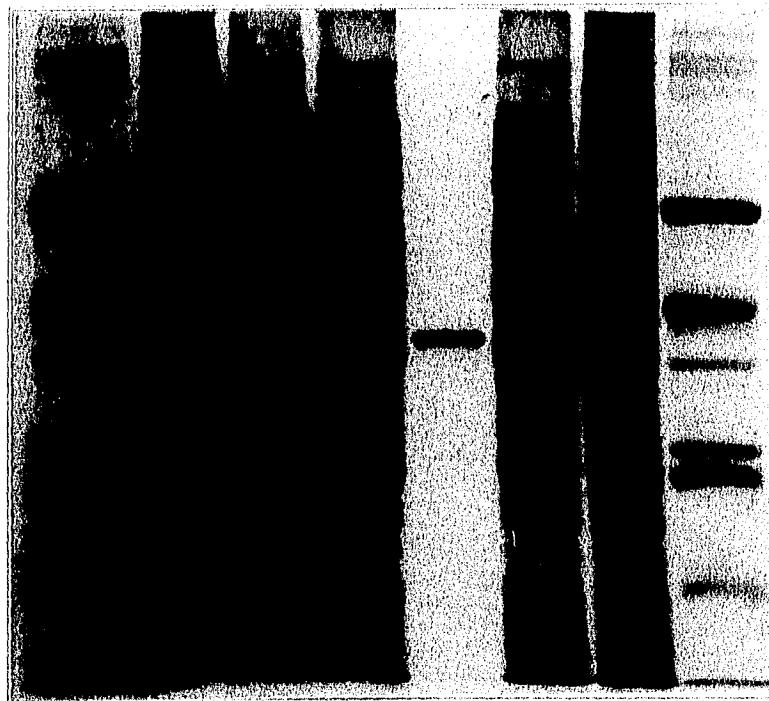
6.2 Detección del gene *ompC* en *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63.

Para determinar si la cepa *Salmonella typhi* CVD908 contiene alguna defeción en el locus *ompC*, se amplificó el gene que codifica para la porina OmpC a partir del codón de iniciación, de acuerdo a la secuencia publicada (44). En la Figura No. 3 se presenta el resultado de un experimento representativo. Se incluyeron como controles *Escherichia coli* UH302 (carril 2) y *Escherichia coli* UH302 transformada con el plásmido pST13. Se observa que en todas las cepas de *Salmonella typhi* se amplificó un fragmento de 1.2 Kb que es el tamaño esperado del amplicón y por lo tanto el fragmento codificante se encuentra completo. En el experimento que se presenta en la Figura No.3 se observa una banda tenue en el carril que corresponde a *Escherichia coli* UH302, la cual se trata probablemente de amplificación inespecífica. En experimentos posteriores, en condiciones de mayor astringencia, se confirmó que esta cepa no contiene el gene *ompC*. La digestión con la enzima KpnI en los productos de 1.2 Kb las diferentes cepas dio como resultado la banda esperada de 0.8 Kb. Por otro lado, se realizó un ensayo de "Southern blot" para lo cual se digirió DNA cromosomal de las diferentes cepas de *Salmonella typhi* con la enzima KpnI y, después de someterlas a electroforesis en agarosa, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y a hibridación con una sonda del fragmento KpnI-KpnI del plásmido pST13. En la Figura No. 4 se presenta el resultado. El carril 1 corresponde al plásmido pST13 sin digestión. El carril 2 muestra el fragmento KpnI-KpnI de 0.8 Kb. *Escherichia coli* UH302 (carril 3) no presenta la señal que

FIGURA No. 1

PATRON ELECTROFORÉTICO DE *Salmonella typhi* Ty2,
Salmonella typhi CVD908 Y *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63

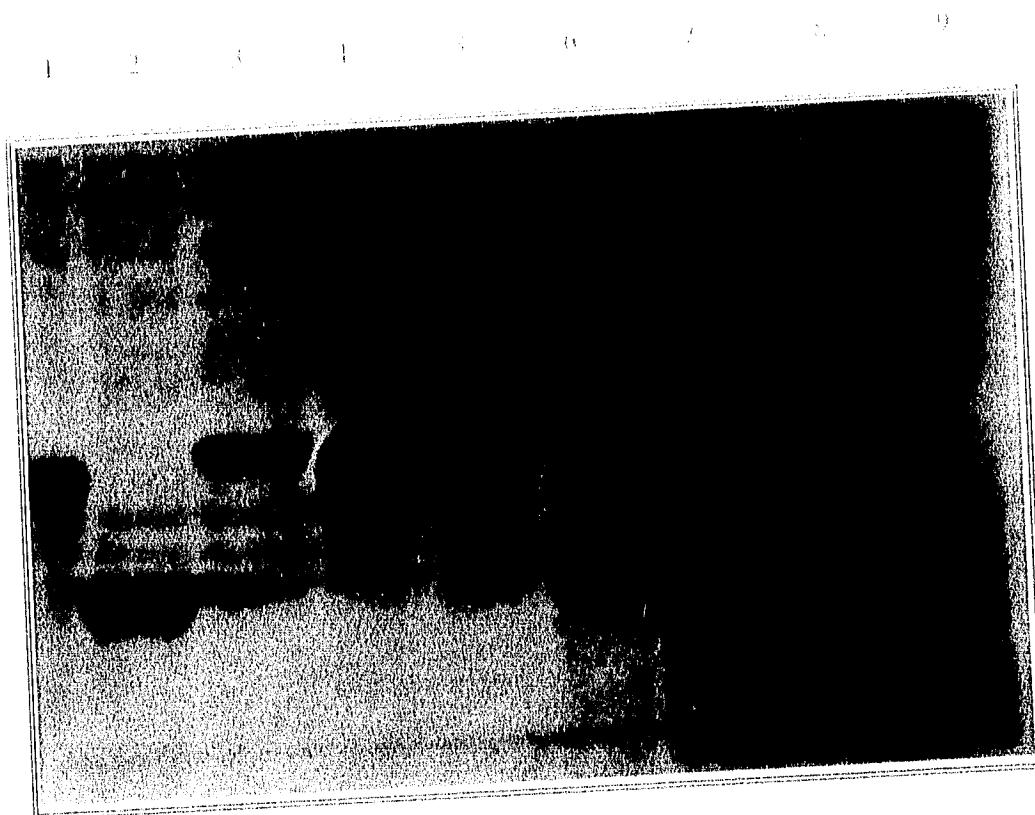
1 2 3 4 5 6 7 8



La electroforesis de extracto crudo de cada una de las diferentes cepas se realizó en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. El gel separador contenia 12% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida y 0.19% de SDS. Se resuspendieron 1.5×10^9 /ml bacterias en amortiguador de muestra y se hirvieron por 10 minutos. Se emplearon 5 volts/cm, los geles se tiñeron en azul de Coomassie R 250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron en una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85). Carriles 1) Marcadores de peso molecular; 2) *Salmonella typhi* CVD908; 3) *Salmonella typhi* Ty2; 4) *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63; 5) OmpC recombinante de *Salmonella typhi* purificada a partir de *Escherichia coli* UH302-pST13; 6) *Escherichia coli* UH302-pST13; 7) *Escherichia coli* UH302; 8) Marcadores de peso molecular.

