



1064060  
01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACION PARCIAL DEL GENE  
*ompA* DE *Salmonella gallinarum*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**  
P R E S E N T A :  
**DELIA XOCHIL VEGA MANRIQUEZ**

TUTOR: DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ

COMITE TUTORAL: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES



MEXICO, D.F.,

SEPTIEMBRE DEL 2000



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.

DEDICATORIA

A Dios

A mi Madre María Guadalupe Manriquez B.

A mis sobrinos Liliana Alicia, Alejandro y Karen Alejandra  
Vega Armendáriz

## AGRADECIMIENTOS

A mis Asesores, principalmente a mi Tutor el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

A todos los miembros del Laboratorio de Microbiología Molecular, especialmente al MVZ Daniel Martínez Gómez

## AGRADECIMIENTOS

A mis Amigos, especialmente a Miguel Ángel Zárate Gómez

Al Dr. Jaime García Velásquez

A la Familia Pérez Hernández

A la Familia Contreras Ávila

Los ideales son como las estrellas: nunca las alcanzaremos.  
Pero igual que los marinos en alta mar,  
trazaremos nuestro camino siguiéndolas.

Jean Paul Sartre.

## INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	OBJETIVOS	19
IV.	MATERIALES Y METODOS	20
	Cultivo de la bacteria	20
	Purificación de las PME	20
	Cuantificación de PME	21
	Separación electroforética de las PME en geles desnaturalizantes de Poliacrilamida-SDS	22
	Tinción de plata y azul brillante de Coomassie	23
	Transferencia de los geles de poliacrilamida a membranas de polivinil difluoruro (PVDF)	24
	Secuenciación amino terminal de la PME de 30 kDa de <i>Salmonella gallinarum</i>	24
	Geles de doble dimensión	25
	Extracción de ADN	27
	Diseño de Iniciadores para PCR	27
	PCR	28
	Secuenciación nucleótídica	29
IV.	RESULTADOS	30
V.	DISCUSIÓN	47
VI.	CONCLUSIONES	54
VII.	APÉNDICE DE REACTIVOS Y SOLUCIONES	55
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	61

## RESUMEN

En el presente trabajo se reporta por primera vez la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, así como, la predicción de la estructura secundaria de OmpA de *Salmonella gallinarum*. *Salmonella gallinarum*, es el agente causal de la tifoidea aviar en las aves, es un bacilo Gram negativo que presenta en su membrana externa proteínas que pueden ser reguladas por diferentes condiciones ambientales. Con base en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se cultivó *S. gallinarum*, cepa FVB323, en caldo adicionado con 30% de suero sanguíneo (CNS) de aves libres de patógenos específicos (SPF), se extrajeron proteínas de la membrana externa (PME) y se observó una disminución en la expresión de una PME de 30 kDa en geles de poliacrilamida-SDS. Las proteínas se separaron en geles de doble dimensión, y se observó que era una proteína principal que disminuía su expresión en CNS. Se secuenció el extremo amino de dicha proteína encontrándose 100% de identidad con OmpA de *S. typhimurium*, se diseñaron iniciadores para amplificar el gene. La secuencia parcial del gene amplificado se comparó en un banco de genes y se encontró una identidad de 96 y 95% en nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, con *ompA* de *S. typhimurium*. Se concluye que la proteína que disminuye su expresión en CNS, de acuerdo a su perfil electroforético en geles de una y dos dimensiones, secuencia amino terminal y secuencia nucleotídica es OmpA de *S. gallinarum*.

## SUMMARY

The present work reports for the first time the nucleotide and amino acid sequences, as well as, the putative secondary structure of *Salmonella gallinarum* OmpA. *Salmonella gallinarum*, is the causal agent of fowl typhoid, it is a Gram negative bacillus that presents in its external membrane proteins that can be regulated by different environmental conditions. Preliminary data from our laboratory, showed a decrease in the expression of a 30 kDa OMP. This protein was separated in double dimension gels, and it was observed as a main protein that diminished its expression in nutritional broth added with 30% of sanguineous serum (NBS). The amino terminal secuencia of the protein showed an identity with *S. typhimurium* OmpA primers that amplify the gene. A Genbank sequence database search recognized a 96% and 95% identity of the partial secuencia with *S. typhimurium* OmpA, in nucleotides and amino acids respectively. Our results suggest that the protein that diminishes its expression in NBS, according to its electroforetic profile on one and two dimension gels, amino terminal and nucleotide sequences is *S. Typhimurium* OmpA.

## INTRODUCCIÓN

*Salmonella gallinarum* infecta de manera específica a la mayoría de las aves domésticas ocasionando una enfermedad septicémica denominada tifoidea aviar (TA), la cual puede ser de curso agudo a crónico. La TA tiene dos vías de transmisión, la vertical o transovárica, que se presenta cuando *Salmonella gallinarum* coloniza ovarios de aves reproductoras y los pollos nacen infectados y la vía horizontal que es de ave a ave, por material contaminado y por transmisión mecánica de ratones, aves silvestres y moscas.<sup>67</sup> Los signos que presentan las aves infectadas van a depender de la edad a la cual se infecten, En la forma transovarica los pollitos nacen moribundos o mueren antes de nacer, presentan pobre desarrollo, somnolencia, inapetencia; en aves adultas se presenta disminución de la postura, del consumo de alimento, fiebre, diarrea verde amarillenta, debilidad, crestas y barbillas pálidas debido a anemia hemolítica, empastamiento fecal, y plumas erizadas.<sup>67</sup> Las lesiones que presentan las aves son aumento de volumen de bazo e hígado, con necrosis multifocal, nódulos blanquecinos en corazón, molleja y pulmones, placas blanquecinas con engrosamiento de la mucosa intestinal, hemorragias intestinales, peritonitis, pericarditis y congestión renal. En pollitos muertos se observa retención y descomposición del saco vitelino, mientras que en gallinas reproductoras se presentan folículos ováricos hemorrágicos, deformes y pendulosos.<sup>67</sup> El periodo de incubación de la TA es de 4 a 5 días, la muerte sobreviene de 4 a 10 días a partir de que inicia la enfermedad. La TA causa una mortalidad que va de 5 a 10 %, lo cual va a depender de la virulencia de la cepa bacteriana, la edad de las aves, sensibilidad de las mismas, la línea genética y tipo de ave ya que se ha comprobado que las líneas pesadas son más susceptibles a contraer la enfermedad que las líneas ligeras. Así mismo, las hembras son mas sensibles que los machos, lo cual probablemente se debe a que en las hembras *Salmonella* produce foliculitis en ovarios y se elimina por medio de esta vía.<sup>6, 8</sup>

### IMPORTANCIA ECONÓMICA

La TA es de distribución mundial, aunque en países desarrollados como Canadá, EUA y países de Europa se presenta una baja incidencia, mientras que en los países de Latinoamérica y Africa la incidencia es mayor.<sup>67</sup> A nivel mundial, México ocupa el cuarto lugar en producción de huevo y pollo, ésto refleja la importancia de la industria avícola en

nuestro país, ya que representa el sector pecuario que produce la proteína de origen animal de mas bajo costo y en consecuencia de mayor acceso para la población más desprotegida económicamente. Los estados con mayor participación en la producción de huevo en 1999 fueron Jalisco, Puebla, Sonora, Nuevo León y la región de la Laguna. Mientras que la producción de pollo, en ese mismo año fueron Guanajuato, la región de la Laguna, Jalisco, Veracruz y Querétaro; los estados con mayor producción de guajolote en 1999 fueron Chihuahua y Sonora. En ese mismo año la avicultura nacional representó el 59.60% de la producción pecuaria siendo un 29.36% destinado a producir pollo, 20.06% a la producción de huevo y 0.17% a la producción de guajolote. La parvada nacional en 1999 fue de 336'641,463 de aves, constituida por progenitoras, reproductoras y crianza, pollo de engorda y guajolote. En ese mismo año, la producción de huevo fue de 1'825,521 ton, pollo 1'782,901 ton y guajolote 10,400 ton, representando un valor en millones de pesos de \$11,865.886 para huevo, \$19,611.911 para pollo y \$234.000 para guajolote. El consumo *per capita*, fue de 18.6 Kg. de huevo, 18.2 Kg. de pollo y 2.0 Kg. de guajolote.<sup>104</sup> En México la TA ha ocasionado grandes pérdidas económicas en la avicultura, por ejemplo, Mosqueda<sup>50</sup> en 1984, reportó pérdidas anuales por \$3,573 millones, en pollo de engorda. En otro estudio, en 1987, Ramírez<sup>75</sup> reportó \$80,000 millones en pérdidas por TA en gallinas reproductoras pesadas. Recientemente no hay reportes al respecto, a pesar de que existen brotes sin reporte oficial (experiencia de este laboratorio).

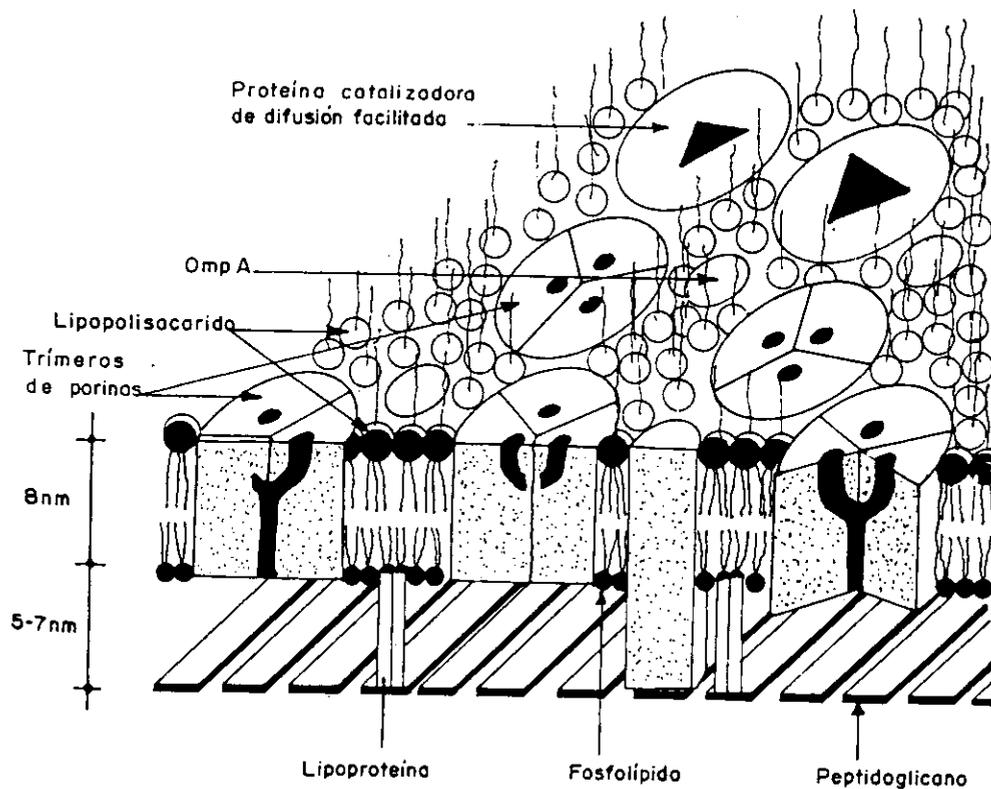
#### CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

*Salmonella gallinarum* es un bacilo Gram negativo de aproximadamente 4 µm de largo y 1.5 µm de diámetro, posee el antígeno "O" somático 1, 9 y 12, es aeróbio o anaerobio facultativo, se pueden encontrar en pares, no forman esporas, no presentan antígeno capsular Vi y tampoco antígeno flagelar H, por lo que se considera inmóvil.<sup>67</sup> Esta última característica actualmente es controversial puesto que Holt y Chaubal,<sup>27</sup> en 1997, descubrieron que la motilidad puede ser inducida en *Salmonella pullorum* bajo ciertas condiciones de medios de cultivo; Lazo *et al.*<sup>40</sup> reportaron que *Salmonella gallinarum* con las mismas condiciones de cultivo, presentaron un crecimiento muy parecido al de *Salmonella enteritidis* la cual es móvil. *Salmonella* presenta una envoltura celular,

constituida por una membrana externa (ME), una membrana interna y una capa intermedia de peptidoglicano. El espesor de cada capa es de aproximadamente 7.5 nm.<sup>58</sup>

### MEMBRANA EXTERNA

La ME (**Figura 1**) en las bacterias Gram negativas que habitan el tracto digestivo de los animales tiene una gran importancia fisiológica, ya que contribuye a la resistencia contra las defensas del huésped como son lisozima,  $\beta$ -lisina y a varias proteínas leucocíticas.<sup>58</sup>



**FIGURA 1.** Esquema de la membrana externa de bacterias Gram negativas.

La ME le confiere a la célula bacteriana una superficie altamente hidrofílica, que es importante para evadir la fagocitosis, a algunos componentes del Complemento y le permite a la bacteria alterar la constitución antigénica de su superficie y de esta manera evita el ataque del sistema inmune específico.<sup>58</sup>

Así mismo, la ME es una protección contra la acción emulsificante de las sales biliares y degradación por enzimas digestivas. En determinado momento la ME le confiere al microorganismo resistencia contra antimicrobianos como son macrólidos, novobiocina, rifampicina, lincomicina, clindamicina y ac. fusídico.<sup>57</sup>

### COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ME

**FOSFOLÍPIDOS:** La composición de los fosfolípidos de la ME es muy similares a la de la membrana citoplasmática, con un escaso pero significativo enriquecimiento de fosfatidiletanolamina en *S. typhimurium*, poca cantidad de fosfatidilglicerol y muy poca cantidad de cardiolipina.<sup>61</sup>

**LIPOPOLISACARIDO (LPS).** El LPS presenta tres partes, una región lipídica que incluye al lípido A, que es responsable de la actividad endotóxica del LPS y se orienta hacia la zona hidrofóbica de la ME; el núcleo o *core* y la región polisacáridica formada por la cadena "O".<sup>54</sup> Esta última región es la que serotifica a las bacterias.<sup>57</sup> La expresión de las moléculas de LPS en toda la bacteria es de  $3.4 \times 10^4$ .<sup>58</sup> En *Salmonella*, el LPS tiene varias funciones, el establecimiento de la enfermedad en el huésped, proteger a la bacteria de la muerte por suero, así como del ambiente hostil del fagolisosoma e inducir la producción de citocinas.<sup>92, 99, 101</sup>

Existe una fuerte interacción entre proteínas y LPS que se ha demostrado por la persistencia del LPS en la purificación de proteínas. Yamada y Mizushima,<sup>117</sup> encontraron que cuando el complejo LPS-proteína se calentaba a 100 °C con SDS, se dissociaba el LPS de la proteína y la porina perdía su configuración nativa, por lo que sugirieron que la conformación nativa de la proteína es necesaria para absorber el LPS.<sup>58</sup> Así mismo, Schindler y Rosenbusch,<sup>81</sup> reportaron que las porinas libres de LPS se insertaban dentro de una bicapa de fosfatidilcolina pero no formaban poros estables, concluyendo que se requiere la presencia de LPS en las proteínas para presentar canales funcionales. Se ha

demostrado en *E. coli* K-12 que la unión LPS/OmpA (Outer membrane protein A) actúa como receptor del fago Tull, puesto que si se aísla la proteína sola, disuelta en amortiguador de bicarbonato y Tritón X-100, no puede inactivar al fago.<sup>10, 87</sup> Así mismo se sabe que OmpA es necesaria como mediador en la conjugación, cuando se purifica la proteína se inhibe la conjugación siempre que esté unida a LPS.<sup>86, 105</sup> El LPS también protege a OmpA de la degradación de enzimas proteolíticas.<sup>88</sup>

PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (PME). Constituyen el 47% del total de la ME, con base en el número de copias que existen por célula se clasifican en principales y menores. Dentro de las proteínas principales se encuentra la lipoproteína mureína con un peso molecular de 7,200 daltones. Existen  $7 \times 10^5$  copias por célula y una tercera parte de la población se une de manera covalente al peptidoglicano a través del grupo  $\epsilon$ -amino de la terminación carboxilo de la lisina, mientras que el resto de las proteínas se encuentran libres.<sup>31</sup> La función de esta proteína es estructural ya que estabiliza la arquitectura del complejo ME-Peptidoglicano.<sup>58</sup> Otro grupo importante de proteínas mayoritarias son las porinas, que se expresan aproximadamente de  $10^5$  moléculas por célula.<sup>51, 52</sup> En *E. coli* y *S. typhimurium* pueden representar el 2% del total de proteínas de la célula.<sup>59</sup> Las porinas principales presentan una alta homología entre su secuencia primaria de aminoácidos, tienen un peso molecular similar y sus subunidades monoméricas presentan un peso molecular de alrededor de 35 kDa.<sup>59</sup> Así mismo, presentan reacción inmunológica cruzada y forman poros de difusión pasiva de diámetro similar.<sup>49</sup> Las porinas se conforman por trímeros y cada subunidad produce un canal, por lo tanto, el trímero va a presentar tres canales. Los polipeptidos de cada subunidad atraviesan la membrana en 16 laminas- $\beta$  antiparalelas, formando una barrera- $\beta$  estructural alrededor y a lo largo del poro. Las laminas- $\beta$  presentan una inclinación de 30 a 60° con relación al eje del trímero.<sup>59</sup> Las asas de las porinas son cortas de uno a cuatro residuos en la parte que tiene contacto con el espacio periplásmico, pero con frecuencia son largas en la parte que tiene contacto con el exterior.<sup>59</sup> Así mismo, las asas muestran una gran variabilidad en la secuencia con respecto a otras bacterias entéricas. Muchas asas contienen un gran número de cargas que en su mayoría son ácidos, residuos de amino ácidos, los cuales interactúan fuertemente con las cargas negativas de los grupos de LPS. El diámetro del poro está determinado por el

plegamiento de las tres asas externas dentro del lumen de la barrera- $\beta$ .<sup>59</sup> El poro presenta la propiedad de discriminar solutos que se influyen en gran medida en el interplegamiento del asa, mejor dicho por las dimensiones de la barrera- $\beta$ .<sup>59</sup> Los poros o canales presentan un diámetro en la entrada y una pequeña disminución del mismo en la parte central, que permite excluir solutos grandes, mientras que disminuye la fricción entre los solutos y las paredes del poro.<sup>59</sup> Estas pequeñas moléculas pueden difundirse a través de la ME con un alto porcentaje.<sup>59</sup> El centro de los trímeros en la región intersubunidad es completamente hidrofóbica.<sup>59</sup> Schulz<sup>85</sup> sugiere que esta característica puede ser importante en el ensamblaje y plegamiento de los trímeros de porinas. Las porinas más estudiadas son OmpF, OmpC, PhoE.<sup>51, 52</sup> Otras bacterias presentan porinas adicionales, por ejemplo *S. typhimurium* LT2 expresa OmpD, *E. coli* posee una proteína llamada 2 o Lc, que es codificada por un profago; en el genoma de cepas de *E. coli* K-12 que presentan defecto en el profago contienen el gene *nmpC* que codifica para una porina;<sup>3</sup> así mismo, en *E. coli* K-12 se ha encontrado una porina llamada OmpG;<sup>50</sup> OmpT es una serin- proteasa de ME, tiene un peso molecular de 180 kDa presenta alta especificidad por sitios dibásicos y la presentan diferentes bacterias,<sup>98</sup> es una enzima muy similar a la otra proteasa de *E. coli* OmpP;<sup>95</sup> y cepas de *E. coli* capsuladas presentan la proteína K.<sup>62</sup>