FIGURA 2

PATRON ELECTROFORÉTICO DE *Salmonella typhi* CN1908,
Salmonella typhi CN1908 y *Salmonella typhi* Ty2

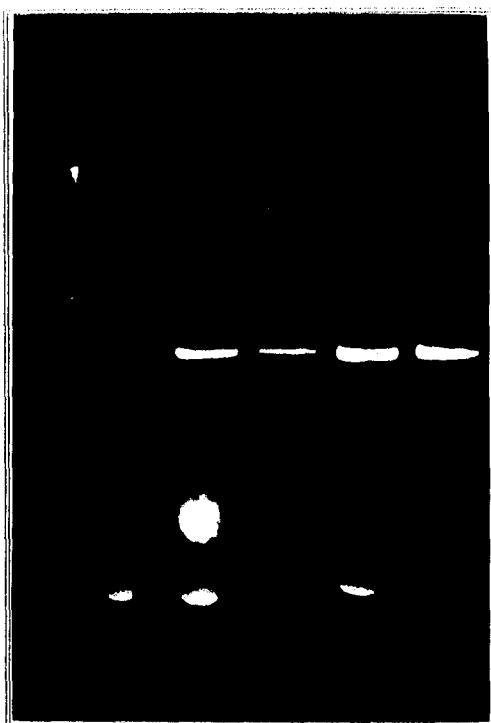


La electroforesis de proteínas de membrana extrema de cada una de las diferentes cepas se realizó en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. El gel separador contenía 1.2% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida y 0.19% de SDS. Se resuspendieron 30µg de proteínas en amortiguador de muestra y se hirvieron por 10 minutos. Se emplearon 5 volts/cm; los geles se tincieron en azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destincaron en una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85). Carriles: 1) Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa; 2) Albumina de huevo; 3) y 4) OmpC recombinante de *Salmonella typhi* purificada a partir de *Escherichia coli* UII302-pST13; 5) *Salmonella typhi* Ty2; 6) *Escherichia coli* UII302 pST13; 7) *Escherichia coli* UII302; 8) *Salmonella typhi* CN1908QMGp53; 9) *Salmonella typhi* CN1908.

FIGURA No. 3

AMPLIFICACION DEL GEN *ompC*, A PARTIR DE *Salmonella typhi* CVD908, *Salmonella typhi* CVD908 Ty2 Y *Salmonella typhi* Ty2

1 2 3 4 5 6



A partir de DNA genómico de las diferentes cepas de *Salmonella typhi*, purificado con TRIzol™, se procedió a amplificar mediante (PCR) el gene *ompC* de acuerdo a las condiciones descritas en Material y Métodos, utilizando como "primers" los siguientes oligonucleótidos: 5'CGG GAA GCT TAG GAG TAA TTA AAA TGG ATA TCG TCG AAA TTT ATA ATA AAG ACG GCA ACA AA 3' y 5'CGG GGG ATC CTT AGA ATT CGA ACT GGT AAA CCA GAC CCA G 3'. Como control se incluyó el plásmido pST13. Carriles 1) "Ladder" de 1Kd 2) *Escherichia coli* U11302; 3) *Escherichia coli* U11302-pST13; 4) *Salmonella typhi* CVD908; 5) *Salmonella typhi* Ty2; 6) *Salmonella typhi* CVD908QMGP63.

corresponde a *ompC*. *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63 presentan la señal que corresponde a *ompC*. En el carril 6 se presenta la hibridación de *Salmonella typhi* CVD908 transformada con pST13. Se obtuvo una señal débil en el tamaño que corresponde al fragmento KpnI-KpnI, debido a probablemente a que se corrió una cantidad escasa de DNA. Sin embargo, se observa claramente que *Salmonella typhi* CVD908 tiene el gene que codifica para *ompC*.

6.3 Detección de RNA mensajero de la porina OmpC en *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63.

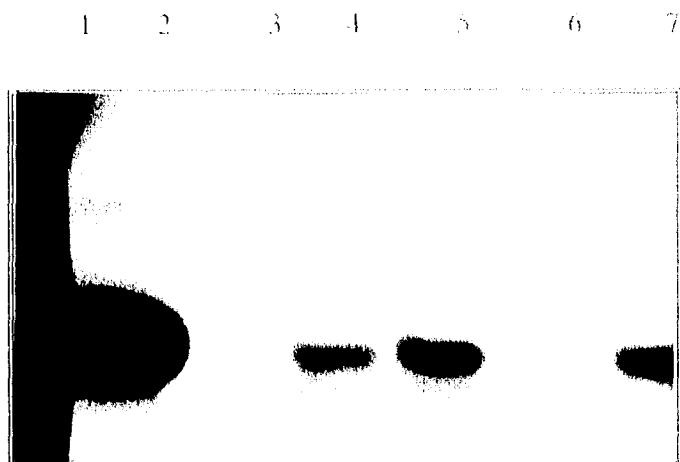
Una vez confirmado que no existen deletiones en el locus *ompC* en *Salmonella typhi* CVD908, se determinó la presencia de RNA mensajero para OmpC en las diferentes cepas de *Salmonella typhi* mediante RT-PCR. La Figura No. 5 presenta el resultado de un experimento. En la retrotranscripción se utilizó el "primer" reverso de *ompC*. Como testigo negativo se utilizó RNA purificado a partir del mastocitoma de ratón P815 (carril 2). En todas las cepas examinadas, excepto *Escherichia coli* UH302 (carril 7), se obtuvo el producto esperado de 1.2 Kb. Las señales más intensas se observan en *Escherichia coli* UH302-pST13 (carril 8) y *Salmonella typhi* Ty2 (carril 6), en tanto que la señal más débil corresponde a *Salmonella typhi* CVD908 (carril 3). Estos resultados son compatibles con la determinación de RNA mensajero que se realizó mediante "Northern blot". En la Figura No. 6 se observa que la cepa *Escherichia coli* UH302 no produce RNA mensajero de OmpC (carril 1), en tanto que el resto de las cepas examinadas (*Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63) sí lo hacen. La señal más intensa se encontró con *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 (carril 3).

6.4. Expresión de la proteína OmpC en *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63.

Una vez que se estableció que *Salmonella typhi* CVD908 contiene funcional el gene *ompC*, se procedió a identificar a la proteína. En la Figura No. 7 se presentan dos inmunoelectrotransferencias ("Western blot") que demuestran que todas las cepas examinadas producen la proteína OmpC. En el panel A se presentan los resultados utilizando un suero hiperinmune de conejo y en el panel B se presentan los resultados que se obtuvieron al revelar con un anticuerpo monoclonal contra la porina OmpC. Estos resultados confirman que las tres cepas de *Salmonella typhi* producen la proteína OmpC. Para comparar el grado de expresión de OmpC en *Salmonella typhi* Ty2 y en *Salmonella typhi* CVD908 se realizó citofluorometría. La Figura No.8 presenta una comparación entre los resultados obtenidos al utilizar un suero policlonal de conejo contra OmpC (panel A) o un anticuerpo monoclonal contra esta proteína (panel B). Se observa que en ambos casos, utilizando las mismas condiciones de cultivo para ambas cepas y el mismo número de células, la fluorescencia es menor en CVD908, lo que demuestra que existe menor expresión de OmpC en la superficie bacteriana de esta cepa.

FIGURA No. 1

DETECCION DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA OmpC EN
Salmonella typhi CVD908,
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2

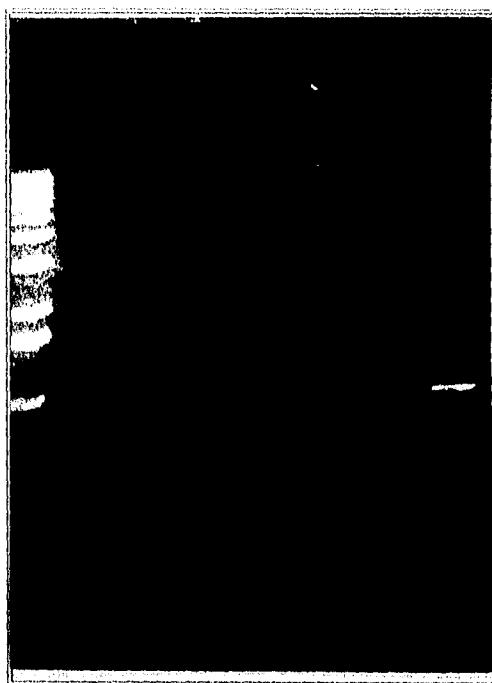


Se realizó "Southern blot" de acuerdo al procedimiento descrito en Material y Métodos. Se digirieron 10 µg de DNA cromosomal con KpnI, se corrió un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La hibridación se realizó utilizando como sonda el fragmento KpnI-KpnI de 0.8 Kb del plásmido pST13, mareado con ³²P y se expuso en una película (Kodak) durante 24 hrs. 1) pST13 sin digerir; 2) fragmento KpnI-KpnI de pST13; 3) *Escherichia coli* UI1302; 4) *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63; 5) *Salmonella typhi* CVD908; 6) *Salmonella typhi* CVD908-pST13; 7) *Salmonella typhi* Ty2.

FIGURA No. 5

EXPRESION DEL GENE *ompC*, A PARTIR DE *Salmonella typhi* CVD908,
Salmonella typhi CVD908 Y *Salmonella typhi* Ty2

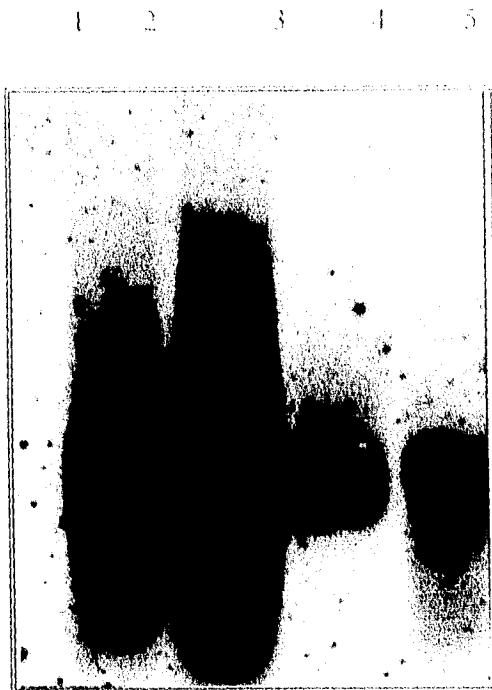
1 2 3 4 5 6 7 8



De acuerdo al procedimiento descrito en Material y Métodos, se obtuvo cDNA mediante retrotranscripción utilizando el "primer" reverso específico del gene *ompC* y se amplificó por PCR la secuencia específica del mensajero de *ompC*. Como controles se incluyeron el plásmido pST13 y una línea celular no relacionada. Carriles 1) "Ladder" de 1Kd; 2) Mastocitoma p815; 3) *Salmonella typhi* CVD908; 4) *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63; 5) *Salmonella typhi* CVD908ΩCSP; 6) *Salmonella typhi* Ty2; 7) *Escherichia coli* U11302; 8) *Escherichia coli* U11302-pST13.

FIGURA No. 6

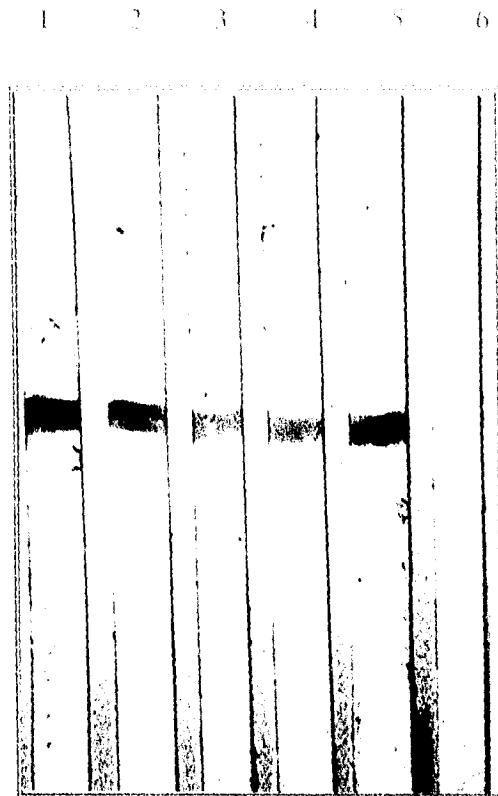
DETECCION DE RNA MENSAJERO PARA LA PROTEINA OmpC EN
Salmonella typhi CVD908,
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2



La determinación de RNA mensajero se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en Material y Métodos. Se purificó RNA por la técnica de Trizol, se cuantificó espectrofotométricamente y se sometió a electroforesis en agarosa al 1%. Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La hibridación se realizó utilizando como sonda el fragmento KpnI-KpnI del plásmido pST13 marcado con ^{32}P y se expuso en una película durante 24 hrs. 1) *Escherichia coli* UH302; 2) *Salmonella typhi* CVD908; 3) *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63; 4) *Escherichia coli* UH302-pST13; 5) *Salmonella typhi* Ty2.

FIGURA No. 7

EXPRESION DE LA PORINA OmpC EN *Salmonella typhi* CVD908,
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2



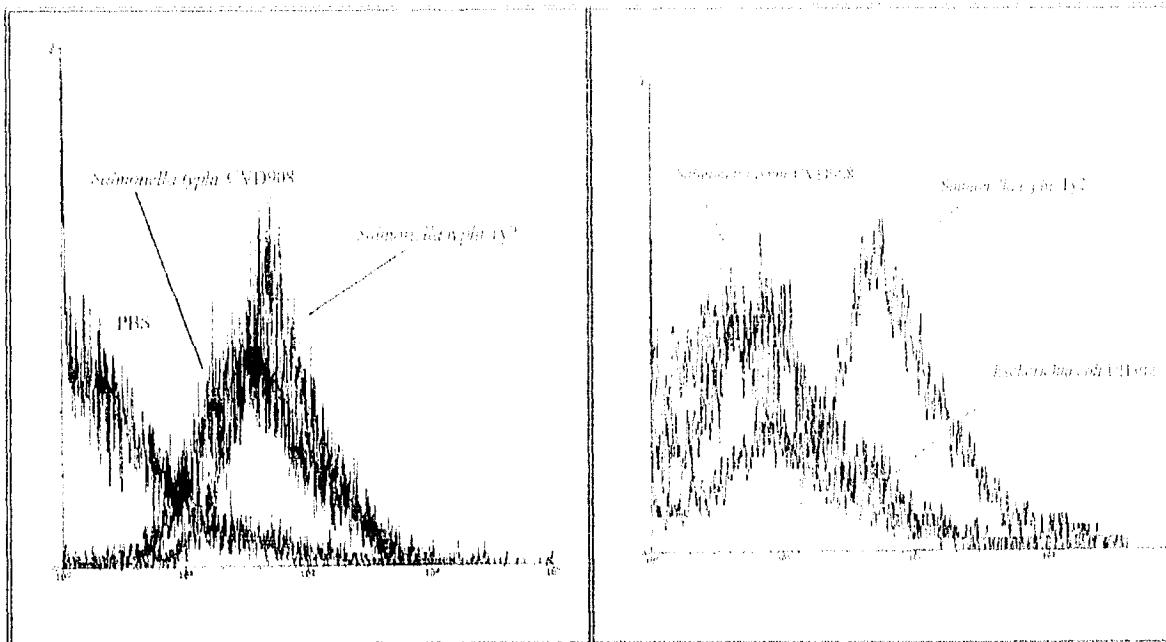
Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ , en una unidad de transferencia electrónica por 3 hrs a 0.5 A de acuerdo al método de Towbin. Posterior a esto el papel de nitrocelulosa se bloqueó por 1 hr con PBS-leche al 5%, y se puso en contacto con un anticuerpo monoclonal contra la porina OmpC de *Salmonella typhi*. El anticuerpo se empleó en una dilución 1:1000 en PBS-leche al 5% durante 1 hr a 37°C y se procedió a lavar en las mismas condiciones que se mencionan en materiales y métodos; se adicionó el segundo anticuerpo revelador que fue un anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:1000 durante 45 min. La reacción se reveló con α -4-Cloro nافتol-H₂O₂. Todo esto se realizó a una temperatura de 37°C. Carriles 1) *Salmonella typhi* Ty2; 2) *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63; 3) *Salmonella typhi* CVD908ΩCSP; 4) *Salmonella typhi* CVD908; 5) *Escherichia coli* UHL302-pST13; 6) *Escherichia coli* UHL302.