Otro grupo de PME son las proteínas que participan en el proceso de difusión específica involucradas en la difusión transmembranal de grupos específicos de solutos, a este grupo pertenecen las siguientes proteínas: LamB de *E. coli*, que se considera una proteína trimérica, estructuralmente presenta laminas  $\beta$ , esta proteína es receptora del fago  $\lambda$  y está involucrada en el paso de maltosa y maltodextrinas a través de la ME, *S. typhimurium* siendo insensible al fago lambda, pero se ha reportado una PME similar a LamB.<sup>83</sup> La proteína Tsx es receptor del fago T6, y está involucrada en el transporte de nucleósidos.<sup>43</sup> En *E. coli* se encuentra la proteína ScrY, que está en un plásmido y forma canales específicos para sacarosa.<sup>59</sup> BtuB es una proteína involucrada en el paso de vitamina B<sub>12</sub> y requiere de la presencia de TonB, una proteína anclada en la membrana citoplasmática.<sup>69</sup> La proteína Cir, con un peso molecular (PM) de 69 kDa es receptora de las colicinas I y V, permite el transporte de catecoles. IutA, una proteína de 74 kDa, es receptora de colicina DF13, tiene la función de transportar Fe<sup>3+</sup> aerobactina y FhuE es otra proteína que transporta Fe<sup>3+</sup> coprógeno. La proteína FhuA es receptor de los fagos T1, T5 y  $\phi$ 80 y de la

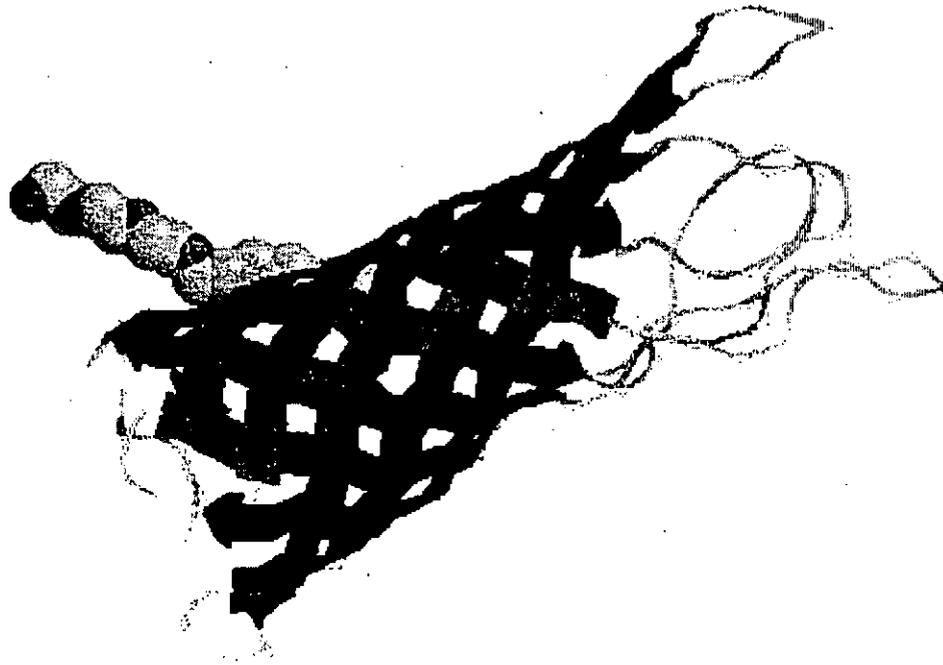
colicina M, está involucrada en el paso de ferricromo. FecA es una proteína que funciona como transporte de dicitrato férrico. La proteína FepA involucrada en el paso de  $\text{Fe}^{3+}$  enterobactina. La proteína Fiu funciona como paso de catecoles y la proteína FadL es una mediadora de ácidos grasos.<sup>59</sup>

Por último, el grupo de proteínas estructurales que dan la estabilidad a la ME, dentro de este grupo se ha circunscrito a OmpA.

La proteína OmpA es una de las más abundantes en la ME, se encuentran  $10^5$  moléculas por célula, es altamente conservada a través de la evolución, en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*<sup>18</sup> presenta un peso molecular de 35 kDa, se le considera modificable por el calor ya que la migración de OmpA en geles de poliacrilamida-SDS decrece cuando la muestra es calentada, este comportamiento se observa en proteínas que no son fácilmente desnaturalizadas por SDS,<sup>82</sup> probablemente porque el SDS simula al LPS ya que ambos tienen carga negativa;<sup>59</sup> OmpA es una proteína rica en laminas beta al igual que las porinas.<sup>54</sup> Sus 325 aminoácidos atraviesan la membrana 16 veces en laminas  $\beta$  antiparalelas y presenta 8 asas expuestas a la superficie.<sup>91</sup> OmpA en la bacteria puede ser parcialmente degradada por proteasas, tales como tripsina y proteinasa, generando fragmentos de 24 y 19 kDa, respectivamente.<sup>87</sup> Esta proteína es multifuncional, sirve como receptor de fagos,<sup>10</sup> mediador en la conjugación dependiente del factor F,<sup>105</sup> también presenta la función de estabilizar la forma de la bacteria.<sup>92</sup> Se ha sugerido que OmpA funciona en el transporte de aminoácidos.<sup>44</sup> Se ha reportado que mutantes en OmpA de *S. typhimurium* muestran una permeabilidad alterada para cefaloridina.<sup>56</sup> OmpA es considerada una proteína estructural de la ME, en su estado nativo es un monómero que se consideraba sin poros, sin embargo se ha reportado que al trabajar con OmpA en una bicapa lipídica, se observó que la proteína era capaz de formar canales de difusión para pequeños solutos.<sup>97</sup> En 1993, Saint *et al*<sup>77</sup> midieron el tamaño del poro, el cual es de 4.5 a 6 nm de largo y de 0.6 a 0.7 nm de diámetro; Sugawara y Nikaido,<sup>97</sup> en 1994, reportan que solo una pequeña fracción de los canales que forma OmpA se presentan abiertos, el porcentaje aproximado es de 2 a 3 % y permiten la difusión de L-arabinosa comparable con los canales que forma OmpF. En 1998 Pautsch y Schulz<sup>65</sup> determinaron la estructura del dominio transmembranal de OmpA de *Escherichia coli* (**Figura 2**) por medio de difracción de rayos

X, el dominio consiste de 171 aminoácidos que presentan cuatro asas extracelulares y pequeños giros que corresponden a la estructura de las porinas, las asas extracelulares son móviles lo cual le confiere una medida de protección contra el sistema inmune o contra la entrada de fagos. El interior de la barrera es polar y contiene un puente de hidrógeno intrincado, incluye diferentes puentes de sales y diferentes cavidades llenas de agua, pero no encuentran que exista paso de agua o iones, por lo que sugieren que la actividad de formadora de poros reportada por anteriores investigadores puede ser causada por fracciones de moléculas que asumieron una conformación no nativa.

Las proteínas menores de la ME se encuentran en un momento específico del ciclo celular, como es el caso de la proteína G de 15 kDa que está asociada a la elongación de la pared celular, existe otra proteína de 80 kDa que se le involucra en la iniciación de la síntesis de ADN.<sup>57</sup> En *E. coli* se encuentra TolC de 50 kDa involucrada en la entrada de colicinas<sup>113</sup> y se ha encontrado que funciona como canal exportador de hemolisina.<sup>111</sup> También se encuentran en la ME otras proteínas como enzimas, por ejemplo la fosfolipasa A1 y proteasas. Fernández-Mora *et al.*,<sup>15</sup> en 1995 reportaron el aislamiento y caracterización de OmpS1, que se encuentra presente en niveles bajos en *Salmonella typhi* y solo es posible la expresión de altos niveles del gene en condiciones extremas.



**FIGURA 2.** Cristalización de OmpA de *Escherichia coli*. Tomado de Pautsch A, y Schulz GE<sup>66</sup>.

## REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

Algunas proteínas de la membrana externa (PME) son expresadas por cambios ambientales, que da como resultado variaciones en el fenotipo celular.<sup>53</sup> Por lo tanto la ME de la bacteria que se adapta y multiplica en las condiciones hostiles del huésped, va a diferir de la ME de una bacteria cultivada en un medio estándar de laboratorio. En estudios realizados con *Campylobacter jejuni*, se demostró que hay PME que se expresan solo durante el crecimiento del microorganismo *in vivo* en asas ileales de conejo, que estimulan una respuesta inmune en humanos.<sup>64</sup> La expresión de algunas porinas se pueden regular por condiciones ambientales como osmolaridad, atmósfera, temperatura, nutrientes específicos y pH.<sup>100</sup> La osmolaridad del medio de cultivo regula la expresión de las porinas OmpF y OmpC. En *E. coli ompC*, es expresado en un medio con alta osmolaridad y es reprimido en un medio con baja osmolaridad, en contraste, *ompF* es expresado en un medio con baja osmolaridad y es reprimido en un medio de alta osmolaridad.<sup>105, 71</sup> Así mismo, la atmósfera del cultivo influye en la expresión de dichas proteínas, se ha reportado que *ompC* de *E. coli* reprime su expresión cuando es cultivada en un medio de baja osmolaridad y en aereación constante, en cambio, aumenta su expresión cuando la bacteria es cultivada en anaerobiosis; en contraste *ompF* no es afectado por los cambios de oxígeno. En adición OmpC de *S. typhimurium* muestra un comportamiento en anaerobiosis, similar al de OmpC de *E. Coli*.<sup>55</sup> OmpC de *Salmonella typhi* es frecuentemente expresada en un medio de cultivo de alta y baja osmolaridad.<sup>71</sup> La síntesis de dichas proteínas es regulada en respuesta a la osmolaridad del medio, por los productos de los genes *ompR* y *envZ*.<sup>90</sup> EnvZ es un componente sensor de membrana interna que comunica información ambiental a OmpR, que es un regulador transcripcional de *ompC* y de *ompF*.<sup>23</sup>

Se han realizado estudios con respecto a la represión de OmpF en respuesta a un incremento en la temperatura, y se ha encontrado que es a nivel post-transcripcional por el ARN de *micF*, localizado inmediatamente corriente arriba de *ompC* y es transcrito en dirección opuesta. Así mismo, se ha reportado que los 93 nucleotidos del ARN de *micF* forman un complejo duplex estable con la región de unión a ribosoma del ARNm de *ompF*, y de esta manera inhiben la traducción de *ompF*. La función de *micF* en la osmoregulación de *ompF* no es muy claro, ya que aunque el nivel de ARN de *micF* se incrementa cinco veces en alta osmolaridad, la eliminación de *micF* no altera de manera significativa los niveles de OmpF en osmolaridad baja y alta. Estudios de la cinética de expresión de OmpF

indican que *micF* funciona como un sistema de ajuste fino para un mayor control osmótico de *ompF* mediado por EnvZ y OmpR.<sup>11, 70</sup>

Existen reportes de diferentes factores que afectan la expresión de las porinas por ejemplo se ha observado que cepas mutantes que carecen de oligosacárido derivado de membrana (MDO) producen expresión de porinas aberrantes en medios de concentraciones extremadamente bajas de iones.<sup>70</sup> Así mismo, agentes tóxicos como el etanol, ácidos débiles, antibióticos y condiciones ambientales de estrés oxidativo, aumentan la síntesis de MicF y decrecen la expresión de OmpF. Los niveles de ARN de *micF* se incrementan 17 veces con etanol y mas de 10 veces en estrés oxidativo.<sup>11, 42</sup> En estudios utilizando la fusión del operon *micF-lacZ+* se indica que en presencia de ácidos débiles se induce la transcripción 3 a 4 veces de *micF*.<sup>76</sup>

También se ha observado que proteínas de unión a ADN influyen en la expresión de *micF*. Así mismo, se reporta que OmpR controla la expresión de *micF* de una manera similar a la regulación de *ompC*.<sup>17</sup> Se ha observado que los ácidos débiles y los antibioticos incrementan los niveles de MarA y esta proteína unida al promotor *micF* activa la transcripción de *micF*.<sup>33</sup> La proteína SoxS que se une a ADN se eleva en respuesta al estrés oxidativo. SoxS también se une al promotor de *micF* y activa la transcripción.<sup>41</sup> Recientemente se ha reportado una proteína Rob y se sugiere que actúa igual que las anteriores.<sup>1</sup>

Ferrario *et al.*<sup>16</sup> utilizando fusión de *ompC-lacZ+* y fusión de *micF-lacZ+*, demostraron que una mutación nula de *lrp* causa un incremento de dos veces la transcripción de *ompC* y *micF*, no viéndose afectada la transcripción de *ompF*.

Se ha propuesto que RpoS puede regular de manera negativa a *ompF* por un mecanismo que involucre a MicF.<sup>12</sup> La fase estacionaria y la fase de entrada y la alta osmolaridad se asocian al incremento de los niveles de RpoS.<sup>39</sup> RpoS es requerido para la fase estacionaria, participa en la regulación negativa de *ompF*, pero no se requiere para la represión de *ompF* en alta osmolaridad.<sup>70</sup>

Se ha reportado que lesiones en OsmZ (proteína similar a histona) exhiben alteraciones en el enrollamiento de ADN y la expresión de *ompF* decrece, mientras que la de *ompC* se incrementa.<sup>22</sup> Estudios recientes muestran que si *hns* (gene que codifica para OsmZ) se lesiona, aumentan los niveles de RpoS.<sup>2</sup>

Se ha propuesto que el factor de integración del huésped (IHF) se une al promotor de *ompF* y facilita la formación de un asa represora de ADN.<sup>70</sup> Así mismo, los IHF ejercen un control negativo en la región del promotor de *ompC* y a la vez *envZ*.<sup>28</sup> Huang *et al.*<sup>29</sup> en 1992 reportó que el complejo cAMP-CAP (proteína activador de catabolitos) es capaz de afectar la expresión del promotor *ompR/envZ*.

Otras porinas son inducidas en ciertas condiciones de crecimiento, por ejemplo, en algunas enterobacterias y otras bacterias Gram negativas, si se limita fósforo, se induce la expresión de la proteína PhoE, que forma canales selectivos para aniones.<sup>68</sup> También la proteína P de la ME de *Pseudomonas aeruginosa* se induce por las mismas condiciones.<sup>25</sup> Las proteínas LamB de *E. coli* y *S. typhimurium* son parte del regulón *mal* que está involucrado en la permeabilidad de azúcares en la ME.<sup>63</sup> La proteína DI de *P. aeruginosa* se induce al adicionar glucosa al medio de cultivo.<sup>49</sup>

Martínez Flores *et al.*<sup>45, 46</sup> demuestran que la regulación de OmpC y OmpF de *Salmonella typhi* es dependiente de OmpR/EnvZ igual que en *E. coli*, pero con algunas diferencias, ya que observan que en *S. typhi* la expresión no varía a lo largo de la curva de crecimiento, como ocurre en *E. coli*. Así mismo, encontraron que al remover el gene *ompC* u *ompF* de *S. typhi*, la expresión del gene codificante para la otra porina mayoritaria no se modificaba, como ocurre en *E. coli*. Por lo que concluyen que la carencia de osmorregulación en la expresión de *ompC* de *S. typhi*, es independiente de las diferencias en la región reguladora del gene *ompC*.

Jin e Inouye,<sup>35</sup> en 1995, reportan tres genes presentes en plásmidos multicopias que afectan la expresión de *ompF* y *ompC*. Los genes encontrados son *secB* el cual bloquea *ompC* e inhibe la expresión de *ompF*; el gene *gcvA* que es regulador transcripcional para el operón *gvcA*, dicho gene bloquea la expresión de *ompF* en alta osmolaridad y aumenta la expresión de *ompC* en baja osmolaridad; otro gene que identifican es *rbsR* el cual es represor del operon *rbs*, bloquea la expresión de *ompF* en alta y baja osmolaridad y aumenta la expresión de *ompC* en baja osmolaridad.