FIGURA No. 8

COMPARACION DE LA EXPRESION DE OmpC EN *Salmonella typhi* Ty2 Y *Salmonella typhi* CVD908 POR CITOFLUOROMETRIA

A

B



La presencia de la proteína OmpC en superficie de las cepas *Salmonella typhi* Ty2 y CVD908, se determinó por inmunofluorescencia indirecta empleando un suero hiperimmune de conejo inmunizado con OmpC recombinante y un anticuerpo monoclonal. Como segundo anticuerpo se empleó inmunoglobulina de cabra anti-IgG de ratón o conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína. Se analizaron 10³ bacterias en un citómetro de flujo FACScan. Panel A. Análisis con un anticuerpo polifonal de conejo contra OmpC de *Salmonella typhi*. Panel B. Análisis con un anticuerpo monoclonal contra ompC de *Salmonella typhi*.

6.5 Sensibilidad al cloramfenicol en *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63.

Una vez que se demostró que *Salmonella typhi* CVD908 contiene funcional el gene *ompC*, pero que el grado de expresión de la proteína es menor en esta cepa, comparada con *Salmonella typhi* Ty2, se decidió evaluar si estas diferencias tienen alguna repercusión sobre las actividades biológicas de *Salmonella typhi*. Se evaluó la sensibilidad al cloramfenicol en *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63. En la Figura No. 9 se presenta un experimento representativo. Se observó que *Salmonella typhi* CVD908 creció más eficientemente en cloramfenicol que el resto de la cepas, en tanto que no se presentó desarrollo de *Salmonella typhi* Ty2 en presencia del antibiótico y *Salmonella typhi* CVD908 tubo un crecimiento intermedio. Como control se incluyó una cepa de *Salmonella typhi* CVD908 transformada con el plásmido pST13. En esta cepa se restituye la sensibilidad al cloramfenicol, hasta los 200 minutos de cultivo aproximadamente, tiempo en que la cepa recupera su velocidad de crecimiento. Aunque para crecer esta cepa se adicionó ampicilina al medio de cultivo, la recuperación de la velocidad de crecimiento se debe probablemente a consumo del antibiótico e inestabilidad del plásmido.

6.6. Inmunogenicidad de *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63.

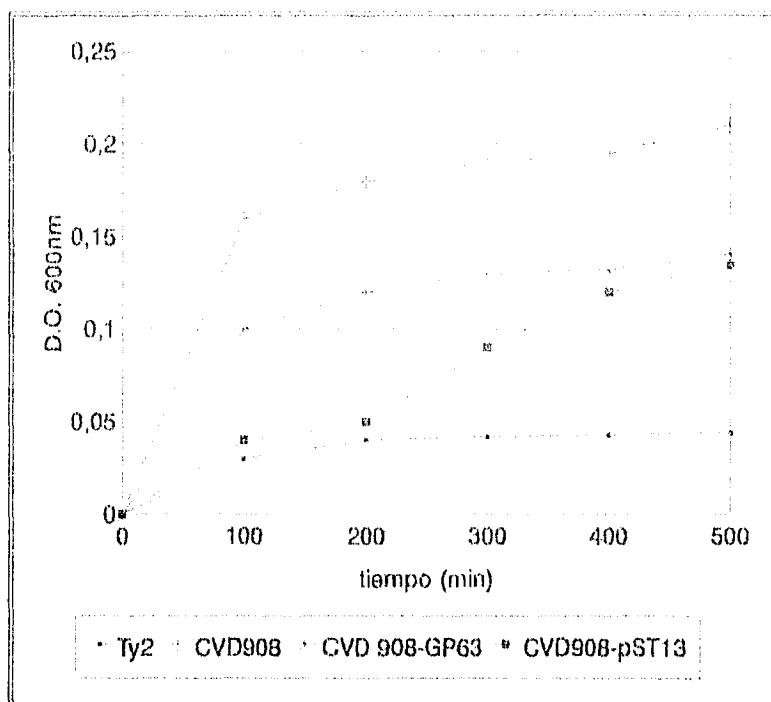
Una vez que se estableció que *Salmonella typhi* CVD908 expresa menor cantidad de OmpC y que esto puede explicar la mayor resistencia al cloramfenicol, se decidió evaluar algunas la inmunogenicidad de esta cepa, comparada con *Salmonella typhi* Ty2 y CVD908ΩMGP63. Se inmunizaron por vía oral ratones BALB/c con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 o CVD908ΩMGP63 y se determinaron anticuerpos contra la porina OmpC por ELISA. La Figura No. 10 presenta los resultados de un experimento en el que se utilizó el suero de ratón diluido 1:200. Se observa que los animales que fueron inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 tienen menor título de anticuerpos contra la porina OmpC que aquellos que fueron inmunizados con *Salmonella typhi* Ty2 o *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63.

Se evaluó la respuesta linfoproliferativa *in vitro* contra la porina OmpC, que se genera inmunizando por vía oral con las diferentes cepas de *Salmonella typhi*. En la Figura No. 11 se presenta el resultado de un experimento en el que se purificaron esplenocitos de ratones inmunizados con las diferentes cepas bacterianas y que fueron cultivados con OmpC recombinante. Se agregó polimixina B al cultivo para eliminar la proliferación inducida por LPS contaminante. Se observa que la mejor respuesta proliferativa se presentó en los ratones que fueron inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63.

También se trató de explorar la inducción de células citotóxicas mediante la inmunización por vía oral con las diferentes cepas de *Salmonella typhi*. Para lo cual se extrajeron esplenocitos de los ratones inmunizados y se estimularon *in vitro* con porina OmpC recombinante y se utilizó como célula blanco al mastocitoma de ratón P815 transfectado con el gene *ompC*. En la Figura No. 12 se presenta el resultado de un experimento representativo. La inmunización con cualquiera de las cepas de *Salmonella typhi* (Ty2, CVD908 o CVD908ΩMGP63) genera pobre respuesta de células citotóxicas. En varios experimentos se encontró que el mejor de los casos se induce un 10% de citotoxicidad específica. Por último, se comparó la protección que inducen las diferentes cepas de *Salmonella typhi*, para lo cual se inmunizaron por vía oral grupos de ratones con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 o CVD908ΩMGP63 y se retaron con 100 DI₅₀ de *Salmonella typhi* Ty2 resuspendida en mucina por vía intraperitoneal. En la Tabla No.1 y la Figura No.13 se presenta el resultado de cuatro experimentos independientes. Puede observarse que cuando se inmunizó con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 o CVD908ΩMGP63 y se retó con 1×10^6 bacterias resuspendidas en mucina administradas i.p. (*Salmonella typhi* Ty2) se presentó menor sobrevivencia en los grupos de CVD908 y CVD908ΩMGP63. En cambio, cuando se retó con 1×10^5 bacterias no se observaron diferencias entre los diferentes grupos.