Contreras *et al.*<sup>9</sup> utilizando la fusión de *ompC-lacZ* en *E. coli* demuestran que en la osmolaridad a la cual se induce la máxima expresión de OmpC en *S. typhi* es a 0.16 osmM, lo cual es diferente en *E. coli* donde la máxima expresión de OmpC se da a 0.7 osmM. Así

mismo, reportan que la expresión de OmpF es reprimida por anaerobiosis en *E. coli* y *S. typhi*. También observan una diferencia dependiendo de la temperatura en la expresión de *ompF*, en *S. typhi* se induce la expresión de *ompF* a una temperatura de 30 a 37 °C, y en *E. coli* se observa el efecto diferente.

Liu y Ferenci<sup>42</sup> al trabajar con *E. coli* en diferentes condiciones de nutrientes, mencionan que OmpC incrementa su expresión cuando existe limitación de glucosa, en cambio OmpF disminuye su expresión. También encuentran que OmpF responde más a la limitación de nutrientes que la osmolaridad del medio.

### IMPORTANCIA INMUNOLÓGICA DE LAS PORINAS

En estudios anteriores con PME se ha demostrado su importancia en la respuesta inmune humoral. Calderón *et al.*,<sup>7</sup> en 1986, encontraron que anticuerpos séricos de humanos infectados con *S. typhi* eran capaces de reconocer a las PME. Isibasi *et al.*,<sup>32</sup> en 1988 y Udhayakumar y Muthukkarupan,<sup>103</sup> en 1987, coinciden en observar que las PME de *S. typhi* y *S. typhimurium* respectivamente, eran capaces de inducir protección inmunitaria en el ratón. También se han referido diferentes funciones de algunas porinas en la patogenicidad, y ser las responsables de inducir efectos inflamatorios, liberación de citocinas, activación del Complemento, daño renal y cardiovascular.<sup>19, 102</sup> Verdugo-Rodríguez *et al.*,<sup>108, 109</sup> en 1993, desarrollaron una prueba indirecta de ELISA para detectar anticuerpos en suero dirigidos contra preparaciones de PME de *S. typhi* como antígeno de captura. Kim *et al.*<sup>37</sup> detectaron por medio de la técnica de ELISA PME de *S. enteritidis* en suero de pollos infectados con la bacteria. Vázquez *et al.*,<sup>106</sup> en 1993 utilizando PME de *S. gallinarum* diseñaron y estandarizaron un inmunoensayo enzimático para diagnosticar TA. Galdiero *et al.*,<sup>20</sup> en 1998, inoculan *Salmonella typhimurium* a ratones vía oral y producen una protección contra una segunda inoculación intraperitoneal, ya que obtienen un título alto de anticuerpos anti-porina con actividad bactericida. Posteriormente reestiman, *in vitro* a células CD4+ con una baja concentración de porinas y observan que secretan interferón- $\gamma$  y liberan grandes cantidades de interleucina-4

Existen trabajos en *Neisseria* donde observan que las PME son importantes inmunógenos. Simpson *et al.*,<sup>89</sup> en 1999, caracterizan la respuesta de células T anti porinas (porina I o Por), reportan un incremento significativo en la producción de interleucina 4 Por específica

y linfocitos T cooperadores en pacientes con enfermedad gonococal en contraste con los controles normales. Una parte de los linfocitos T pueden encontrarse en sangre periférica y por lo tanto en la superficie de mucosas. Peeters *et al.*<sup>66</sup> demuestran que la proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis* PorA-complejo de estimulación inmune inducía cuatro veces los títulos de IgG1 en ratones cuando los comparaban con preparaciones de PorA en vesículas. Concluyen que la conformación y presentación de PorA es importante para la inducción de anticuerpos capaces de matar a *Neisseria*. Ram *et al.*,<sup>74</sup> en 1999, reportan que Por1A y Por1B de *Neisseria meningitidis* grupo B, pueden regular la vía clásica del Complemento al unirse a la proteína C4b. En Por1A es a través de la primer asa y en el caso de Por1B es por medio de otra asa.

Brennan *et al.*,<sup>5</sup> en 1999, trabajan con *Pseudomonas aeruginosa* utilizando epitopes de la proteína de membrana externa F expresados en el virus del mosaico. La quimera del virus fue capaz de inducir opsoninas específicas IgG<sub>2a</sub> cuando se inoculaba a ratones. Por lo cual ellos sugieren que se pudiera aplicar como vacuna contra *P. aeruginosa*.

Sethi *et al.*,<sup>88</sup> en 1995, analizan anticuerpos de suero de humanos y observaron que la respuesta inmune va dirigida contra una proteína minoritaria de membrana externa de 84 kDa de *Moraxella catarrhalis*.

*Salmonella gallinarum* se disemina por vía sanguínea a casi todos los órganos del ave,<sup>67</sup> por lo que va a estar expuesta a factores bactericidas presentes en el suero sanguíneo como anticuerpos, proteínas del sistema del Complemento, células fagocíticas y células T. El sistema del Complemento está constituido por aproximadamente 15 proteínas diferentes, que tienen actividad bactericida. Además activan sistemas humorales y celulares, causando inflamación, liberación de histamina de células cebadas, migración de leucocitos, fagocitos y liberación de sustancias por parte de macrófagos y linfocitos.<sup>94</sup> Se han reportado PME llamadas Rck, que significa resistencia a la muerte por Complemento, las cuales son codificadas por un gene que se encuentra en un plásmido de virulencia en *S typhimurium*, la manera como actúan es previniendo la formación e inserción del complejo C9.<sup>79</sup> Weiser y Gotschlich,<sup>114</sup> en 1991 encuentran que OmpA de *Escherichia coli* K-1 contribuye a la resistencia al suero y a la patogénesis de la bacteria, cuando hacen crecer a la bacteria en cultivo con suero de humanos 50%, encuentran que es menor el crecimiento medido en

unidades formadoras de colonia, en las bacterias que están mutadas en OmpA, así mismo, observan que las bacterias que tienen OmpA son mas virulentas al inocularlas en embrión de pollo y ratón lactante, puesto que producen mas lesiones que las cepas mutadas en OmpA. Hellman *et al.*,<sup>26</sup> en 2000 encuentran la liberación de tres PME OmpA, PAL, MLP de *E. coli* en medio que contenía suero de humano, en sus resultados encuentran que cuando la bacteria es incubada en el medio control con ampicilina en ausencia de suero de humano, no existía la liberación, lo que les indica que los factores del suero son importantes en la liberación de las PME.

Los estudios de PME de bacterias patógenas, que se expresan durante la infección natural en los tejidos y fluidos del huésped, permiten conocer ciertos elementos involucrados en la patogénesis de las enfermedades y pueden presentar un valor diagnóstico, por lo que las PME pueden ser utilizadas en el diseño de técnicas de diagnóstico específico, así como en la elaboración de inmunógenos.

Dada la importancia de la TA en cuanto a pérdidas económicas para la avicultura mexicana, en 1994 se implementó la Norma Oficial Mexicana<sup>13</sup> NOM-005-ZOO 1993, Campaña Nacional Contra la Salmonelosis Aviar; sin embargo, existe un pobre desarrollo en el diseño de técnicas de diagnóstico temprano en la infección, así como en el desarrollo de vacunas que comprendan inmunógenos adecuados para el control y erradicación de la salmonelosis.

## ANTECEDENTES

En *Salmonella gallinarum* cultivada en caldo nutritivo adicionado con suero obtenido de aves libres de patógenos específicos (SPF), disminuye la expresión de una proteína de 30 kDa.<sup>30</sup>

Mediante ELISA se ha demostrado que la PME de 30 kDa es reconocida específicamente por sueros de aves SPF infectadas con *S. gallinarum* FVB323, en contraste, los sueros de los grupos de aves SPF no infectadas, preinmunes, o vacunadas con *S. gallinarum* cepa 9R e infectadas con *S. enteritidis* fagotipo 4, los cuales no reconocieron a dicha PME.<sup>30</sup>

Por lo anterior, la proteína de 30 kDa podría ser considerada como un probable factor de sobrevivencia o de virulencia o asociado a enfermedad. Los datos anteriores sugieren que es una proteína que induce una respuesta humoral capaz de discriminar entre grupos de

aves expuestas al mismo o a diferentes microorganismos, lo cual hace relevante conocer la secuencia nucleotídica del gene que la codifica. Se deben considerar estudios adicionales necesarios para determinar la utilidad de la proteína de 30 kDa como un antígeno importante en el diagnóstico de la TA.

El gene que codifica para dicha PME de 30 kDa, una vez secuenciado, clonado y expresado en cantidades suficientes, puede ser utilizado en el diseño de métodos de diagnóstico, o bien en estudios como inmunógeno. Posteriormente, por mutagénesis dirigida, se pueden evaluar las mutantes en estudios de invasión a células no fagocíticas, así como su citotoxicidad en macrófagos.

Estos estudios pueden ser una base para conocer la función de PME similares en infecciones por otras especies de *Salmonella* en otros huéspedes incluyendo al humano.

## OBJETIVO

Identificación del gene que codifica para una proteína de membrana externa de 30 kDa de *Salmonella gallinarum* cepa FVB323.

Objetivos específicos:

Purificación de la PME de 30 kDa de *Salmonella gallinarum*

Secuenciación amino terminal de la PME de 30 kDa de *Salmonella gallinarum*

Utilizar la secuencia amino terminal de la PME de 30 kDa de *Salmonella gallinarum*, para diseñar iniciadores que se utilizarán en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar el gene que codifica esta proteína.

Obtención y secuenciación del fragmento amplificado mediante la técnica de PCR.

## HIPÓTESIS

*Salmonella gallinarum* posee un gene que codifica para una PME de 30 kDa de la familia de las porinas que se regula por la presencia del Complemento.

## HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Son otras proteínas las reguladas por la presencia de Complemento que interactúan con la región reguladora del gene que codifica para la PME de 30 kDa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CULTIVO DE LA BACTERIA

*Salmonella gallinarum* cepa FVB323 se cultivó en 10 ml de caldo nutritivo "A" (CN) y se incubó toda la noche a 37°C a 200 revoluciones por minuto (rpm)<sup>a</sup>, después de la incubación se tomaron 400 µl del caldo para inocular 10 ml de CN y se incubaron<sup>a</sup> 4 h a 37°C a 200 rpm<sup>a</sup>. Al término de este tiempo, se tomaron 200 µl del cultivo y se inocularon en 30 ml de CN, en 30 ml de caldo nutritivo "A" adicionado con 30% de suero de pollos SPF de 4 semanas de edad (CNS) y en 30 ml de caldo nutritivo "A" adicionado con 30% de suero de pollos SPF al cual se le sometió a 56°C por 30 minutos (min) para inactivar el Complemento (CNSD). Los tres cultivos se incubaron 8 h a 37°C a 200 rpm<sup>a</sup>.

### PURIFICACIÓN DE LAS PME

La purificación de las PME de *S. gallinarum* se realizó por el método de Matsuyama. *et al.*<sup>47</sup> con modificaciones propias. Los cultivos bacterianos se centrifugaron 15 min a 4°C a 6,000 rpm<sup>b</sup>, las células bacterianas se lavaron con 20 ml de solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2, y se centrifugaron nuevamente a 15 min a 4°C a 6,000 rpm<sup>b</sup>, cada una de las pastillas bacterianas se suspendieron en 10 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y se sonicaron<sup>c</sup> bajo las siguientes constantes: 4°C, amplitud 50%, pulsos 2.5 segundos (seg) y descanso de 9.9 seg., las pastillas constantemente se mantuvieron en hielo; los ciclos de sonicación se repitieron hasta que la solución clarificó. Posteriormente, las muestras se centrifugaron<sup>d</sup> 15 min. a 4°C a 10,000 rpm el sobrenadante se ultracentrifugó 35 min. a 6°C a 40,000 rpm<sup>e</sup>, y las pastillas que se obtuvieron se suspendieron cada una en 10 ml de solución de 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con 2 % de tritón X-100 y se incubaron 45 min. a 37°C<sup>e</sup>. Este paso es para separar las proteínas solubles de las insolubles en el detergente. Después de la incubación se ultracentrifugaron<sup>f</sup> 35 min. a 6°C a 40,000 rpm<sup>e</sup>, y las pastillas que contenían las proteínas se suspendieron cada una en 10 ml de una solución 0.05 M tris, 5 mM de EDTA y 2% de tritón X-100, y se

<sup>a</sup> New Brunswick Scientific. Mod. G-24

<sup>b</sup> IEC International. Mod. PR-2.

<sup>c</sup> Cole Parmer. Mod. CPX600.

<sup>d</sup> Beckman. Mod. J2-21. Rotor JA-20.

<sup>e</sup> Lab-Line Incubator-Shaker

<sup>f</sup> Beckman. Mod. L8-80. Rotor 50TI.

incubaron 10 min. a 23°C<sup>g</sup>. Se volvieron a ultracentrifugar 35 min a 6°C a 40,000 rpm<sup>e</sup>., y las pastillas que se obtuvieron se suspendieron en 200 µl de solución amortiguadora salina fosfatada (PBS). Por último, las pastillas se guardaron en congelación a -70°C, hasta su uso.

#### CUANTIFICACIÓN DE PME

La cuantificación de las PME se realizó por dos métodos el descrito por Bradford,<sup>4</sup> y con un paquete comercial conteniendo ácido bicinconínico (BCA)<sup>h</sup>. El primero es un método colorimétrico que se basa en el uso del colorante azul brillante de Coomassie G250 el cual tiene afinidad por Arginina de las proteínas, cuando se une el colorante con la proteína cambia la conformación del colorante y forma un anillo cíclico, lo que va a provocar un cambio en el color de la muestra, dicho cambio se puede leer a cierta longitud de onda, y la unión se compara con una curva de diferentes cantidades de una proteína estándar que es albúmina sérica bovina (BSA).

Se tomaron 30 µl de cada una de las muestras de PME de los cultivos CN, CNS y CNSD y se les agregó 1ml de ácido tricloroacético al 5%, se colocaron 10 min. en hielo, después se centrifugaron<sup>i</sup> 15 min. a 12,000 rpm. a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se suspendió en 200 µl de NaOH 0.4 N, se congeló la pastilla 30 min. a -70°C. Posteriormente, la pastilla se descongeló y se realizó la cuantificación por el método de Bradford en una placa de ELISA, donde se colocaron, en la primer línea, 50 µl de NaOH y 50 µl de H<sub>2</sub>O que se utilizaron como blanco. La curva de BSA se elaboró realizando diluciones dobles seriadas de BSA diluida en H<sub>2</sub>O y 50 µl de NaOH, en la placa de ELISA se colocaron las diluciones por triplicado. De las muestras de PME se tomaron 50 µl de cada una, se colocaron en la placa y se les agregaron 50 µl de H<sub>2</sub>O a cada una de las muestras. A todos los pozos de la placa que tenían muestras se les agregaron 150 µl de reactivo de Bradford. Se realizó la lectura de absorbancia de las muestras, en un espectrocolorímetro para placas de ELISA<sup>j</sup>, a una longitud de onda de 595 nm. Para obtener la concentración de proteínas, se graficaron los valores de la curva de BSA y se

<sup>g</sup> Fisher Scientific. Mod Isotemp waterbath

<sup>h</sup> Pierce.

<sup>i</sup> Jouan. Mod A-14

<sup>j</sup> Bio-Rad. Mod 3550

compararon los valores de las muestras de PME con dicha curva para sacar un valor aproximado de la concentración de las mismas.

Para el método del ácido bicinínico se prepararon las muestras de proteínas de la siguiente manera. En una placa de ELISA se colocaron 5  $\mu$ l de muestra de proteínas y 95  $\mu$ l agua desionizada, de igual manera que en la técnica de Bradford se utilizó una curva de diluciones de BSA, a todos los pozos se les agregaron 100  $\mu$ l de reactivo comercial, la placa se incubó toda la noche a 37°C<sup>e</sup> en obscuridad. La lectura se realizó posteriormente utilizando una lectura de absorbancia de 595 nm<sup>j</sup> y los valores se graficaron para obtener el valor de las muestras de proteínas.

#### SEPARACIÓN ELECTROFORETICA DE LAS PME EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA-SDS

A las PME se les agregó amortiguador de muestra en una concentración 1:5, y posteriormente se colocaron a ebullición en agua por 3 min. Después se centrifugaron a 12,000 rpm unos segundos, el amortiguador de muestra contiene mercapto etanol el cual va a romper los enlaces disulfuro de la proteína, lo que va a permitir que la proteína quede con su estructura primaria, de esta manera las proteínas pueden separarse a través de los poros del gel de poliacrilamida.

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS, en donde la separación de las proteínas se debe al peso molecular de las mismas y por su movimiento a través de los poros de la matriz del gel de poliacrilamida. Se preparó un gel desnaturizante de poliacrilamida-SDS al 12%, con 0.75 mm de grosor, la composición de los geles y de las soluciones amortiguadoras se elaboraron de acuerdo a la técnica de Laemmli.<sup>38</sup> Los geles ya polimerizados se colocaron en la cámara de electroforesis<sup>k</sup> y se les agregó solución amortiguadora para la separación de las proteínas. En los pozos del gel se colocaron las muestras de PME de los diferentes cultivos de *Salmonella gallinarum* CN, CNS y CNSD, a una concentración de 3  $\mu$ g de proteína por pozo, para los geles que se teñirían con plata y de 7  $\mu$ g para los geles que se teñirían con azul de Coomassie, en otro

<sup>k</sup> Bio-Rad. Mod Mini-PROTEAN II Cell

pozo se colocaron los marcadores de peso molecular (MPM)<sup>1</sup> comercial para la comparación de los pesos moleculares (PM) de las diferentes proteínas de las muestras. Los geles se sometieron a 50 V con una fuente de poder<sup>m</sup> hasta que el colorante pasó del gel concentrador al gel separador y la corriente eléctrica se elevó a 100 volts. Cuando el colorante comenzó a salir del gel se redujo el voltaje a 50 V y se dejó durante 40 min adicionales.

#### TINCIÓN DE PLATA Y AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE

Los geles de poliacrilamida que contenían las preparaciones de PME de *Salmonella gallinarum*, se tiñeron mediante tinción de plata o tinción de azul brillante de Coomassie.

La tinción de plata se realizó de la siguiente manera: el gel de poliacrilamida se dejó toda la noche en solución fijadora de tinción de plata en un agitador orbital,<sup>n</sup> posteriormente se le realizaron 4 lavados, en agitación con agua destilada de 30 min cada uno. Después de los lavados se le colocó solución de plata durante 30 min. en agitación<sup>n</sup> y obscuridad, se retiró la tinción de plata y se realizó un lavado con agua destilada durante 10 seg en agitación y se desechó esta última solución. Para revelar el gel se agregaron 100 ml de solución reveladora de plata y 55 µl de formaldehído. El gel se mantuvo en agitación, cuando aparecieron las bandas se detuvo la reacción con 5 ml de ácido cítrico 2.3 M y se agitó por 10 min. La solución se desechó y el gel se lavó con agua destilada durante 30 min. en agitación, después de lo cual se le adicionó 30 ml de solución estabilizadora. Posteriormente, el gel se seco en papel celofán para conservarlo.

En la tinción de azul brillante de Coomassie, el gel se colocó en solución de azul de Coomassie toda la noche en agitación constante,<sup>n</sup> después se retiró la solución y se agregó solución desteñidora de Coomassie, realizando varios cambios hasta que las bandas fueron visualizadas, se desechó la solución y se lavó el gel varias veces con agua destilada. Posteriormente se secó el gel en papel celofán para su conservación.

---

<sup>1</sup> Bio-Rad. Low-range standards

<sup>m</sup> Bio-Rad. Mod 1000/50

<sup>n</sup> Brinkman. Mod Orbit Mix 1010

## TRANSFERENCIA DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA A MEMBRANAS DE POLIVINIL DIFLUORURO (PVDF)<sup>o</sup>

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS<sup>j</sup> al 12 %, de 0.75 mm de grosor y se dejó toda la noche polimerizando dentro de una bolsa con humedad. A las muestras de PME de *S. gallinarum* cultivada en CN, se le agregó amortiguador de muestra a una dilución 1:5, se incubaron 15 min a 37°C, se centrifugaron 5 seg a 6,000 rpm<sup>l</sup> y se tomó el sobrenadante, a cada pozo del gel se les colocaron 35 µl de muestra con una concentración de 20 µg de PME, en uno de los pozos se colocó MPM. El corrimiento del gel fue bajo las mismas condiciones de los geles anteriores.

Se introdujo la membrana de PVDF<sup>o</sup> durante 15 seg en metanol puro, se retiró y se colocó 30 min en amortiguador de transferencia. El gel se colocó en el emparedado de la cámara de transferencia<sup>p</sup>, para ser transferido en el siguiente orden, esponja, papel filtro, membrana de PVDF, gel, papel filtro y esponja, se colocó todo lo anterior dentro de la cámara de transferencia y se le agregó amortiguador de Towbin frío, adicionado con 0.037% de SDS. La cámara de transferencia se colocó dentro de un recipiente que contenía hielo. La transferencia se realizó a 100 Volts<sup>m</sup> durante 1 h. Después se retiró la membrana y se tiñó con solución de azul brillante de Coomassie sin ácido acético por 30 min., posteriormente se destiñó la membrana con solución desteñidora sin ácido acético. Cuando aparecieron las bandas se retiró de la solución y se lavó por unos segundos con agua, la membrana de PVDF que contenía las PME de *S. gallinarum* se colocó entre dos papeles filtro y se guardó a 4°C.

## SECUENCIACIÓN AMINO TERMINAL DE LA PME DE 30 kDa DE *Salmonella gallinarum*

La membrana de PVDF que contenía las PME de *Salmonella gallinarum* se introdujo en un secuenciador automático<sup>q</sup>. Lo anterior fue llevado a cabo por el Dr. Mendoza, experto en el área en el Depto. de Bioquímica, de la Fac. de Medicina de la UNAM para obtener la secuencia amino de la proteína por medio de la reacción de Edman.<sup>14</sup>

<sup>o</sup> Bio-Rad

<sup>p</sup> Bio-Rad. Mod Mini Trans-Blot Transfer Cell

<sup>q</sup> Beckma. Mod LF300

## GELES DE DOBLE DIMENSIÓN

Esta técnica fue descrita por O'Farrell<sup>60</sup> en 1975 y consiste en la separación de las proteínas con base en su punto isoelectrico y PM.

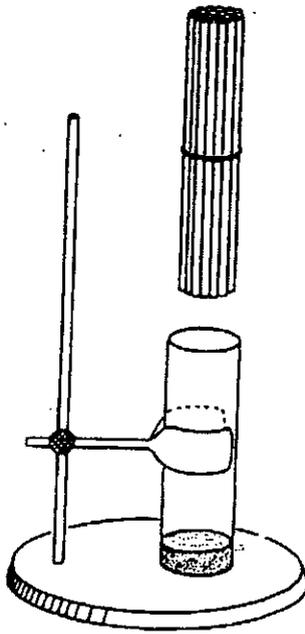
Los tubos capilares se llenaron hasta tres cuartas partes de su capacidad con solución monomérica (**Figura 3**), se dejaron polimerizar 2 h, posteriormente se conectaron los capilares al tubo conector y con una jeringa de insulina se llenaron los capilares con NaOH 100 mM, cuando estuvieron llenos los capilares, se colocaron en la cámara superior de geles de doble dimensión,<sup>f</sup> la cámara inferior se llenó con 800 ml de amortiguador H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, y posteriormente se llenó la cámara superior con 75 ml de NaOH 100 mM. Se precorrieron los geles por 10 min a 200 Volts,<sup>m</sup> 15 min a 300 Volts y 15 min a 400 volts. Cuando se terminó el precorrimiento se retiraron los dos amortiguadores de las cámaras, el amortiguador de los capilares se retiró con una jeringa de insulina.

Las muestras de PME de *Salmonella gallinarum* cultivada en CN, CNS y CNSD se trataron agregando amortiguador de muestra para geles de doble dimensión en una concentración 1:1, y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Con una punta delgada se colocaron las muestras de proteínas a una concentración de 20 µg por capilar, posteriormente se agregó la misma cantidad de amortiguador de cubrimiento, se terminaron de llenar los capilares con NaOH 100 mM, nuevamente se colocaron los capilares en la cámara superior, las dos cámaras se llenaron con sus amortiguadores respectivos; y los geles se corrieron por 16 h a 200 volts. Cuando terminaron de correr los geles, se retiraron del capilar y se colocaron sobre un gel preparador de poliacrilamida-SDS<sup>k</sup> al 12% de 1 mm de ancho (**Figura 3**), en un pozo se colocó MPM, los geles se corrieron a 50 Volts,<sup>m</sup> cuando terminó la separación electroforética se tiñeron con plata.

---

<sup>f</sup> Bio-Rad. Mod Mini-PROTEAN 2-D Cell

**A**



**B**

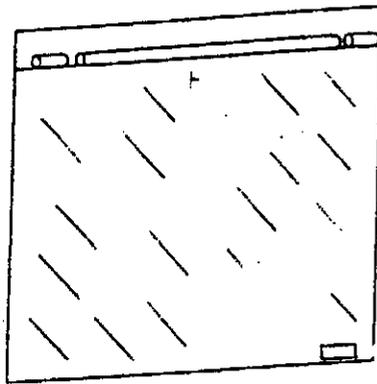


Figura 3 . A Ensamblaje de los tubos capilares para el gel de una dimensión , B Esquema del montaje de el gel de una dimensión en el gel de segunda diemensión.

## EXTRACCIÓN DE ADN

Se cultivó *Salmonella gallinarum* cepa FVB323 en 20 ml de CN toda la noche a 37°C<sup>e</sup> a 200 rpm, la pastilla de bacterias se suspendió en 567 µl de solución Tris 10 mM-EDTA 1mM pH 8 (TE), posteriormente se le agregaron 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K que estaba a una concentración de 20 mg/ml, el tubo se mezcló por 5 min y se incubó 1 h a 37°C,<sup>e</sup> después de la incubación se le adicionaron 100 µl de NaCl 5M, el tubo se mezcló y se le agregaron 80 µl de CTAB/NaCl, se mezcló y se incubó 10 min a 65°C,<sup>g</sup> posteriormente se le agregó 800 µl de una solución cloroformo: alcohol isoamílico con una proporción de 24:1, se mezcló y se centrifugó 5 min. a 12,000 rpm,<sup>i</sup> se tomó el sobrenadante, se colocó en otro tubo y se agregó un volumen igual de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico con una proporción de 25: 24: 1, se mezcló y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm,<sup>i</sup> se retiró el sobrenadante y se le adicionó 0.6 del volumen del tubo, de isopropanol frío, se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µl etanol frío, se mezcló por 5 min y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se decantó el etanol y se le agregaron 500 µl etanol frío al 70%, se mezcló y se centrifugó 5 min. a 12,000 rpm, se decantó, la pastilla se suspendió en 50 µl de TE y se le agregó RNAasa a una concentración de 50 mg/ml, se cuantificó<sup>h</sup> el ADN y se corrieron 5 µl de ADN en un gel de agarosa,<sup>i</sup> posteriormente las muestras se guardaron a 4°C.

## DISEÑO DE INICIADORES PARA PCR

El diseño de los iniciadores se realizó utilizando el programa DNAMAN y seleccionando regiones conservadas de la secuencia nucleotídica de *ompA* de *S. typhimurium*<sup>18</sup> con *ompA* de *E. coli* sulA, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y *Serratia marcescens*. Las regiones en *S. typhimurium* donde se diseñaron los iniciadores fueron: del inicio del nucleótido 264 al 286 con la secuencia 5' GCTCCGAAAGATAACACCTGGTA 3' y del iniciador de termino del nucleótido 1233 al 1254 con la secuencia 5' CTTAAGCCTGCGGCTGAGTTAC 3', con dichos iniciadores se logró amplificar una región de 972 nucleótidos en *S. gallinarum*.

<sup>g</sup> Hoefer. Mod DyNA Quant 200

<sup>i</sup> Life Technologies. Mod Horizon 58

## PCR

Se realizó una premezcla a 2.5 mM de MgCl con las siguientes cantidades para cada reacción: 4.16 µl de MgCl a una concentración de 30 mM, 5 µl de amortiguador de PCR, 2 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM, 3 µl de cada iniciador a una concentración de 10 ng/µl, 2 µl de *Taq* polimerasa a una concentración de 5 unidades/µl, 25.84 µl de H<sub>2</sub>O µl. En tres tubos se colocaron 45 µl de la premezcla, en uno de los tubos se agregaron 5 µl de ADN de *S. typhimurium* a una concentración de 70 ng/µl como control positivo, en otro tubo 5 µl de ADN de *S. gallinarum* a una concentración de 90 ng//µl y por último en otro tubo 5 µl de H<sub>2</sub>O control negativo. Se mezclaron suavemente y se metieron al termociclador<sup>u</sup> bajo las siguientes condiciones 10 min a 92°C, 1 min a 92°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C, por 35 ciclos y 15 min a 72°C. En un gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio, se colocaron 10 µl de cada uno de los productos de PCR a los cuales se les adicionó amortiguador de muestra de ADN en una proporción de 1:5, el gel se corrió en una cámara de electroforesis<sup>l</sup> a 80 volts<sup>m</sup> hasta que el colorante pasó las tres cuartas partes del gel, posteriormente se observó el gel en un transiluminador<sup>v</sup> de luz ultravioleta y se le tomó una fotografía. Los productos de PCR se guardaron en refrigeración.

## PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se purificaron utilizando el estuche comercial<sup>w</sup>. Se sacaron de refrigeración los productos de PCR se colocaron en un tubo con filtro. La cantidad de productos de PCR fue de 200 µl, se les agregaron 400 µl de solución de unión (H1), se centrifugó 1 min a 12,000 rpm<sup>i</sup>, se descartó el sobrenadante, después se agregaron 700 µl de amortiguador de lavado (H2) al filtro y se centrifugó 1 min a 12,000 rpm, se descartó la solución del fondo del tubo y se volvió a centrifugar 1 min a 12,000 rpm para retirar todos los residuos del amortiguador de lavado. Posteriormente se agregaron sobre el filtro 50 µl de H<sub>2</sub>O desionizada esteril a 65°C, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó 2 min. a 12,000 rpm., después de este paso el producto de PCR se obtuvo del fondo del

<sup>u</sup> Perkin Elmer. Mod Gene Amp PCR System 2400

<sup>v</sup> Fotodyne Incorporated. Mod Foto/UV21

<sup>w</sup> The Concert<sup>TM</sup> Rapid PCR Purification System

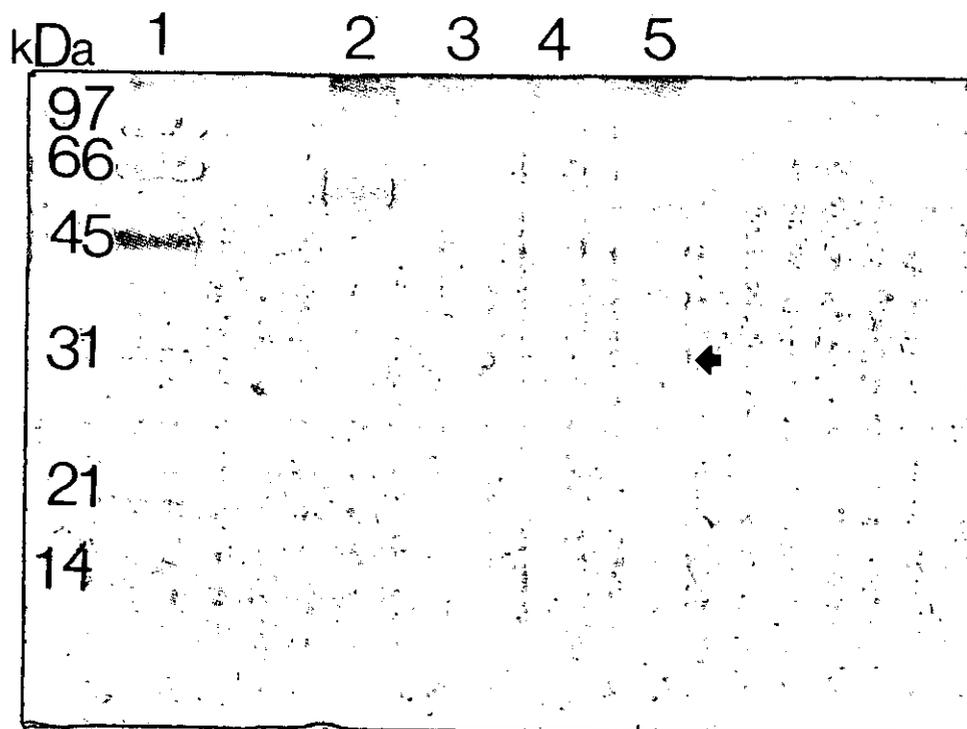
tubo. El producto de la purificación se cuantificó<sup>s</sup> obteniéndose una concentración de 190 ng/μl y se separaron 3 μl en un gel de agarosa al 1%, y lo restante se almaceno a 4°C.

#### SECUENCIACIÓN NUCLEOTIDICA

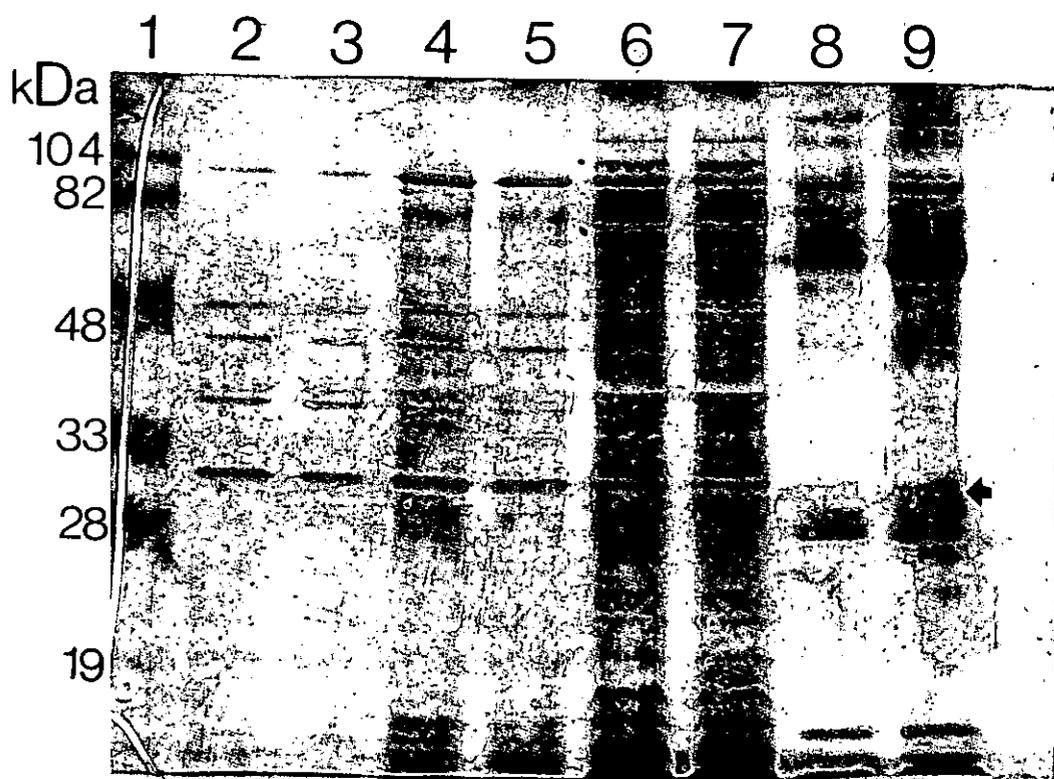
La secuencia del gene se realizó en un secuenciador automático, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, localizado en la Unidad de Síntesis de Oligos, bajo la responsabilidad del M en C René Hernández.