FIGURA No. 9

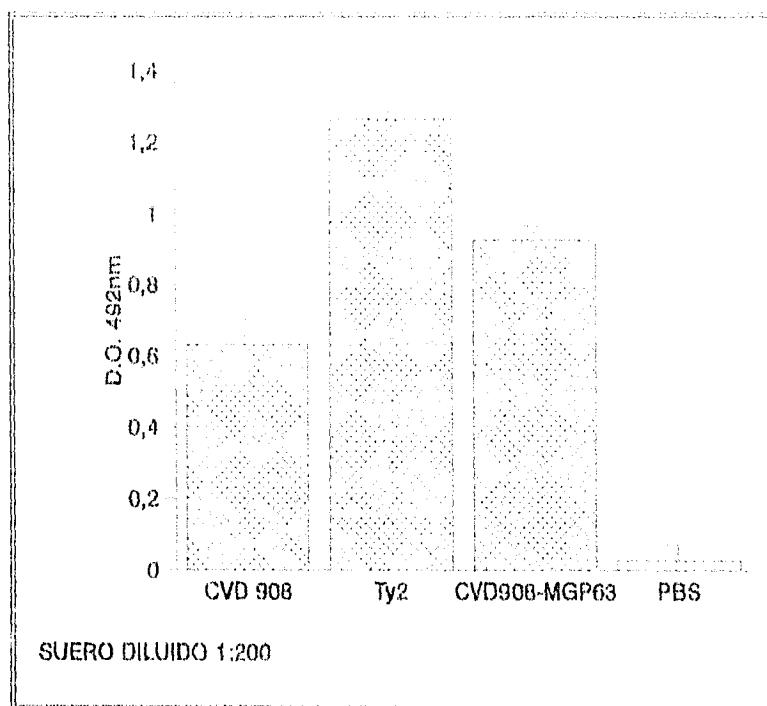
SENSIBILIDAD AL CLORAMFENICOL DE *Salmonella typhi* CVD908,
Salmonella typhi CVD908 Ω MGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2



Se determinó la resistencia a cloramfenicol de las cepas *Salmonella typhi* Ty2, CVD908, CVD908 Ω MGP63 y CVD908 transformada con el plásmido pST13, de acuerdo al procedimiento descrito en Material y Métodos. Se crecieron las diferentes cepas bacterianas en medio BHI en matraces nefelométricos adicionándoles una concentración de 40 μ g de cloramfenicol. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro, a una longitud de 600nm, cada 100 min hasta los 500 min.

FIGURA No.10

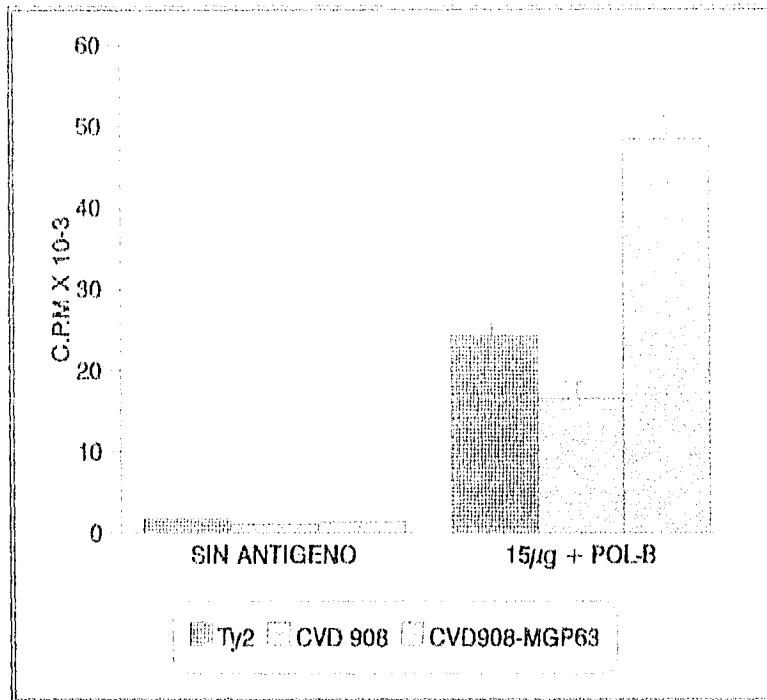
DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA OmpC EN RATONES
INMUNIZADOS CON *Salmonella typhi* CVD908,
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2



La ELISA se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en Material y Métodos. Se recubrieron placas para microfiliación con 15 µg de un proteína OmpC recombinante, en amortiguador de carbonatos pH 9.5. Para bloquear se adicionaron 100 µl/pozo de una solución de PBS-Leche al 5%, por 1 hr. El 1er. anticuerpo consistió en el suero de los grupos de ratones inmunizados con las diferentes cepas de *Salmonella typhi*, diluido 1:200 en PBS-leche 5%. Se incubó la placa a 37 °C por 2 hrs, y se adicionó un conjugado anti Igs de raton diluido 1:1000 y se incubó 1 hrs. Se adicionó como sustrato O-fenilendiamina de un stock de 6mg/12ml, para preparar la mezcla se empleó amortiguador de citratos de pH 5.6. Se detuvo la reacción a los 10 minutos de incubación adicionando 50 µl por pozo de H₂SO₄ y se midió la absorbancia a 492 nm. Entre cada paso se realizaron 4 lavados con una mezcla de PBS-Tween 20 al 0.1%

FIGURA No. 11

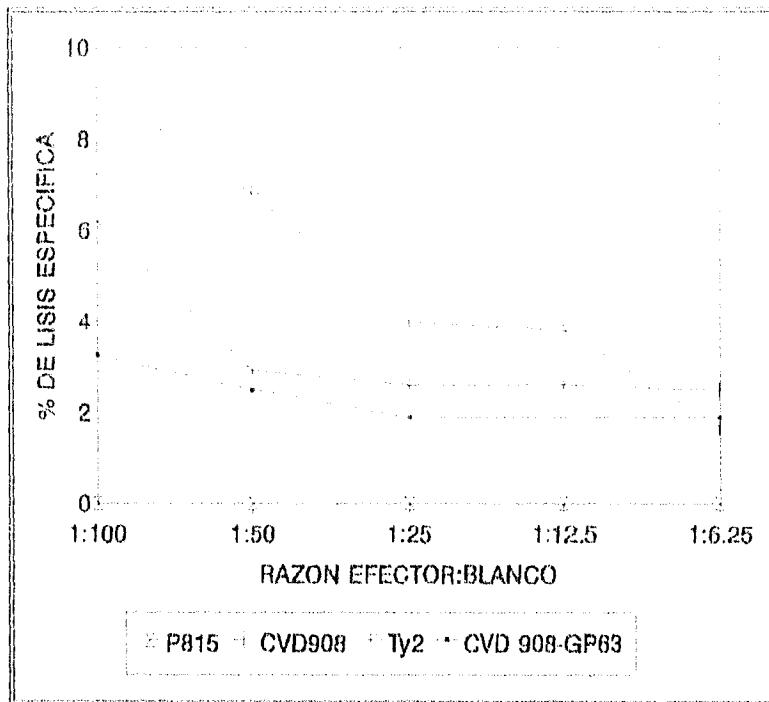
RESPUESTA PROLIFERATIVA CONTRA OmpC INDUCIDA POR
Salmonella typhi CVD908,
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2



Los ensayos de proliferación se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en Material y Métodos. Grupos de 10 ratones Balb/c se inmunizaron con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63. Se cultivaron 2×10^5 esplenocitos en placas de microcultivo de 96 pozos y fondo plano en presencia de 50 μg/ml de OmpC recombinante de *Salmonella typhi*. Se incubaron 5 días a 37 °C y 5% de CO₂. Dieciocho hrs antes de terminar el cultivo se agregó 1 μCi de ³H-Timidina por pozo. Las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio y la incorporación del material radioactivo se cuantificó en un contador de Centelleo Líquido. Los resultados se encuentran expresados en c.p.m.