## RESULTADOS

Los geles que contenían las PME de *Salmonella gallinarum* cultivada en CN, CNS y CNSD se tiñeron con tinción de plata y azul brillante de Coomassie, se observó una disminución en la expresión de la PME de 30 kDa cuando es cultivó 8 h a 37 °C en CNS (**Figura 4**), no observándose el mismo fenómeno cuando la bacteria es cultivada 16 h a la misma temperatura bajo las mismas condiciones de cultivo (**Figura 5**). También se observaron otras variaciones en diferentes PME, como previamente lo describió Huerta *et al.*<sup>30</sup>

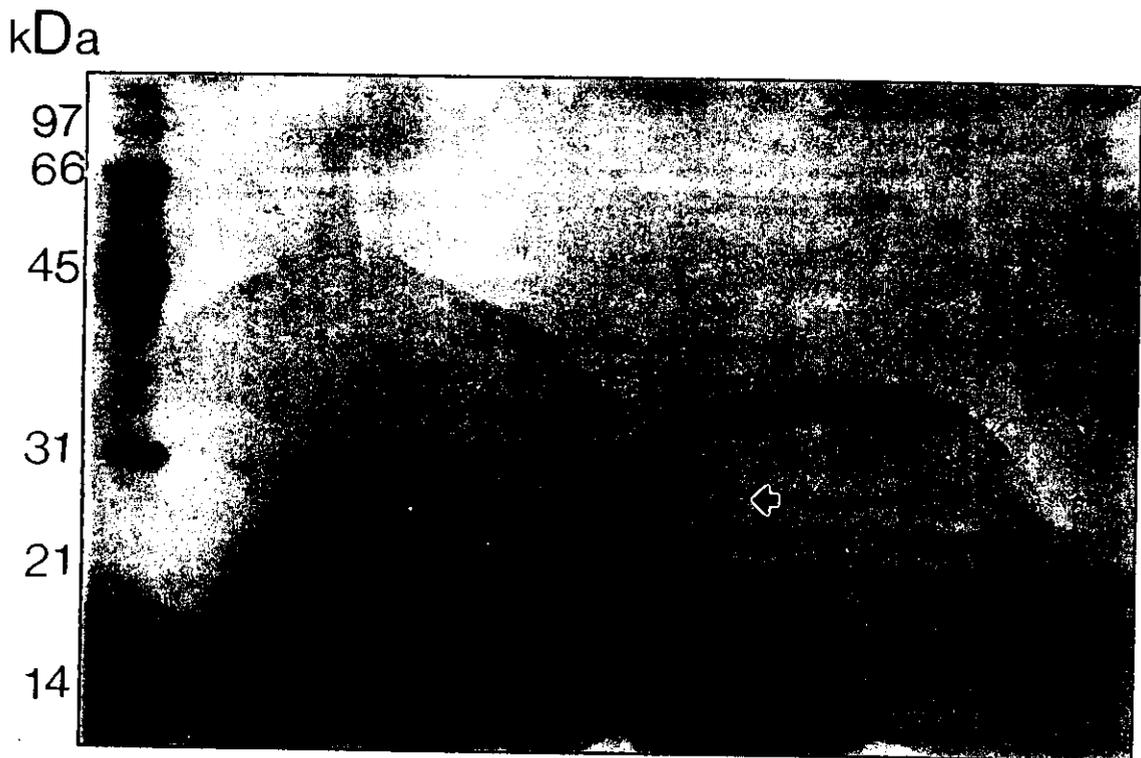


**FIGURA 4.** Gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS teñido con plata, donde se separaron PME de *Salmonella gallinarum* cultivada por 8 h en tres diferentes condiciones de crecimiento. MPM (Carril 1); albúmina sérica bovina (Carril 2); CN (Carril 3); CNS (Carril 4) y CNSD (Carril 5). Con la flecha se señala la banda de aproximadamente 30 kDa.

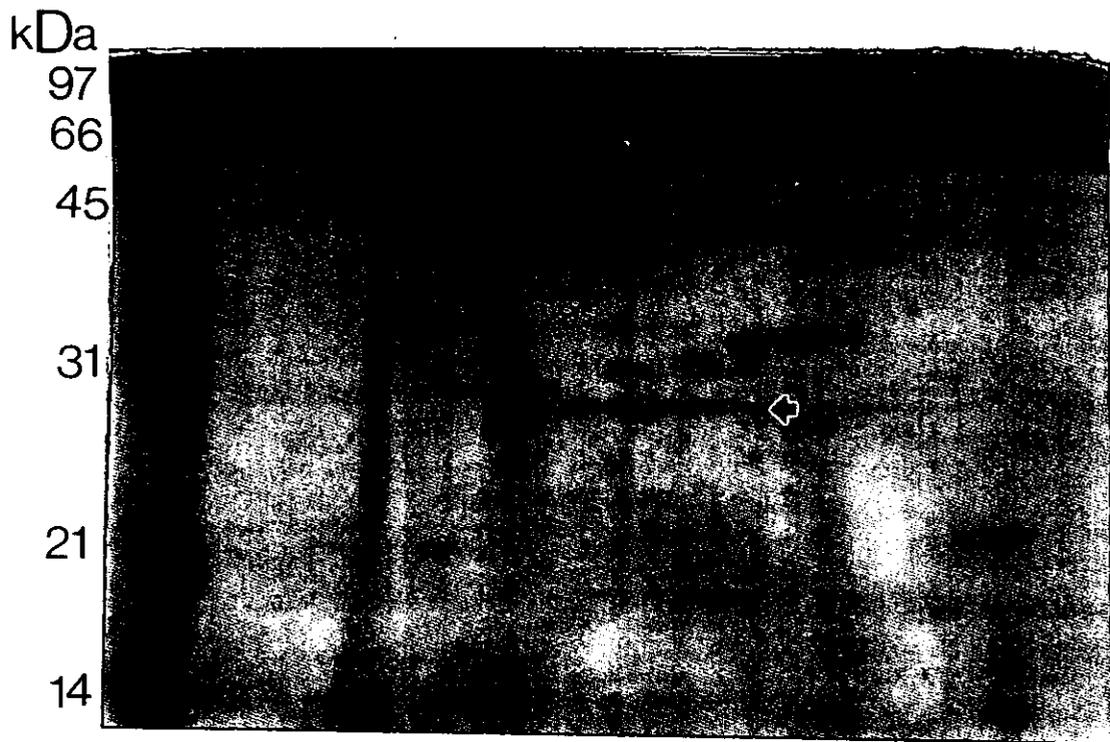


**FIGURA 5.** Gel desnaturante de poliacrilamida-SDS teñido con plata, donde se separaron PME de *Salmonella gallinarum* cultivada por 16 h en tres diferentes condiciones de crecimiento. MPM (Carril 1); CN (Carriles 2 y 3); CNS (Carriles 4 y 5); CNSD (Carriles 6 y 7); CN-suero dilución 1:20 (Carril 8) y CN-suero dilución 1:10 (Carril 9). Con la flecha se señala la banda de aproximadamente 30 kDa.

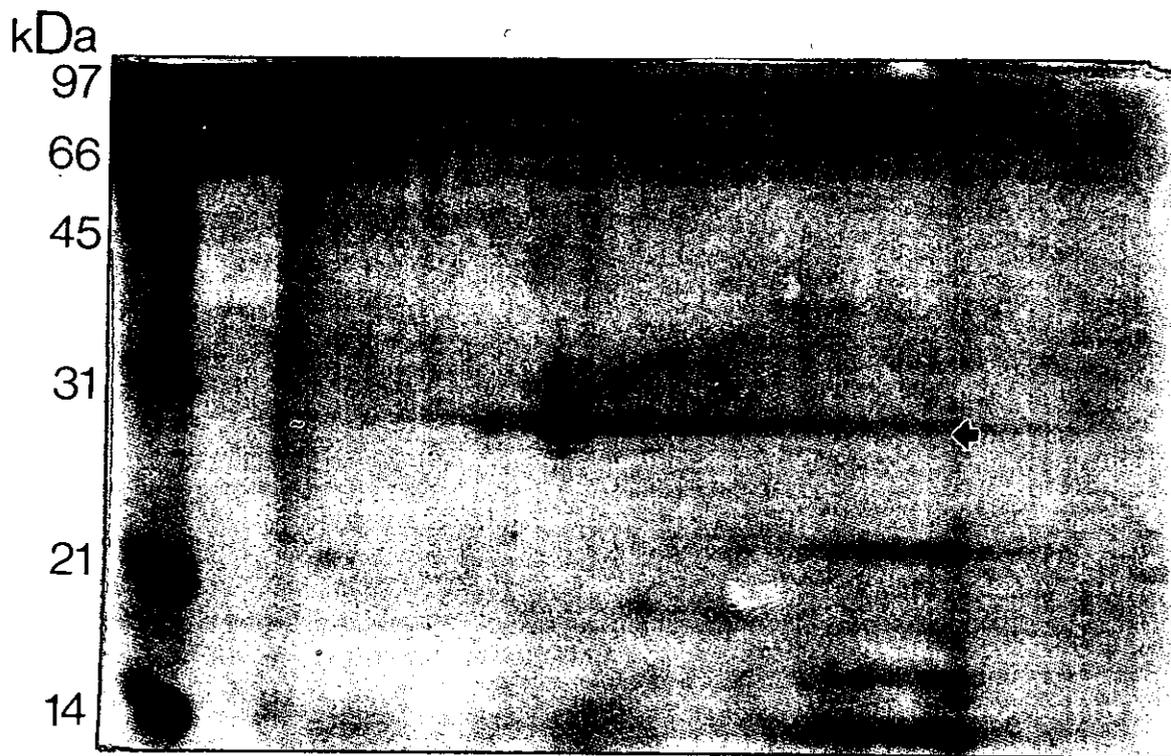
En los geles de doble dimensión teñidos con plata, también se observó una disminución en la expresión de la PME mayoritaria de 30 kDa, cuando *Salmonella gallinarum* fue crecida 8 h en CNS, no observándose lo mismo cuando se cultivó la bacteria el mismo tiempo en CN y CNSD (Figuras 6, 7 y 8).



**FIGURA 6.** Gel de doble dimensión teñido con tinción de plata. PME de *Salmonella gallinarum* cultivada en CN por 8 h a 37 °C (con la flecha se señala la banda de aproximadamente 30 kDa).



**FIGURA 7.** Gel de doble dimensión teñido con tinción de plata. PME de *Salmonella gallinarum* cultivada en CNS por 8 h a 37 °C (con la flecha se señala la banda de aproximadamente 30 kDa).



**FIGURA 8.** Gel de doble dimensión teñido con tinción de plata. PME de *Salmonella gallinarum* cultivada en CNSD por 8 h a 37 °C (con la flecha se señala la banda de aproximadamente 30 kDa).

Secuencia amino terminal de la PME de 30 kDa

La secuencia de la región amino terminal de la PME de 30 kDa de *S. gallinarum* es la siguiente:

Alanina, Prolina, Lisina, ácido Aspartico, Asparagina, Treonina, Triptofano, Tirocina, Alanina, Glicina, Alanina, Lisina, Leucina, Glicina, Triptofano, Serina, Glutamina y Tirocina.

La secuencia amino terminal resultó 100% idéntica a la de OmpA de *S. typhimurium*. En contraste, la secuencia amino de OmpA de *S. gallinarum* mostró diferentes grados de identidad comparada con OmpA de diferentes bacterias. Ver **Tabla 1**.

**Tabla 1** Homología del extremo amino de la proteína de 30 kDa con otras bacterias.

BACTERIA	PORCENTAGE DE HOMOLOGÍA
<i>Salmonella typhimurium</i>	100
<i>Escherichia coli</i>	93
<i>Enterobacter aerogenes</i>	93
<i>Serratia mercenses</i>	93
<i>Shigella dysenteriae</i>	93
<i>Yersinia pestis</i>	81

La secuencia nucleotídica de OmpA de *S. typhimurium* presentó homología con otras OmpA de: *E. coli* sulA y *Escherichia coli* en un 85%, *Klebsiella pneumoniae* 83%, *Enterobacter aerogenes* 80% y *Serratia marcescens* 76%.

Con base en la homología con OmpA de *S. typhimurium* se diseñaron los siguientes iniciadores del nucleotido:

Extremo amino 23 nucleotidos

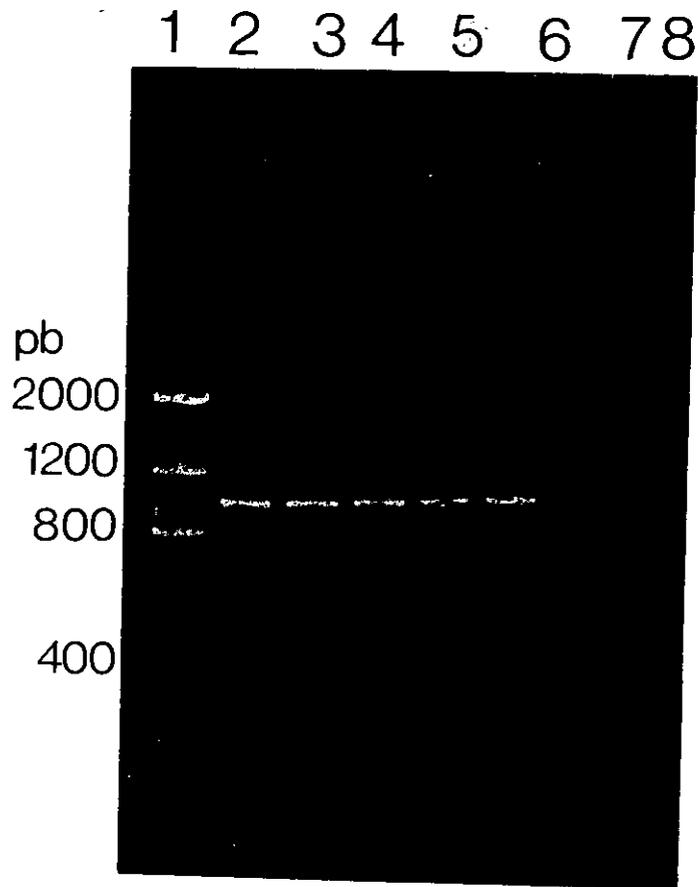
- 5' GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG TA 3'

Extremo carboxilo 22 nucleotidos

- 5' CTT AAG CCT GCG GCT GAG TTA C 3'

Ambos iniciadores tienen una temperatura media de 58°C.

Por medio de la técnica de PCR se logro amplificar una parte del gène que codifica para la PME de 30 kDa (**Figura 9**).



**FIGURA 9.** Gel de agarosa con productos de PCR. MPM Low DNA MASS Ladder (Carril 1); ADN de *Salmonella gallinarum* (Carriles 2 al 5); ADN de *Salmonella typhimurium* (Carriles 6) y agua (Carril 8). Con la flecha se señala la banda amplificada de aproximadamente 972 pb.

El fragmento de ADN correspondiente a la secuencia nucleotídica de la PME de 30 kDa de *Salmonella gallinarum* que se obtuvo fue de 972 bp (**Figura 10**).

Cuando se comparó la secuencia nucleotídica de *S. gallinarum* en un banco de genes se obtuvieron los siguientes resultados de homología con otros genes: **Tabla 2**.

**Tabla 2** Comparación de nucleótidos de *ompA* de *Salmonella gallinarum*

BACTERIA	GENE	DIF DE REG. A.A	HOMOLOGÍA
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>ompA</i>	9-48	96%
<i>Escherichia coli</i> K-12	Sección 88 a 400 del genoma completo		90%
<i>Escherichia coli</i>	ADN genómico (22.0-22.3, 21.7-22.1 min.)		90%
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>ompA</i>	22-52 y 324-359	90%
<i>Escherichia coli</i>	Outer membrane protein II ( <i>ompA</i> )		90%
<i>Escherichia coli</i>	<i>ompA</i>		90%
<i>Escherichia hermanniae</i>	Outer membrane protein II ( <i>OmpA</i> )		89%
<i>Escherichia fergusonii</i>	Outer membrane protein II ( <i>ompA</i> )		89%
<i>Citrobacter freundii</i>	Outer protein membrane II ( <i>ompA</i> )		89%
<i>Escherichia vulneris</i>	Outer protein membrane II ( <i>ompA</i> )		88%
<i>Escherichia coli</i> sulA	<i>ompA</i> que codifica para una proteína sulA		87%
<i>Shigella flexneri</i>	Outer protein membrane II ( <i>ompA</i> )		86%
<i>Escherichia blattae</i>	Outer protein membrane II ( <i>ompA</i> )		86%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>ompA</i>	6-124, 324-357 y 768-780	84%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>ompA</i>		84%
<i>Serratia odorifera</i>	Outer protein membrane II ( <i>ompA</i> )		83%
<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>ompA</i>		81%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Outer protein membrane II ( <i>ompA</i> )	10-56, 770-1074	79%
<i>Serratia marcescens</i>	<i>ompA</i>	19-90 y 556-570	73%

FIGURA 10. Secuencia nucleotídica del gene *ompA* y la respectiva predicción de aminoácidos de OmpA de *Salmonella gallinarum*. Se señalan los nucleótidos y aminoácidos diferentes en comparación con *Salmonella typhimurium*.