FIGURA No. 12

CIOTOTOXICIDAD CONTRA LA PORINA OmpC INDUCIDA POR
INMUNIZACION CON *Salmonella typhi* CVD908,
Salmonella typhi CVD908ΩMGP63 Y *Salmonella typhi* Ty2



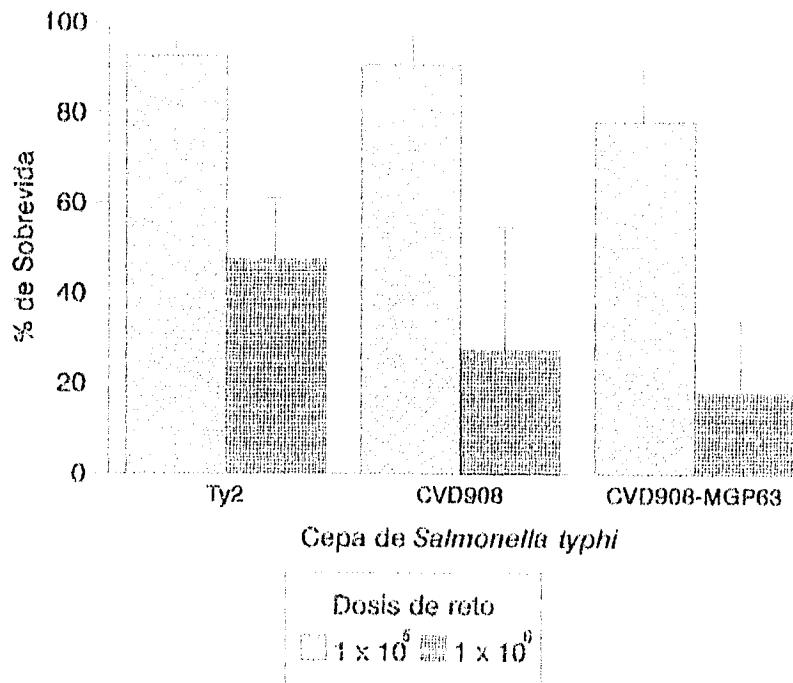
La evaluación de células citotóxicas se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos en Material y Métodos. Se obtuvieron células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con las diferentes cepas de *Salmonella typhi*. Se reestimularon 30×10^6 células con $100 \mu\text{g/ml}$ de OmpC recombinante de *Salmonella typhi* durante cinco días y se cultivaron 4 hrs en presencia de células P815 o P815-OmpC marcadas con ^{51}Cr . Se prepararon relaciones célula blanco:célula efectora de 1:100, 1:50, 1:25, 1:12.5, 1:6.25. Como testigo de liberación espontánea de ^{51}Cr se prepararon pozos con medio RPMI y células blanco; como testigo de liberación máxima de ^{51}Cr se prepararon pozos con células blanco y SDS al 20%. Se cuantificó la radioactividad en un contador gamma, las muestras se analizaron por triplicado y se calculó la citotoxicidad específica de acuerdo a la fórmula que se describe en Material y Métodos.

TABLA No. 4

PROTECCION INDUCIDA MEDIANTE INMUNIZACION
CON *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΔMGP63

CEPA BACTERIANA	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Experimento 4	
DOSIS LETALES	10	100	10	100	10	100	10	100
BACTERIAS ADMINISTRADAS	1×10^5	1×10^6						
<i>Salmonella typhi</i> Ty2	90	40	90	40	100	70	90	40
<i>Salmonella typhi</i> CVD908	80	20	90	10	100	70	90	10
<i>Salmonella typhi</i> CVD908ΔMGP63	90	0	80	20	90	40	62.5	12.5

FIGURA No.13



Para estos ensayos se utilizaron siete grupos de diez ratones BALB/c. Seis fueron inmunizados con 1×10^6 bacterias de la cepa *S. typhi* Ty2, *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΔMGP63 en 100μl de PBS (dos grupos por cepa). Al séptimo grupo se le administró 100μl de PBS, de acuerdo al esquema descrito en Material y Métodos. Una semana después de la última dosis se retaron por inoculación intraperitoneal con 1×10^6 bacterias de *Salmonella typhi* Ty2 en 100μl de mucina al 5%. Se observó la supervivencia durante 10 días después del reto.

VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se reporta la observación inesperada de que una cepa atenuada de *Salmonella typhi*, que contiene deletiones en *loci aroC* y *aroD*, expresa de manera alterada la proteína OmpC.

Salmonella typhi CVD908 fue construida en el Centro para Desarrollo de Vacunas (CDVAM, Baltimore, MD, EUA) mediante técnicas de ingeniería genética utilizando recombinación homóloga (47). A partir del plásmido pKTN701 (71) que contiene el origen de replicación R6K, se substituyó el alelo *bla* por el gene *cat* que confiere resistencia al cloramfenicol y se insertó el gene *AroC* y el plásmido resultante se denominó CVD1019; cuando se insertó el gene *AroD* el plásmido se denominó CVD1013. Con estos plásmidos se transformó *Salmonella typhi* Ty2. La cepa resultante denominó CVD908. En ensayos clínicos fase I resultó ser inmunogénica y segura (48).

Considerando que *Salmonella typhi* CVD908 se obtuvo utilizando plásmidos que tienen la propiedad de recombinar de manera homóloga en el cromosoma bacteriano, se decidió utilizar esta cepa como acarreador de antígenos heterólogos. Para lo cual el plásmido CVD1019 se modificó generando un sitio único de clonación (PstI) en medio del alelo *AroC*, el plásmido resultante se denominó pGORBY (49). En pGORBY se insertó el promotor *pTae* y la región "polylinker" del plásmido pKK223-3, resultando el plásmido pM7. En el plásmido pM7 se insertó, bajo el control del promotor *pTae* el gene que codifica para la proteína principal del promastigote (GP63) de *Leishmania mexicana* y se transformó en *Salmonella typhi* CVD908, la cepa resultante se denominó *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 (52).

El comportamiento electroforético de *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMGP63 es diferente. *Salmonella typhi* CVD908 no presenta la proteína de 36 KDa que pudiera corresponder a OmpC, en tanto que *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63, que proviene de ella, de manera sorprendente, sí la presenta. La evidencia más fuerte de que efectivamente la proteína que no se observa en el corrimiento electroforético corresponde a OmpC, descansa en la citofluorometría (FACS), sobre todo utilizando el anticuerpo monoclonal contra OmpC. Sin embargo, para confirmar esta suposición sería importante realizar electroforesis bidimensional y sensibilidad al fago P221 o P1151 cuyos receptores específicos son OmpC u OmpF (44).

El gene *ompC* se encuentra completo en las cepas analizadas. Esta es una observación importante pues como CVD908 se obtuvo por recombinación homóloga, existe la posibilidad de haber causado una delección inesperada en este *locus*. Como se explicó anteriormente, para obtener la cepa CVD908 se transformó *Salmonella typhi* Ty2 con un plásmido que confiere resistencia al cloramfenicol. Por tanto, también existe la posibilidad de haber seleccionado cepas malas productoras de OmpC por alguna otra alteración genómica. Sin embargo, el hecho de que *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63, que proviene de CVD908, presente expresión de OmpC semejante a la observada en *Salmonella typhi* Ty2, descarta esta posibilidad. Es interesante la observación de que *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 produce mayor cantidad de RNA mensajero de OmpC que el resto de las cepas. Es importante hacer notar que esta cepa contiene un promotor foráneo (*pTae*) en medio del *locus AroC* y que el gene de la GP63 se encuentra insertado en contrasentido al promotor natural de *aroC*. Esta observación sugiere que existe un mecanismo regulatorio entre la expresión de OmpC y *aroC* probablemente a nivel transcripcional o postranscripcional. Para establecer de manera más fina el papel de *aroC* y *aroD* en la expresión de OmpC, será necesario aislar ambos genes y realizar experimentos de transcomplementación en *Salmonella typhi* CVD908 utilizando plásmidos compatibles.

Se ha logrado obtener el mapa genómico parcial de *Salmonella typhi* Ty2 y se sabe que difiere notablemente del de otras especies de como *Salmonella typhimurium* LT2 pues contiene inserciones e inversiones (72). Se conoce la localización de *ompC* y *ompD* no se ha reportado la correspondiente a *aroC* o *aroD*. Sin embargo, en *Salmonella typhimurium* ambos loci se

encuentran separados por 1.5 min aproximadamente (73).

Considerando que se han descrito cepas mutantes de *Salmonella typhi* que no expresan la porina OmpC y consecuentemente son resistentes al cloramfenicol (55), los resultados obtenidos cuando las diferentes cepas bacterianas se crecieron en presencia de este antibiótico, son compatibles con la hipótesis de que la proteína cuya expresión está disminuida es OmpC. Sobre todo considerando que *Salmonella typhi* CVD908, al ser transformada con el plásmido pST13 se revierte a cloramfenicol sensible.