1 GNTAGNTAGNCGTAGGGTTCTAACTACGTGATGCTCACATGGAGGGCGCCCTCAGTACCAT  
1 ??????\*\*\*\*\*??\*GlySerAsnTyrValMETLeuThrTrpArgArgProGlnTyrHis

C

61 GACACCGGCTTCATTCACAATGATGGCCCCACTGATGAAAACCAACTGGGCGCAGGTGCT  
16 AspThrGlyPheIleHisAsnAspGlyProThrAspGluAsnGlnLeuGlyAlaGlyAla  
His

121 TTTGGTGGTTACCAGGTTAACCCGTATGTTGGCTTTGAAAGGGCTACGACTGGTTAGGC  
36 PheGlyGlyTyrGlnValAsnProTyrValGlyPheGluMETGlyTyrAspTrpLeuGly

181 CGTATGCCGTACAAAGGCGACAACATCAATGGCGCTTATAAAGCTCAGGGCGTTCAGTTG  
56 ArgMETProTyrLysGlyAspAsnIleAsnGlyAlaTyrLysAlaGlnGlyValGlnLeu

T

241 ACCGCTAAACTGGGTTATCCAATCACTGACGATCTGGACGTTTATACCCGTCTGGGTGGT  
76 ThrAlaLysLeuGlyTyrProIleThrAspAspLeuAspValTyrThrArgLeuGlyGly  
Phe

C

301 ATGGTATGGCGTGCAGACACCAAGTCTAATGTCCCTGGCGGCCCGTCTACTAAAGACCAC  
96 METValTrpArgAlaAspThrLysSerAsnValProGlyGlyProSerThrLysAspHis

T T

361 GACACCGGCGTTTCCCCGGTATTTCGGGGCGGTATCGAGTATGCCATCACCCCGAAATC  
116 AspThrGlyValSerProValPheAlaGlyGlyIleGluTyrAlaIleThrProGluIle

421 GCAACCCGTCTGGAATACCAGTGGACTAACAACATCGGTGATGCCAACACCATCGGCACC  
136 AlaThrArgLeuGluTyrGlnTrpThrAsnAsnIleGlyAspAlaAsnThrIleGlyThr

481 CGTCCGGACAACGGCCTGCTGAGCGTAGGTGTTTCCTACCGTTTCGGCCAGCAAGAAGCT  
156 ArgProAspAsnGlyLeuLeuSerValGlyValSerTyrArgPheGlyGlnGlnGluAla

A

541 GCTCCGGTAGTAGCTCCGGCACCGGCTCCGGCTCCGGAAGTACAGACCAAGCACTTCACT  
176 AlaProValValAlaProAlaProAlaProAlaProGluValGlnThrLysHisPheThr

T

601 CTGAAGTCTGACGTACTGGTCAACTTCAACAAATCTACCCTGAAGCCGGAAGGCCAGCAG  
196 LeuLysSerAspValLeuValAsnPheAsnLysSerThrLeuLysProGluGlyGlnGln  
Phe

## T

661 GCTCTGGATCAGCTGTACAGCCAGCTGAGCAACCTGGATCCGAAAGACGGTTCCGTTGTC  
216 AlaLeuAspGlnLeuTyrSerGlnLeuSerAsnLeuAspProLysAspGlySerValVal

Ile

721 GTTCTGGGCTTCACTGACCGTATCGGTTCTGACGCTTACAACCAGGGTCTGTCCGAGAAA  
236 ValLeuGlyPheThrAspArgIleGlySerAspAlaTyrAsnGlnGlyLeuSerGluLys

781 CGTGCTCAGTCTGTTGTTGATTACCTGATCTCCAAAGGTATTCCGTCTGACAAAATCTCC  
256 ArgAlaGlnSerValValAspTyrLeuIleSerLysGlyIleProSerAspLysIleSer

841 GCACGTGGTATGGGCGAATCTAACC CGGTTACCGGCAACACCTGTGACAACGTGAAACCT  
276 AlaArgGlyMETGlyGluSerAsnProValThrGlyAsnThrCysAspAsnValLysPro

901 CGCGCTGCCCTGATCGATTGCCTGGCTCCGGATCGTCGCGTAGAGATCGAAGTTAAAGGC  
296 ArgAlaAlaLeuIleAspCysLeuAlaProAspArgArgValGluIleGluValLysGly

961 GTTAAAGACGGA  
316 ValLysAsp

Utilizando el programa DNAMAN se comparó la secuencia e nucleótidos de la PME de 30 kDa de *Salmonella gallinarum* con *Salmonella typhimurium* (Figura 11) y se observó que la región mas variable fue 9 a 50 nucleótidos en *Salmonella gallinarum* que corresponde a la región de 269 a 310 en *Salmonella typhimurium* **Tabla 3**.

**Tabla 3** variación de nucleótidos y aminoácidos entre *S. gallinarum* y *S. typhimurium*

BACTERIA	NUCLEOTIDO		AMINOACIDO	HIDROFO	GRUPO
<i>Salmonella gallinarum</i>	94	G	Asparagina	-3.0	R polar sin carga
<i>Salmonella typhimurium</i>	354	C	Histidina	-1.7	R cargado positivo
<i>Salmonella gallinarum</i>	280	G	Valina	2.3	R apolar alifático
<i>Salmonella typhimurium</i>	537	T	Fenilalanina	2.5	R aromático
<i>Salmonella gallinarum</i>	330	T	Asparagina	-3.0	R polar sin carga
<i>Salmonella typhimurium</i>	590	C	Asparagina	-3.0	R polar sin carga
<i>Salmonella gallinarum</i>	405	C	Alanina	-1.0	R apolar alifático
<i>Salmonella typhimurium</i>	665	T	Alanina	-1.0	R apolar alifático
<i>Salmonella gallinarum</i>	414	C	Prolina	-0.29	R apolar alifático
<i>Salmonella typhimurium</i>	674	T	Prolina	-0.29	R apolar alifático
<i>Salmonella gallinarum</i>	564	G	Prolina	-0.29	R apolar alifático
<i>Salmonella typhimurium</i>	824	A	Prolina	-0.29	R apolar alifático
<i>Salmonella gallinarum</i>	619	G	Valina	2.3	R apolar alifático
<i>Salmonella typhimurium</i>	879	T	Fenilalanina	2.5	R aromático
<i>Salmonella gallinarum</i>	680	G	Serina	-1.1	R apolar sin carga
<i>Salmonella typhimurium</i>	940	T	Isoleucina	3.1	R apolar alifático





Se comparó la secuencia deducida de aminoácidos de OmpA de *Salmonella gallinarum* con la de otras bacterias y se obtuvieron los siguientes resultados: **Tabla 4.**

**Tabla 4** Comparación de la secuencia de aminoácidos de OmpA de *Salmonella gallinarum*

BACTERIA	HOMOLOGÍA
<i>Salmonella typhimurium</i>	95 %
<i>Escherichia hermannii</i>	91.7 %
<i>Escherichia fergusonii</i>	91.7 %
<i>Citrobacter freundii</i>	90.9 %
<i>Shigella flexneri</i>	88.8 %
<i>Escherichia coli</i>	88.7 %
<i>Escherichia coli</i>	88.4 %
<i>Escherichia vulneris</i>	88.4 %
<i>Shigella dysenteriae</i>	88.4 %
<i>Escherichia vulneris</i>	88.0 %
<i>Enterobacter aerogenes</i>	86.8 %
<i>Escherichia blattae</i>	86.0 %
<i>Escherichia vulneris</i>	81.8 %
<i>Klesiella pneumoniae</i>	80.8 %
<i>Enterobacter aerogenes</i>	78.0 %
<i>Serratia marcencens</i>	71.4 %

Utilizando como base la estructura secundaria de OmpA de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli*, se pudo deducir la estructura secundaria de OmpA de *Salmonella gallinarum* (Figura 12), encontrándose una gran homología con estas bacterias.

Las estructuras que se ducen son:

1ª Región transmembranal	13-15 aa
2ª Región transmembranal	31-42 aa
3ª Región transmembranal	45-61 aa
4ª Región transmembranal	73-82 aa
5ª Región transmembranal	87-101 aa
6ª Región transmembranal	122-132 aa
7ª Región transmembranal	138-148 aa
8ª Región transmembranal	160-172 aa
9ª Región transmembranal	179-184 aa
10ª Región transmembranal	195-202 aa
11ª Región transmembranal	214-219 aa
12ª Región transmembranal	233-237 aa
13ª Región transmembranal	263-269 aa
14ª Región transmembranal	273-277 aa
15ª Región transmembranal	281-287 aa
16ª Región transmembranal	308-318 aa
Región repetitiva	180-187 aa
Dominio igual a OmpA	135-280 aa
Motivo 1	204-224 aa
Motivo 2	234-249 aa
Motivo3	249-265 aa

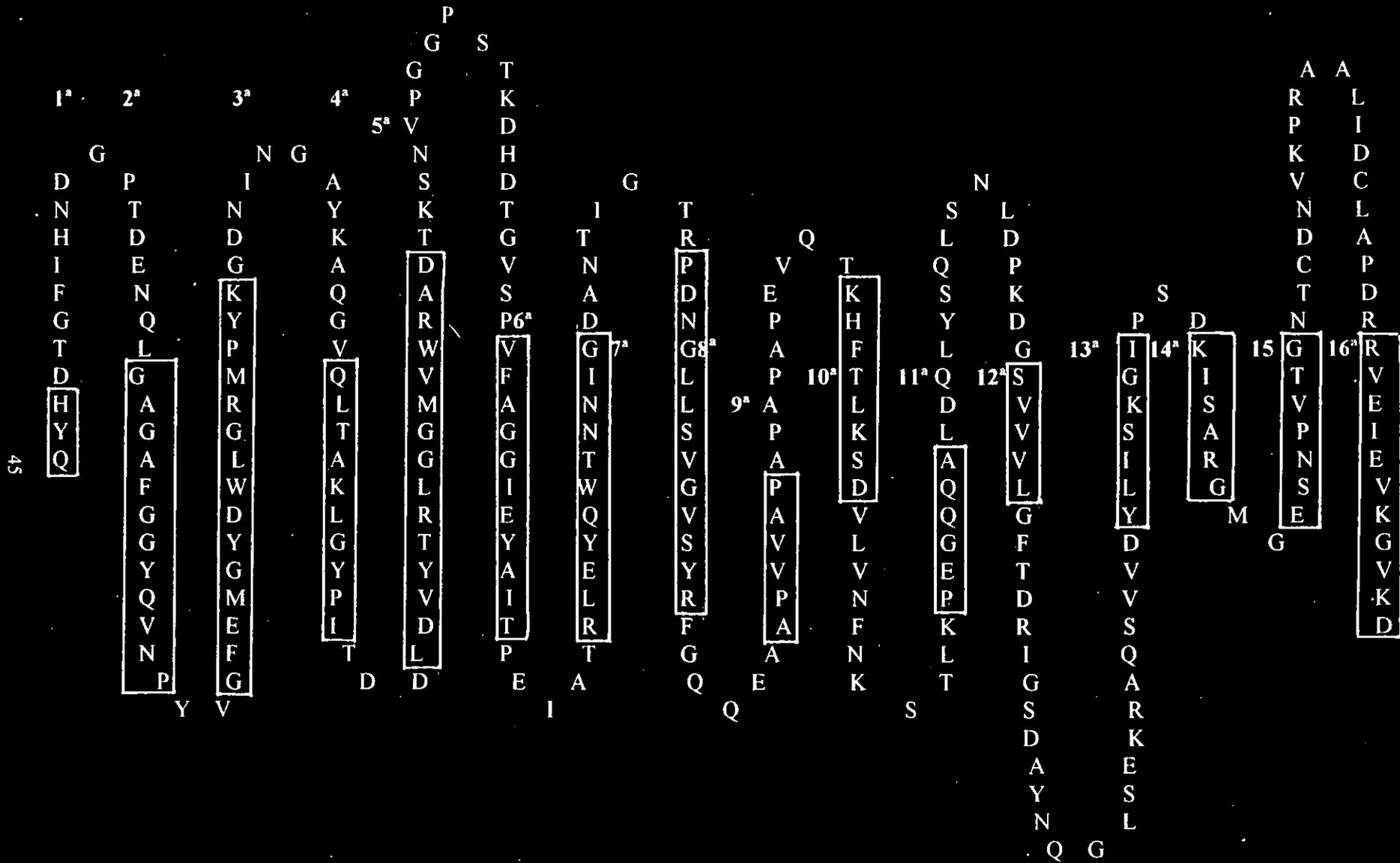


Figura 12. Predicción de la estructura secundaria de OmpA de *Salmonella gallinarum*

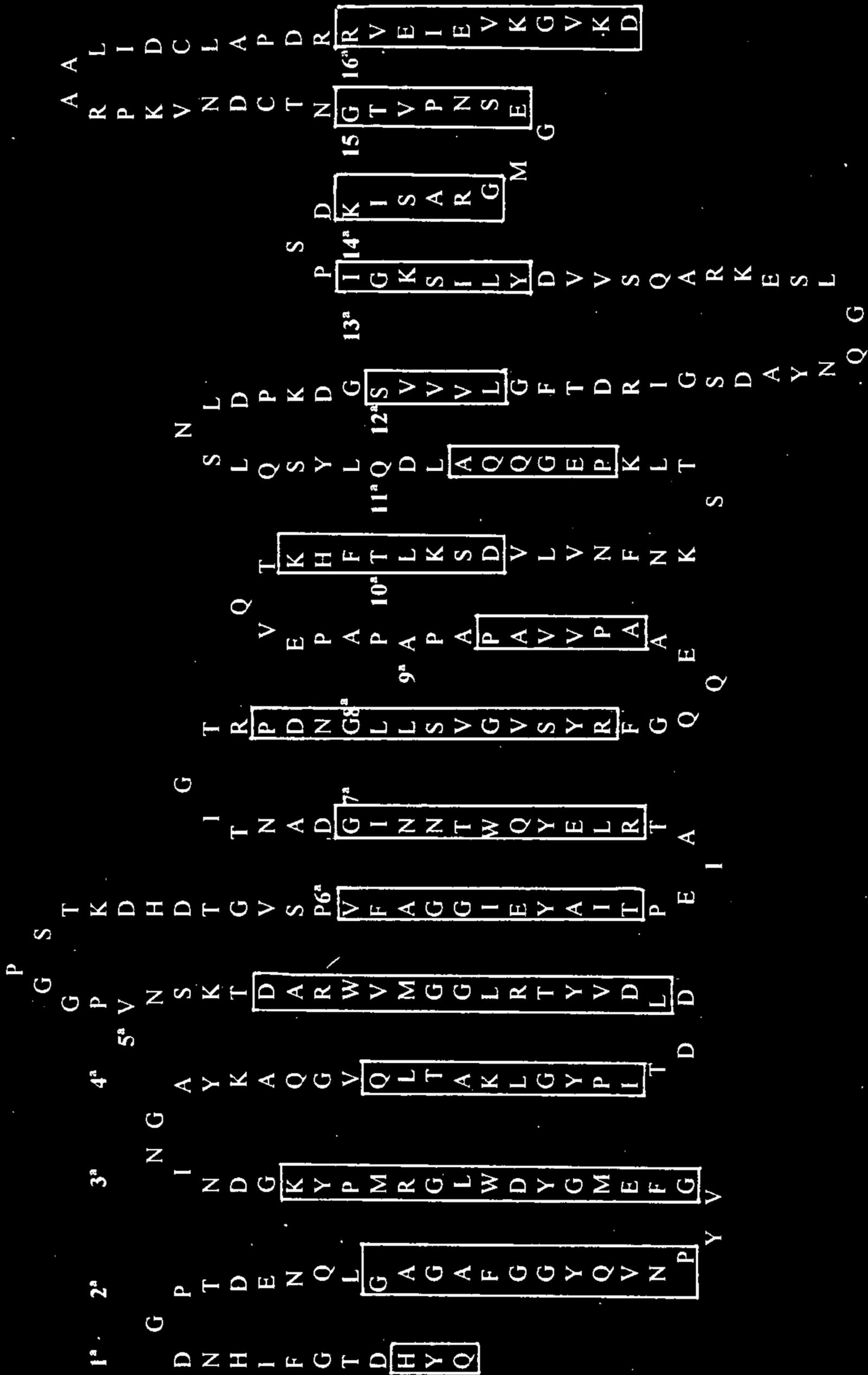


Figura 12. Predicción de la estructura secundaria de OmpA de *Salmonella gallinarum*

Así mismo se observó que los 4 aminoácidos diferentes entre *Salmonella gallinarum* y *Salmonella typhimurium* se encuentran en:

- aa 27 Asparagina se encuentra en la 1ª asa expuesta
- aa 89 Valina se encuentra en 5ª región transmembranal
- aa 202 Valina se encuentra en la 10ª región transmembranal.
- aa 221 Serina se encuentra 6ª asaexpuesta.

Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de OmpA de *Salmonella gallinarum* con OmpA de *Escherichia coli* cristalizada por Pautsch y Schulz en 1998 se encuentra una homología del 81%, en la región del 13 al 171 aminoácidos.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se reporta por primera vez la secuencia de nucleótidos, aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de OmpA de *S. gallinarum*.

Previamente, Huerta *et al.*<sup>30</sup> demostraron que la PME de 30 kDa de *S. gallinarum* es una proteína altamente inmunogénica y disminuye su expresión en la membrana externa en presencia de Complemento sérico de aves. En este trabajo se demuestra que dicha proteína es OmpA, ya que cuando se secuenció su extremo amino y se realizó la comparación de aminoácidos en un banco de genes se encontró que era 100% idéntica a OmpA de *S. typhimurium*.<sup>18</sup> Por lo anterior, la estrategia a seguir para secuenciar el gene fue diseñar iniciadores a partir de regiones conservadas de las secuencias de nucleótidos (nc) situados en los extremos 5' y 3' de *ompA* de diferentes enterobacterias. Una de las razones para seleccionar las secuencias es por la alta homología que hay a nivel de extremo amino y carboxilo ya que son partes estructurales de la proteína, son conservadas y los cambios son mínimos.<sup>21</sup> Posteriormente, el gene se amplificó, se secuenció y cuando se realizó la comparación de nc se encontró que OmpA de *S. gallinamum* era 96% idéntica a OmpA de *S. typhimurium* y en la secuencia deducida de aminoácidos existía una homología del 95%.

Cuando se creció *S. gallinarum* en CN, CNS y CNSD, se observó una disminución en la expresión de la PME de 30 kDa en el cultivo en CNS, lo cual ya había sido reportado por Huerta *et al.*,<sup>30</sup> pero dicha disminución se observó a las 8 h 37 °C a 200 rpm en CNS (**Figura 4**), no observándose el mismo fenómeno cuando la bacteria es cultivada 16 h a la misma temperatura bajo las mismas condiciones de cultivo (**Figura 5**) en contraste con lo reportado previamente. La disminución en la expresión de OmpA de *S. gallinarum*, cultivada en CNS y observada en geles de poliacrilamida tanto de una como de dos dimensiones, teñidos con plata y azul brillante de Coomassie, se puede deber, entre otras posibilidades a que el gene *ompA*, respondió a la presencia del Complemento o de otros componentes del suero ausentes en CNSD.

La regulación de *ompA* podría estar a nivel transcripcional o la traducción no se llevó a cabo, o si se llevó a cabo pero la regulación se presentó a nivel post-traducciona l y la proteína ya traducida no se ensambló en la ME.

Se ha reportado una proteína llamada factor del huésped I (Hfq) la cual se une de manera específica al ARNm de *ompA*, se sugiere que reconoce sitios metilados del ARN, abarcando los sitios de corte de la RNasa E, por lo cual modifica la estructura secundaria del ARNm y estimula la degradación del mismo. Vytvytska *et al.*,<sup>110</sup> encuentran que mutaciones de *hfq1* afectan la estabilidad del ARNm de *ompA* lo cual conduce a un incremento en la vida media del ARNm de *ompA*, no siendo así en las mutaciones de *hfq2*.

Recientemente,<sup>26</sup> al cultivar *E. coli* en presencia de suero de humano, observaron que OmpA es liberada al medio de cultivo y que dicha liberación depende de los factores del suero ya que en el cultivo del medio sin suero, no existe dicha liberación de OmpA al medio. Con base en lo anterior es también probable que OmpA de *S. gallinarum*, cuando es cultivada en CNS, exprese un fenómeno similar al descrito para *E. coli*. Dicha liberación al medio podría deberse a una acción indirecta de las proteínas del Complemento con OmpA de *S. gallinarum*, ya que la bacteria podría estar liberando a la proteína para “distraer” al sistema inmune y de esta manera los anticuerpos, el Complemento o ambos, reconocerían a las proteínas libres en el medio y no a la bacteria. Huerta *et al.*,<sup>30</sup> en 1996, demostraron que OmpA de *S. gallinarum* es altamente inmunogénica ya que se producen anticuerpos específicos contra ella y son detectados por ELISA, lo que podría apoyar la hipótesis planteada previamente y de esta manera protegerse contra el ataque de los anticuerpos que van dirigidos de manera específica hacia la proteína. Se debe considerar que OmpA es una proteína que se expresa de manera mayoritaria  $10^5$  moléculas por célula en la ME de la bacteria,<sup>82</sup> por lo que si se libera al medio, disminuye de manera importante el reconocimiento en la superficie bacteriana por parte de los anticuerpos, Complemento o ambos presentes en el suero sanguíneo.

Alternativamente, el cambio en el perfil electroforético de OmpA se puede atribuir a la acción del Complemento del suero de aves directamente sobre OmpA de *S. gallinarum*, ya que el tratamiento del suero durante 30 min a 56°C, inactiva las proteínas del Complemento C1, C2, C8 y C9 por lo cual, el Complemento no lleva a cabo su función sobre la bacteria por ninguna de las vías clásica y alterna. Por la vía clásica podría activarse ya que C3 se inactiva a 62°C por 30 min y el tratamiento que se le dio al suero no

lo inactivo, sin descartar que no sea necesaria la participación de la cascada del Complemento y que cooparticipara solo uno o algunos de los componentes, pero como también se inactivan C8 y C9 a 56°C, el Complemento no puede tener una actividad normal, ya que es preciso que todos los componentes estén fijos para que ocurra una lesión en la membrana. Por todo lo anterior, se puede pensar que el Complemento o algunas proteínas del Complemento participan en la regulación de la expresión en la ME de OmpA en *S. gallinarum*. Para esclarecer la acción del Complemento del suero de aves sobre *S. gallinarum* se sugieren los siguientes experimentos: cultivar *S. gallinarum* en presencia de sueros completos y de complementados de diferentes especies animales, para observar con otros sueros si presentan cambios en la expresión de OmpA y en caso contrario se podría pensar que el Complemento del suero de aves es específico para regular la expresión de dicha proteína. Otro experimento que se sugiere es someter al suero durante 30 min a 62°C para inactivar a C3 y observar la expresión de OmpA en ausencia de C3, lo anterior es con el fin de conocer si C3 es la proteína que regula la expresión de OmpA. Así mismo, se sugiere trabajar con otras especies de *Salmonella* y cultivarla en presencia de suero de los huéspedes a los que infectan para observar si la expresión de OmpA en la ME, en presencia de Complemento es conservada en el género.

Como se muestra en la **Figura 10 en Resultados**, el nucleótido (nc) 1 en *S. gallinarum* corresponde al nc 261 en *S. typhimurium* y el nc 971 de *S. gallinarum* corresponde al nc 1231 de *S. typhimurium*, puesto que el diseño del iniciador de inicio se realizó en la región 5' de OmpA de *S. typhimurium* que comienza en el nc 264, por lo que, la secuencia obtenida no incluye la región del promotor ni el péptido señal; y el iniciador terminal se diseñó en la región 3' de *ompA* de *S. typhimurium* a partir del nc 1233.

Cuando se compararon las secuencias de nc de *S. gallinarum* y *S. typhimurium* se observa que la región más variable es del nc 9 al 50 nc, lo cual no es raro ya que en el proceso de secuenciación las regiones de inicio presentan alto grado de error, esto se puede corregir diseñando iniciadores caminantes para tratar de amplificar el gene completo con su región promotora, y con esta nueva secuencia comparar nuevamente los nc de *S. gallinarum* con *S. typhimurium*.

En la comparación de aminoácidos (aa) de *S. gallinarum* con *S. typhimurium* se observó que solo 4 aa son diferentes. La asparagina 27 de *S. gallinarum*, en *S. typhimurium* cambia por histidina; la valina 89 y 202 cambian por fenilalanina; y la serina 221 cambia por isoleucina.

La estructura secundaria de OmpA de *S. gallinarum* (Fig 12) propuesta en este trabajo, está basada en las estructuras secundarias de *S. typhimurium* reportada por Freund y Cole<sup>18</sup> en 1983 y la de *E. coli* reportada por Stathopoulos<sup>91</sup> en 1996. Las estructuras anteriores se utilizaron porque la secuencia de nc y de aa presentaron alta homología con la secuencia de *S. gallinarum* que nosotros reportamos, en la que se sugiere que presenta 16 laminas  $\beta$  antiparalelas y 8 asas expuestas al exterior de la célula. Dicha predicción coincide con lo reportado por Jeanteur *et al.*,<sup>34</sup> quienes mencionan que la superfamilia de las porinas presentan 16 laminas  $\beta$  altamente conservadas y flanqueadas por 8 asas de secuencias variables que promueven giros y son de alta hidrofiliidad y baja anfipaticidad, y se presentan orientadas hacia la superficie de la célula. En el presente estudio se reporta que la estructura secundaria de OmpA de *S. gallinarum* corresponde a la familia de las porinas que forman poros, lo cual coincide con lo reportado por Sugawara y Nikaido,<sup>96, 97</sup> quienes al trabajar con OmpA de *E. coli* en una bicapa lipídica observan que esta proteína es capaz de producir un poro que permite el paso de ciertos solutos al interior de la célula bacteriana. Así mismo, Saint *et al.*,<sup>77</sup> 1993, midieron el tamaño del poro que es de 4.5 a 6 nm de largo y de 0.6 a 0.7 nm de diámetro, pero de estos canales que forma OmpA, únicamente de 2 a 3 % se presentan abiertos y permiten el paso de moléculas de L-arabinosa. Lo anterior es contradictorio con lo reportado por Pautsch y Schulz<sup>65</sup> quienes por difracción de rayos X, determinan la estructura del dominio transmembranal de OmpA de *E. coli* y concluyen que la proteína no es capaz de formar poro y que lo reportado anteriormente pudieran ser formas desnaturalizadas de la proteína. Se debe mencionar que la cristalización de la proteína solo se realizó únicamente con 171 aa, por lo que faltaría cristalizar la estructura del aa 172 al 325, los cuales, se sugiere que se encuentran unidos al peptidoglicano del sitio periplásmico<sup>65</sup> y podrían ser los aa que forman el interior del poro, por lo tanto, esta región sería importante para la permeabilidad selectiva al interior de la bacteria.

En la comparación de aa se observó que la región de 56 a 66 aa es idéntica a la de *S. typhimurium*, dicha región es la receptora de los fagos K3 y Tull en *E. coli*. Cuando se realizó la comparación de aa de OmpA de *S. typhimurium* y de *E. coli*, se reportaron diferencias en aa y se menciona que dichas diferencias permiten a *S. typhimurium* tener menor afinidad a los fagos K3 y Tull.<sup>18</sup> Por lo anterior, se sugiere que OmpA de *S. gallinarum* presenta también baja afinidad a dichos fagos.

Así mismo, cuando se realizó la predicción de la estructura secundaria de OmpA de *S. gallinarum* con base en las de OmpA de *S. typhimurium* y *E. coli* se encontró que el aa 27 presente en la 1ª asa expuesta en *S. gallinarum* es asparagina y pertenece al grupo R polar sin carga, en contraste, en *S. typhimurium* es histidina un R cargado positivo, aún y cuando tienen variación en la polaridad ambos son hidrofílicos y se considera que pueden formar puentes de hidrógeno con el agua que se encuentra en el exterior de la bacteria. Este cambio, por encontrarse en un asa expuesta se considera importante ya que la predicción de asas expuestas está relacionada con la unión de anticuerpos, colicinas o fagos, por lo que este cambio podría sugerir una variación antigénica entre ambas especies. Además, la diversidad de aa del asa determina la estructura específica del poro de cada porina de manera individual.<sup>115</sup>

Los aa 89 y el 202 son valina (apolar alifático) en *S. gallinarum*, en cambio, son fenilalanina (aromático) en *S. typhimurium*. Dichos aa se encuentran en la 5ª y 10ª región transmembranal, respectivamente, y por ser apolares e hidrofóbicos el cambio no se considera una variación importante ya que no modifican la estructura de la región, además, se menciona que estos aa apolares se encuentran interactuando favorablemente con la parte central de la membrana, que es característico en las PME.<sup>65</sup>

En la 6ª asa expuesta, la serina 221 es apolar sin carga en *S. gallinarum* mientras que en *S. typhimurium* es isoleucina apolar alifático.

En *E. coli* se sugiere que los aa 172 a 327, se unen al peptidoglicano periplásmico. Dos de los aa que varían entre *S. gallinarum* y *S. typhimurium* se encuentran en esta región y con base en los reportes de Sugawara y Nikaido<sup>96,97</sup> y Saint,<sup>77</sup> que mencionan que OmpA es capaz de formar poros, se sugiere que dichos cambios, sobre todo el de la serina 221, que es hidrofílica y es muy diferente a isoleucina que es hidrofóbica, pudiera estar presente en la

región del poro de la proteína, afectando la selección de los productos que entran a la bacteria, y por lo tanto, el cambio de aa sería importante ya que estaría expuesto a la superficie del poro.

Se propone realizar experimentos con proteínas quiméricas formadas a partir de inserciones que codifican las regiones para las asas expuestas de OmpA de *S. gallinarum* (Fig. 12). Con dichas proteínas se realizarían trabajos como el reportado por Wang *et al.*,<sup>112</sup> en donde se construyó un plásmido con un gene quimérico formado por *ompA* de *Salmonella typhimurium* y una porción específica de rotavirus, la cual se expresa en la tercer asa expuesta de OmpA, posteriormente se transformó el plásmido en *E. coli* y se inoculó por vía oral en ratones, y la fusión de la proteína produjo anticuerpos neutralizantes contra rotavirus, tomando como base dicho trabajo se propone utilizar un método similar para construir proteínas quiméricas y probarlas como vacunas en pollos y posteriormente desafiarlos contra la bacteria y observar si es capaz de proteger contra la infección por *S. gallinarum*. Así mismo, implementar una metodología similar a la empleada por Puente *et al.*,<sup>72</sup> donde construyó un plásmido que lleva un gene quimérico, insertado en *ompC* de *S. typhi* y una región de ADN de rotavirus que codifica para un epítoto que induce anticuerpos neutralizante, posteriormente se transformó en *E. coli* HB101, y por medio de anticuerpos monoclonales marcados se determinó si las proteínas quiméricas fueron expuestas en la superficie de *E. coli*. Con una estrategia similar se puede comprobar si las asas que estamos postulando que son expuestas a la superficie de la bacteria, *in vivo* se comportan de la misma forma. Así mismo, se podría demostrar que los dos aminoácidos que proponemos que son diferentes y expuestos en *S. gallinarum* en las asas 1ª y 6ª se encuentran en la superficie de la bacteria. También se sugiere construir proteínas quiméricas, y realizar la estrategia anteriormente mencionada, pero utilizando anticuerpos monoclonales que vayan dirigidos contra la secuencia de aa de *S. typhimurium*, para observar si existen diferencias antigénicas entre especies del género *Samonella*.

Como ya se ha mencionado, Huerta *et al.*<sup>30</sup> comprobaron que OmpA de *S. gallinarum* es una proteína altamente inmunogénica y específica ya que diferenciaba a grupos de aves vacunadas, infectadas, preinmunes y sanas. Conociendo las regiones conservadas y

específicas de OmpA de *S. gallinarum* se pueden diseñar pruebas de diagnóstico como PCR.

Las vacunas de ADN son capaces de producir una respuesta inmune específica humoral y celular mediante células CD4+ y CD8+, que reconocen los antígenos de mayores de histocompatibilidad II y I respectivamente, generan una fuerte respuesta de anticuerpos específicos, que son duraderos ya que inducen a células de memoria.<sup>24</sup> Con base en esto, se sugiere diseñar vacunas de las regiones de péptidos más inmunoractivas, o de ADN con el gen completo, y utilizarlas para proteger contra TA.

Es posible utilizar como estrategia la construcción de un plásmido que contenga un sitio de origen de replicación, la secuencia de OmpA, un gene de resistencia a antibiótico, un promotor fuerte y poliadenilación. Esta construcción podría ser inoculada vía intramuscular o cutánea a aves SPF, que serían desafiadas y se analizaría su respuesta inmune contra *S. gallinarum* así como la duración de la protección.

## CONCLUSIONES

1. La expresión de OmpA de *S. gallinarum* en geles de poliacrilamida-SDS es inhibida en presencia de Complemento del suero de aves SPF.
2. La secuencia amino terminal de OmpA de *S. gallinarum* fue 100 % idéntica a la secuencia amino terminal de OmpA de 33 kDa de *S. typhimurium*.
3. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de OmpA de *S. gallinarum* resultaron idénticas a OmpA de *S. typhimurium* en un 96 y 95% respectivamente.

## APENDICE DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Caldo nutritivo "A"

Caldo nutritivo. Merk	7.0 g
Extracto de levadura. Bioxon	1.0 g
Glicerol. Sigma	2.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . JT Baker	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . JT Baker	1.3 g

Se aforó a 1000 ml con agua destilada y se almacenó a temperatura ambiente.

#### Agar nutritivo "A"

Caldo nutritivo. Merk	7.0 g
Extracto de levadura. Bioxon	1.0 g
Glicerol. Sigma	2.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . JT Baker	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . JT Baker	1.3 g
Agar. Merk	1.5 %

Se aforó a 1000 ml con agua destilada y se almacenó a 4°C.

#### PBS

NaCl. Merk	8.0 g
KCl. JT Baker	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . JT Baker	1.44 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . JT Baker	0.24 g

Se ajustó el pH a 7.4, se aforó a 1000 ml con agua destilada y se almacenó a temperatura ambiente.

### SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE PME

#### Solución amortiguadora de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM pH 7.2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M pH 7.2. Merk	1 ml
--	------

Se aforó a 100 ml con agua desionizada y utilizó el mismo día.

#### Solución amortiguadora de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM pH 7.2 con 2% de Tritón

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M pH 7.2. Merk	0.5 ml
Tritón X-100 2%. Boehringer Mannheim	1 ml

Se aforó a 100 ml con agua desionizada y almacenó a 4 °C.

#### Solución para purificar PME

EDTA 5mM. Gibco BRL	
Tritón X-100 2%. Boehringer Mannheim	

Se diluyeron en solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM pH 7.2 y utilizó el mismo día.