Todos los experimentos se realizaron utilizando BH1 y las mismas condiciones de cultivo. Considerando que casi la tercera parte de los aminoácidos que componen OmpC⁺ son aromáticos, la deficiente expresión de esta proteína pudiese deberse solo a la escasez de estos aminoácidos, que CVD908 no es capaz de producir. Sin embargo, el hecho de que *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 recupere la expresión, descarta esta posibilidad. Sin embargo, es necesario explorar el comportamiento electroforético de estas cepas bajo diferentes condiciones de cultivo, como son temperatura, pH, osmolaridad y diferentes fuentes y proporciones de carbono o nitrógeno. Es posible que tanto *Salmonella typhi* CVD908 como CVD908ΩMGP63, incrementen su virulencia y patogenicidad bajo determinadas condiciones de cultivo.

La inducción de anticuerpos contra la porina OmpC, inmunizando ratones con las diferentes cepas bacterianas, también es compatible con la menor expresión de OmpC en *Salmonella typhi* CVD908. En varios experimentos independientes se encontraron menores D.O. por ELISA utilizando el suero a diluciones 1:200. Sin embargo, cuando los sueros se utilizan más concentrados no se observan diferencias en las D.O., lo que sugiere que la inmunización con *Salmonella typhi* CVD908 sí induce anticuerpos contra OmpC; si bien, en menor proporción que Ty2 o CVD908ΩMGP63. Este resultado es esperado, si consideramos que la proteína OmpC se encuentra hacia el exterior bacteriano y puede ser captada por el receptor específico del linfocito B. Los resultados de activación de linfocitos son, no obstante, más difíciles de explicar. *Salmonella typhi* Ty2 y CVD908 parecen inducir respuestas proliferativas de la misma magnitud, en tanto que *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63 induce la mayor activación específica contra OmpC. Este resultado pudiese ser compatible con la mayor producción de RNA mensajero que para esta proteína, presenta *Salmonella typhi* CVD908ΩMGP63. Es posible que se produzca mayor proteína, pero que no sea exportada a la superficie bacteriana. Por otro lado, los resultados de evaluación de células citotóxicas contra OmpC por la inmunización con las diferentes cepas bacterianas son tan pobres, que es difícil llegar a conclusiones. Se ha demostrado que *Salmonella typhi* CVD908 transfectada con la proteína CSP de *Plasmodium falciparum* induce células citotóxicas contra esta proteína (51) y contra antígenos de *Salmonella typhi* (74). En nuestro laboratorio se ha intentado reiteradamente inducir linfocitos T CD8⁺ contra OmpC mediante inmunización con *Salmonella typhi* o *Salmonella typhimurium*, con resultados semejantes a los que se reportan en este trabajo (67). La porina OmpC contiene en su secuencia, varios fragmentos con las características necesarias para unirse y estabilizar moléculas de clase I (K^d y D^d) de acuerdo al modelo de Falk (75). También se ha demostrado que antígenos particulados o solubles que ingresan a la vía exógena de procesamiento de antígeno, después de ser degradados a péptidos, son regurgitados al medio y son capaces de unirse a moléculas de clase I, funcionalmente vacías en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Este mecanismo, por medio del cual, los antígenos particulados que entran a la vía fagocítica pueden ser presentados a linfocitos T CD8⁺, parece ser muy ineficiente en el caso de las porinas. Probablemente, la compacta estructura terciaria de la proteína y el hecho de que se encuentra embebida en la membrana bacteriana, dificulta su degradación enzimática. Sin embargo, se ha demostrado que las porinas activan linfocitos T CD4⁺ eficientemente. Los experimentos tendientes a evaluar la capacidad de generar protección de las diferentes cepas bacterianas no son concluyentes. Aunque la tendencia que se observa cuando se retó con 1×10^6 bacterias parece indicar que existe menor protección cuando se inmuniza con *Salmonella typhi* CVD908 o CVD908ΩMGP63, las

diferencias no son notables. La observación que se presenta en el presente trabajo es importante, pues llama la atención sobre la necesidad de caracterizar ampliamente las cepas que se modifican mediante ingeniería genética y que se pretende sean utilizadas como vacunas.

IX. REFERENCIAS.

1. Kensch, G., and Ulea D. Invasive and tissue damaging enteric Bacterial Pathogens: Bloody Diarrhea and Dysentery. In: Mechanisms of microbial Disease. Shreecher, M., Medoff, G., Eisenstein, B. 2^a eds. Williams and Wilkins, USA, pp. 26-1380, 1993.
2. Hormaeche, C. *Salmonella* infection and immunity. In: The Encyclopedia of Immunology. Roitt, M., and Delves, P. eds. Academic Press, USA, pp. 1350-1352, 1992.
3. Cote, T.R., Convery, H., Robinson, D., Ries, A., Barret, T., Frank, L., Furlong, W., Horan, J., and Dwyer, D. J. Typhoid fever in the park: epidemiology of an outbreak at a cultural interphase. *Community Health*, 20:451-458, 1995.
4. Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., and Altwegg, M. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* 3:253-255, 1995.
5. Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Unico de Información. Vol.13 No.36 Semana 36, 1996.
6. Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., and Farmer III, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori*. *J. Clin. Microbiol.* 27:313-320, 1989.
7. Salander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A., and Musser, J.M. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars causing human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* 58:2262-2275, 1990.
8. Franco, A., González, C., Levine, O. S., Lagos, R., Hall, R.H., Hoffman, S.L., Moechtar, M.A., Gotuzzo, E., Levine, M.M., Hone, D.M., and Morris, J.G. Further consideration of the clonal nature of *Salmonella typhi*: evaluation of molecular and clinical characteristics of strains from Indonesia and Peru. *J. Clin. Microbiol.* 30:2187-2190, 1992.
9. Heneine, W., Matar, G., Reeves, M., and Swaminathan, B. Molecular characterization of *Salmonella typhi* isolates from patients with severe and mild typhoid fever. *Eur. J. Epidemiol.* 7:192-193, 1991.
10. Thong, K-L., Passey, M., Clegg, A., Combs, B.G., Yassin, R.M., and Pang, T. Molecular analysis of isolates of *Salmonella typhi* obtained from patients with fatal and nonfatal typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 34:1029-1033, 1996.
11. Sein, J., Cachicás, V., Becker, M.L., and De Ioannes, A.E. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol. Res.* 26:371-380, 1993.
12. Vidal, S., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. Natural Resistance to Infection with Intracellular Parasites: Isolation of Candidate for *beg*. *Cell* 73:469-485, 1993.
13. Mastroeni, P., Villareal, R., and Hormaeche, C. Transfer of Immunity to oral challenge with virulent *Salmonella* in inately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect. Immun.* 61:3981-3984, 1993.

14. Emoto, M., Naito, T., Nakamura, R., and Yoshikai, Y. Different appearance of T_H1 T cells during Salmonellosis between *ity*⁺ and *ity*⁻ mice. *J. Immunol.* 150:3411-3420, 1993.
15. Swanson, R., and O'Brien, A. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: *ity* gene is expressed in vivo by 24 hours after infection. *J. Immunol.* 131:3014-3020, 1983.
16. Benjamin, J., Hall, P., Roberts, S., and Briles, D. The primary effect of the *ity* locus is on the rate of growth of *Salmonella typhimurium* that are relatively protected from killing. *J. Immunol.* 444:3443-3451, 1990.
17. Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiane, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., and Gros, P. The *ity-1/sh-Bcg* locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.* 182:655-666, 1995.
18. Huckstep, R. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed. E. S. y S. Livingstone, L.T.D., London, pp. 4-9, 1983.
19. Tully, J., Gaines, S. and Tigertt, W. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. *J. Infect. Dis.* 112:118-124, 1963.
20. Makela, H. Immunization with outer major membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25:857-862, 1979.
21. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. Characteristics of live vaccines in relations to delayed-type hypersensitivity and protective in murine salmonellosis. *Immunology Letters* 6:299-302, 1983.
22. Tite, J., Gao, X., Hughes, C., Lipsombe, M., O'Callaghan, D., Dougan, G., and Liew, F. Antiviral immunity induced by recombinant nucleoprotein of influenza a virus H1N1. Delivery of recombinant nucleoprotein to the immune system using attenuated *Salmonella typhimurium* as a live carrier. *Immunology.* 70:701-708, 1990.
23. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. Protective immunity by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55(3):816-821, 1987.
24. Udhayakumar, V., and Muthukkaruppan, V. Protective immunity induced by porin against *Salmonella* infection mice. *Indian J. Med. Res.* 89:121-127, 1989.
25. Muthukumar, S., and Muthukkaruppan, V. Mechanism of protective immunity induced by porin lipopolysaccharide against murine *Salmonellosis*. *Infect. Immun.* 61:3017-3025, 1993.
26. Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigens for delayed-type hypersensitivity in murine *Salmonellosis*. *Infect. Immun.* 55(3):822-824, 1987.
27. Killar, L., and Eisenstein, T. Delayed type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 52:504-508, 1986.

28. Galdiero, F., de L'Erò, G., Benedetto, N., Galdiero, M., and Tufano, M. Release of cytolines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 61:155-161, 1993.
29. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12. *Vid. Infect. Immun.* 56:2953-2959, 1988.
30. Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., García, J. and Kumate, J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* 10:811-813, 1992.
31. Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M., Martín, N., Ramírez, G., González, C., López C., Sánchez, J. and Kumate, J. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann of the New York Acad of Sci.* 730:350-353, 1994.
32. Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C. and Kumate, J. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. In: *Cell function and disease*. Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, F., and J. Jaz, J. eds. Plenum Press, New York, pp. 281-292, 1988.
33. Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Mry, M., González, C., García, J., Islas, S., and Kumate, J. Anticuerpos monoclonales anti-Lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12. *Vid. Análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea.* *Arch. Invest. Med. (Mex).* 20:315-320, 1989.
34. Ortiz, V., Isibasi, A., García, E. and Kumate, J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1640-1645, 1989.
35. Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C., and Kumate, J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infectol.* 25:73-80, 1993.
36. González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., García, J. and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 37:793-799, 1993.
37. Pamer, E. Cellular immunity to intracellular bacteria. *Curr. Op. Immunol.* 5:492-496, 1993.
38. Nikaído, H. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phago λ receptor protein. *Methods Enzymol.* 97:85-100, 1983.
39. Nikaído, H., Vaara, M., Neidhardt, F., Ingraham, J., Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H. Outer membrane. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: *Cellular and molecular Biology*. American Society for Microbiology Washington, D.C. pp. 7-22., 1987.
40. Cowan, S., Schirmer, G., Rummel, G., Steiter, M., Ghosh, R., Pauptit, R., Jansonius, J. and Rosenbusch, J. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature.* 358:727-733, 1992.

41. Overbeek, N., Bergmans, H., Van Massfeld, E. and Lugtenberg, B. Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 163:513-532, 1983.
42. Benz, R. and Bauer, K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* 176:1-19, 1988.
43. Venegas, A., Gómez, I., Zaror, I. and Yulkelevich, A. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene. *Nuc. Ac. Res.* 16:7715-7721, 1988.
44. Agüero, J., Mora, G., Mroczewski-Wildy, M., Fernández, M., Aron, L. and Cabello, F. Cloning expression and characterization of the 36 KDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microb. Pathogen.* 3:399-407, 1987.
45. Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J.L., and Calva, E. Isolation and characterization of ompS1, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene* 158:67-72, 1995.
46. Hone, D., Attridge, S., Bosch, L.D. and Hackett, J.A. Chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strain. *Microb. Pathog.* 5:407-418, 1989.
47. Hone, D., Harris, A., Chatfield, S., Dougan G., and Levine, M.M. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9:810-816, 1991.
48. Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonsky, G.A., Guers, L., Edelman, R., and Levine, M. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine*. 10:443-446, 1992.
49. Fouts, T.R., Lewis, G.K., and Hone, D.M. Construction and characterization of a *Salmonella*-based HIV-1 vector vaccine. In: *Vaccines 93 Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS* Ginsberg, H.S., Brown, F., Chanock, R.M., and Lerner, R.A eds. CSHL press, USA. pp. 95-100, 1993.
50. Girón, J.A., Xu, J.G., González, C.R., Hone, D., Kaper, J.B., and Levine, M.M. Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Δ *aroC*, Δ *aroD* *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908. *Vaccine*. 13:939-946, 1995.
51. González, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C.O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Szein, M.B., Heppner, D.G., Fouts, T.R., Isibasi, A., and Levine M.M. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: Strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J. Infect. Dis.* 169:927-931, 1994.
52. González, C., Noriega, F., Hone, D., Santiago, A., Levine, M., Kumate, J. and Isibasi, A. Construction of a candidate vaccine strain against *Leishmaniasis* using *Salmonella typhi* as live carrier of *Leishmania mexicana* GP63. *Arch. Med. Research.* 25:49, 1994.
53. Cole, S., Sonnatag, I., Henning, U. Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 149:145-150, 1982.

54. Reed, L. and Muench, H. A simple method of estimating fifty percent and points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497, 1938.
55. Toro, C., Lobos, S., Calderón, L., Rodríguez, M., and Mora, C. Clinical isolate of a pointless *Salmonella typhi* resistant to high levels of Chloramphenicol. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 34:1715-1719, 1990.
56. Schmittman, C.A. Effect of ethylenediamine tetraacetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108:553-563, 1971.
57. Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Garther, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 150:76-85, 1985.
58. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
59. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354, 1979.
60. Kissel, V., González, C., Astudillo, M., Godard, A., Wachman, B., and Cabello, F.C. *Salmonella*-specific monoclonal antibodies against recombinant *Salmonella typhi* 36-kilodalton porin. *Chil. Daign. Lab. Immunol.* 1:250-252, 1994.
61. Engvall, E. and Perlmann, P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 8:874-879, 1971.
62. Sambrook, K.J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. pp. 1.42-1.46., 1989.
63. Frankel, G., Newton, S.M.C., Schoolnik, G.K., and Sliker, B.A.D. Intragenic recombination in the flagellin gene: characterization of the H1-j gene of *Salmonella typhi*. *EMBO J* 8:3149-3152, 1989.
64. Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.
65. Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-505, 1975.
66. Chomezynski, P., and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.
67. López-Macias, C. Respuesta de Linfocitos T Citotóxicos Contra la Porina Omp C de *Salmonella typhi*. Tesis de maestría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.

68. Kessler, S. W. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody antigen complex with protein A. *J. Immunol.* 115:1617,1975.
69. Harlow, E., and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.,1988.
70. Wunderlich, J., and Shearer, G. Assays for T cell function. Induction and Measurement of cytotoxic T lymphocyte activity. In: *Current Protocols in Immunology*. Colligan, J.E., Knisbeck, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. eds. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, 1: 3.11.1-3.11.15, 1994.
71. Miller, V.L., Mekalanos, J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170:2575-2583,1988.
72. Liu, S-H., and Sanderson, K. Genomic cleavage map of *Salmonella typhi* Ty2. *J. Bacteriol.* 77:5099-5107,1995.
73. Sanderson, K.E., and Doney, D. Linkage map of *Salmonella typhimurium*. In: *Genetic Maps*. O'Brien, S.J. ed. VII Ed. Cold Spring Harbor, N.Y. USA. pp 2.3-2.21, 1990.
74. Szein, M.B., Tanner, M., Polotsky, Y., Orenstein, J.M., and Levine, M.M. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J. Immunol.* 155:3987-3993,1995.
75. Falk, K., Rötzelke, O., Stevanović, S., Jung, G., Rammensee, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296,1991.