## SOLUCIONES PARA GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA-SDS

### 1.5 M tris-HCL pH 8.8

Tris base. Gibco BRL	18.17 gr
Agua destilada	50 ml

Se ajustó el pH a 8.8 con HCl, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a 4°C

### 0.5 M tris-HCL pH 6.8

Tris base. Gibco BRL	6.0 g/ml
Agua destilada	50 ml

Se ajustó el pH a 8.8 con HCl, se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a 4°C

### Acrilamida

Acrilamida. Gibco BRL	30 g
Bisacrilamida. Gibco BRL	0.8 g

Se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó en frasco ámbar a 4°C

### Persulfato de Amonio al 10% (PSA)

Persulfato de amonio. Gibco BRL	100 mg
Agua desionizada.	1 ml

Se utilizó al momento

### Amortiguador de muestra

0.5 M tris-HCl. Gibco BRL	1.0 ml
Glicerol. Sigma	0.8 ml
SDS al 10%. Sigma	1.6 ml
2-mercaptoetanol. Sigma	0.4 ml
0.05% azul de bromofenol. Aldrich	0.4 ml
Agua desionizada	3.8 ml

Se almacenó en recipiente ámbar a 4°C

### Amortiguador de corrida

Tris base. Gibco BRL	25 mM
Glicerol. Sigma	192 mM
SDS. Sigma	0.1%

Se almacenó a temperatura ambiente

### Preparación del gel separador al 12%

Volumen	10 ml
Agua desionizada	3.35 ml
30% de Acrilamida.	4.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
10% SDS.	100 µl
10% PSA. Gibco BRL	50 µl
TEMED. Gibco BRL	5 µl

### Preparación del gel concentrador al 12%

Volumen	10 ml
Agua desionizada	6.1 ml
30% de Acrilamida	1.3 ml
1.5 M Tris (pH 6.8)	2.5 ml
10% SDS	100 $\mu$ l
10% PSA. Gibco BRL	50 $\mu$ l
TEMED. Gibco BRL	10 $\mu$ l

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

#### Ácido tricloroacético al 5%

Ácido tricloroacético.Merk	0.81 g
Agua desionizada	100 ml

Se filtró y almacenó en un frasco ámbar a 4°C

#### BSA

BSA. Gibco BRL	1mg/ml de agua desionizada
----------------	----------------------------

Se filtra en 0.45  $\mu$ c y se congela a -70°C

#### Reactivo de Bradford

Azul de Coomassie G250. Fluka	0.025 g
Etanol. Merk	12.5 ml
Ácido fosfórico. Produc. Quím. Monterrey SA	25.0 ml

Se aforó a 250 ml se filtró con papel filtro y posteriormente con filtro de 0.22  $\mu$ c y se almacenó en frasco ambar a 4°C.

### TINCIONES

#### Tinción de Coomassie

Etanol al 50%. Merk  
Ácido acético al 10%. Merk  
Azul brillante de Coomassie al 0.05%. Gibco BRL

#### Solución desteñidora para tinción de Coomassie

Etanol 40 %. Merk  
Ácido acético 10%. Merk  
Agua destilada 60 %

#### Tinción de plata

La tinción de plata se realizó, utilizando el protocolo del sistema *Gelcode color silver stain*, Pierce; modificando el revelado, en donde se utilizó una solución reveladora compuesta de 55  $\mu$ l de formaldehído al 37% y 2.5% de carbonato de sodio. El revelado se detuvo adicionando 5 ml de ácido cítrico al 2.3 M, en agitación durante 10 min.

**Solución fijadora**

Etanol 50%. Merk

Ácido acético 5%. Merk

Se aforó a 1000 ml y almacenó a temperatura ambiente

**Solución de plata**

Solución de plata. Pierce 10 ml

Agua desionizada 140 ml

Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente

**Solución reveladora de plata**

Formaldehído 37%. Sigma 55  $\mu$ l

Carbonato de sodio 2.5%. JT Baker 2.5 g

Se aforó a 100 ml de agua desionizada y almacenó a temperatura ambiente

**Solución de paro de la revelación**

Acido cítrico. JT Baker 96.6 gr

Se aforó a 200 ml de agua destilada y almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Solución conservadora de plata**

Carbonato de sodio 0.03%. JT Baker

Glicerol 3%. Gibco BRL

Se aforó a 100 ml de agua desionizada y almacenó a temperatura ambiente

**SOLUCIONES PARA TRANSFERENCIA****Amortiguador de Towbin**

SDS. Sigma 0.037%

Tris base. Gibco BRL 25 mM

Glicina. Sigma 192 M

Metanol. Merk 20%

Se ajustó el pH 8.1-8.5 y se almacenó a 4 °C.

**Tinción de Coomassie sin ácido acético**

Etanol al 50%. Merk

Azul brillante de Coomassie al 0.05%. Gibco BRL

**Solución desteñidora para tinción de Coomassie sin ácido acético**

Agua destilada 60 %

Etanol 40 %. Merk

## SOLUCIONES PARA GELES DE DOBLE DIMENSIÓN

### Solución de acrilamida para primera dimensión

Acrilamida. Gibco BRL	28.38 g
Bisacrilamida. Gibco BRL	1.62 g

Se aforó a 100 ml se filtró en 0.45  $\mu$ c y se almacenó en frasco ámbar a 4°C

### Amortiguador de muestra para primera dimensión

Urea 9.5 M. Life Technologies Inc.	5.7 g
Tritón X-100 2%. Boehringer Mannheim	2.0 ml
$\beta$ -mercaptoetanol 5% . Sigma	0.5 ml
Bio-lyte 5/7 1.6%. Bio-Rad	400 $\mu$ l
Bio-lyte 3/10 0.4%. Bio-Rad	100 $\mu$ l

Se aforó a 10 ml con agua desionizada, se alicuotó y se guardó a -70°C

### Amortiguador de cubrimiento para primera dimensión

Urea 9 M. Life Technologies Inc	5.41 g
Bio-lyte 5/7 0.8%. Bio-Rad	200 $\mu$ l
Bio-lyte 3/10 0.2%. Bio-Rad	50 $\mu$ l
Azul de Bromofenol. Aldrich	500 $\mu$ l de solución al 0.05%

Se aforó a 10 ml de agua desionizada, se alicuotó y se guardó a -70°C

### Solución monomérica para geles de una dimensión

Urea 9.2 M: LIFE Technology Inc	5.5 g
Tritón X-100 20%. Boehringer Mannheim	2.0 ml
Bio-lyte 5/7 1.6%. Bio-Rad	400 $\mu$ l
Bio-lyte 3/10 0.4%. Bio-Rad.	100 $\mu$ l
Persulfato de amonio 0.01%. Gibco BRL	10 $\mu$ l
TEMED 0.01%. Gibco BRL	1.33 ml
Agua destilada	1.97 ml

### Amortiguador de cámara superior

NaOH 100 mM. JT Baker	0.2 g
-----------------------	-------

Se aforó a 250 ml con agua desionizada y se agitó por 30 min

### Amortiguador de cámara inferior

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . JT Baker	1.36 ml
---	---------

Se aforó a 2000 ml de agua desionizada y se agitó por 30 min

## SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN

### EDTA

Etilenediaminetra-acetato disódico. 2H <sub>2</sub> O 0.5 M. Gibco BRL	18.61 g
---	---------

Se aforó a 100 ml con agua desionizada, se ajustó al pH a 7.4 con lentejas de NaOH, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente

**Tris**

Tris base 1M. Gibco BRL 12.11 g

Se aforó a 100 ml con agua desionizada se ajustó el pH a 7.4–7.2, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente

**CTAB/NaCl**

CTAB 10%. Sigma 10 g

NaCl 0.7 M. Merk 4.1 g

Se aforó a 100 ml con agua desionizada. Y se colocó la solución en baño maría para que se homogenizara, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

**SOLUCIONES PARA PCR****AMORTIGUADOR DE PCR 5X. Biotecnologías Universitarias**

KCl. 250mM

Tris-HCl pH 8.3. 50 mM

MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM

Gelatina 0.5%

## BIBLIOGRAFIA

1. Ariza RR, Li Z Ringstad N, Demple B. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. J Bacteriol 1995; 177: 1655-1661.
2. Barth M, Marschall C, Muffler A, Fischer, Hengge-Aronis R. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of  $\sigma^S$  and many  $\sigma^S$ -dependent genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1995; 177:2455-2464.
3. Blasband AJ, Marcott W, Schnaitman CA. Structure of the *lc* and *nmpC* outer membrane porin protein genes of lambdoid bacteriophages. J Biol Chem 1986; 261: 12723-12732.
4. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
5. Brennan FR, Jones TD, Gilleland LB, Bellaby T, Xu F, North PC, Thompson A, Staczek J, Lin T, Johnson JE Hamilton WWDO, Gilleland Jr HE. *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. Microbiol 1999; 145: 211-220.
6. Bumstead N, Barrow P. Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. Avian Dis 1993; 37:189-193.
7. Calderón I, Lobos SR, Rojas HA, Palomino C, Rodríguez LH, Mora GC. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid in humans. Infect Immun 1986; 52:209-212.
8. Calnek BW. Diseases of poultry. Iowa State University Press. Ames Iowa; USA 1997.

9. Contreras I, Muñoz L, Soto CS, Mora GC. Heterologous expression of *Escherichia coli* porin genes in *Salmonella typhi* Ty2: regulation by medium osmolarity, temperature and oxygen availability. FEMS Microbiol Letters 1995; 133: 105-111.
10. Datta DB, Arden B, Henning U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer envelope membrane as bacteriophage receptor. J Bacteriol 1977; 131: 821-829.
11. Delihis N. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNA. Mol Microbiol 1995; 15:411-414.
12. Dimple B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. Annu Rev Genet 1991. 25: 315-337.
13. Diario Oficial. Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO 1993. Campaña Nacional Contra la Salmonelosis Aviar. 1° de Septiembre 1994; SARH, México.
14. Edman P, Begg G. A protein sequenator. Eur J Biochem 1967; 1: 80-91.
15. Fernández-Mora M, Oropeza F, Puente JL, Calva E. Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. Gene 1995; 158:67-72.
16. Ferrario M, Ernsting BR, Borst DW, Wiese II DE, Blumenthal RM and Matthews RG. The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. J. Bacteriol 1995; 177: 103-113.
17. Forst S, Inouye M. Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. Annu Rev Cell Biol 1988; 4: 21-42.

18. Fruedl R, Cole ST. Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. Eur J Biochem 1983; 134: 497-502.
19. Galdiero F, Tufano MA, Galdiero M, Masiello S, Di Rosa M. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. Infect Immun 1990; 58:3283-3286.
20. Galdiero M, De Martino L, Marcatili A, Nuzzo i, Vitiello M, Cipollaro de L'ero G. Th1 ad Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella typhimurium* porins . Immun 1998; 94:5-13.
21. Gotschlich EC, Seiff ME, Blaker MS, Koomey. Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: cloning and gene structure. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 8135-8139.
22. Graeme-Cook KA, May G, Bremer E, Higgins CF. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. Mol Microbiol 1989; 3: 1287-1294.
23. Gross R, Arico B, Rappuoli R. Families of bacterial signal-transducing proteins. Mol Microbiol 1989; 3:1661-1667.
24. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA Vaccines: Immunology, aplication, and optimization. Annu Rev Immunol 2000; 18:927-974.
25. Hancock REW, Poole K, Benz R. Outer membrane protein P of *Pseudomona aeruginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. J Bacteriol 1982; 150: 730-738.
26. Hellman J, Loiselle PM, Tehan M, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, Andrews DM, Kim KS, Warren HS. Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherichia coli* bacteria into serum. Infec Immun 2000; 5: 2566-2572.

27. Holt PS, Chaubal LH. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. J Clin Microbiol 1997; 4: 1016-1020.
28. Huang L, Tsui P, Freundlich. Integration host factor is a negative effector of in vivo and in vitro expression of *ompC* in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1990; 9:5293-5298.
29. Huang L, Tsui P, Freundlich M. Positive and negative control of *ompB* transcription in *Escherichia coli* by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol 1992; 174: 664-670.
30. Huerta L, López-Vidal Y, Suárez F, Willms K, Verdugo-Rodríguez A. Detección de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* útiles para el diagnóstico. Memorias de XXI Congreso Internacional de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica., III Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia; 1996 62; Guadalajara (Jal) México.
31. Inouye M, Show J, Shen C. The assembly of structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. Biol Chem 1972, 247: 8154-8159.
32. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, González C Moreno J, Kumate. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *S. typhi* 9,12,d, Vi. Infect Immun 1988; 56:2953-2959.
33. Jain K, Martin RG, Rosner JL, Fujita N, Ishihama A, Wolf RE. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. J Bacteriol 1995 ; 177: 7100-7104.

34. Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F. The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol Microbiol* 1991; 9: 2153-2164.
35. Jim T, Inouye M. Identification of the genes in multicopy plasmids affecting *ompC* and *ompF* expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters* 1995; 133: 225-231.
36. Jones BD, Nichols WA, Gibson BW, Sunshine MG, Apicella MA. Study of the role of the *htrB* gene in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* 1997; 11: 4778-4783.
37. Kim CJ, Nagaraja KV, Pomeroy BS . Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Am. J Vet Res* 1991; 52:1069-1074.
38. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
39. Lange R, Hengge-Aronis R. The cellular concentration of the  $\sigma^5$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* 1994; 6: 2646-2654.
40. Lazo García E, Suárez Güemes F, Verdugo-Rodríguez. Determinación de motilidad en *Salmonella gallinarum*. XXIV Congreso anual de la asociación Mexicana de Infectología y Microbiolog Clínica. VI Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia. 30 junio 1999 Morelia Mich México.
41. Li Z, Demple B. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994; 269: 18371-18377.

42. Liu X, Ferenci T. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1998; 180:3917-3922.
43. Maier C, Bremer E, Schmid A, Benz R. Pore-forming activity of the Tsx protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Demonstration of a nucleoside-specific binding site. J Biol Chem 1988; 263: 2493-2499.
44. Manning PA, Pugsley AP, Reeves P. Detective growth functions in mutants of *Escherichia coli* K12 lacking a major outer membrane protein. J Mol Biol 1977; 116: 285-300.
45. Martínez-Flores I. Papel del operon ompB en la expresión de OmpC de *Salmonella typhi* (tesis de doctorado). Cuernavaca (Morelos) México: Instituto de Biotecnología. Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado. UNAM, 1999.
46. Martínez-Flores I, Cano R, Bustamante VH, Calva E, Puente JL. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol 1999<sup>a</sup>; 181:556-562.
47. Matsuyama SI, Inokuchi K, Mizushima S. Promoter exchange between OmpF and OmpC, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12. J Bacteriol 1984; 158:1041-1047.
48. Misra T, Benson. A novel mutation, cog, which results in production of a new porin protein (OmpG) of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 1989; 171:4105-4111.
49. Mizuno T, Kageyama M. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J Biochem Tokio 1978; 84:179-191.

50. Mosqueda TA. Análisis y perspectivas de la patología aviar en México. VII Ciclo Internacional de Conferencias sobre Avicultura. Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas e Instituto Nacional en Ciencias Avícolas 1984; 7-20.
51. Nakae T. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: reconstitution of sucrose-permeable membrane vesicles. *Biochem Biophys* 1975; 64:1224-1230
52. Nakae T. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J Biol Chem* 1976; 251: 2176-2178.
53. Nakae T. Outer-membrane permeability in bacteria. *CRC Crit Rev Microbiol* 1986; 13: 1-62.
54. Nakamura K, Mizushima S. Effects of heating in dodecyl sulfate solution on the conformation and electrophoretic mobility of isolated major outer membrane proteins from *Escherichia coli* K-12. *J Biochem* 1976; 80:1411-1422.
55. Ni Bhriain N, Dorman CJ and Higgins CF. An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol Microbiol* 1989; 3: 933-942.
56. Nikaido H. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochem Biophys Acta* 1977; 433:118-132.
57. Nikaido H and Nakae T. The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Adv Micro Physiol* 1979; 20:163-250.
58. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985; 49:1-32.

59. Nikaido H. Outer membrane. In: Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M and Umbarger E, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Washington, D C: American Society for Microbiology Press, 1996: 29-44.
60. O'Farrell PZ. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975; 10: 4007-4021.
61. Osborn MJ, Gander JE, Parisi E, Carson J. Mechanism and assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J Biol Chem 1972; 247:3962-3972.
62. Paakkanen J, Gotslich EC, Mäkelä PH. Protein K: a new major outer membrane protein found in encapsulated *Escherichia coli*. J Bacteriol 1979; 139: 835-841.
63. Palva ET. Major outer membrane protein in *Salmonella typhimurium* induced by maltosa. J Bacteriol 1978, 136: 286-294.
64. Panigrahi P, Losonsky G, DeTolla LJ, Morris JG Jr. Human immune response to *Campylobacter jejuni* proteins expressed in vivo. Infect Immun 1993; 61: 1167.
65. Pautsch A, Schulz. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. Nature Structural Biology 1998; 11: 1013-1017.
66. Peeters CCAM, Claassen IJTM, Schuller M, Kersten GFA, Voort Rvd, Poolman JT. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* in mice. Vacc 1999; 17: 2702-2712.
67. Pomeroy BS, Nageraja KV. Fowl typhoid in: Calnek BW, Rei, WM, Yoder Jr HW editors. Diseases of poultry. Iowa State University Press, Ames, 1991:87-98.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

68. Poole K, Hancock REW. Phosphate-starvation-induced outer membrane proteins of members of the families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*: demonstration of immunological cross-reactivity with an antiserum specific for porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1986; 165: 987-993.
69. Postle K. TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembr*, 1993; 25:591-601.
70. Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy J. MicroReview. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1996; 20: 911-917.
71. Puente JL, Verdugo-Rodríguez A, Calva E. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Molec. Microbiol* 1991; 5: 1205-1210.
72. Puente JL, Juárez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 1995; 156:1-9.
73. Quintana JA y Mosqueda T.A. (1987): prevención control y erradicación de la tifoidea aviar. Asociación Americana de la Soya. ASA/México A.N. No. 70.
74. Ram S, Mackinnon FG, Gulati S, McQuillen DP, Vogel U, Frosch M, Elkins C, Guttormsen HK, Wetzler LM, Oppermann M, Pangburn MK, Rice PA. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol* 1999; 36:915-928.
75. Ramírez JH 1987. Repercusiones económicas de la tifoidea aviar en reproductoras pesadas COMISIÓN PERMANENTE PARA EL CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA PULOROSIS Y TIFOIDEA AVIAR. Monterrey, N.L. México. 13-21.

76. Rosner JL, Chain T, Foulds J. Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1991; 173: 5631-5638.
77. Saint N, De E Julien S, Orange N, Molle G. Ionophore properties of OmpA of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Acta 1993; 1145: 119-123.
78. Salyers A, Whitt D. *Salmonella* Infections. In: Salyers A, Whitt D editors. Bacterial pathogenesis a molecular approach. Washington, D C: American Society for Microbiology Press, 1994: 229-239.
79. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Laboratory, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
80. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-5467.
81. Scheindler H, Rosenbusch JP. Matrix protein in planar membrane: clusters of channels in a native environment and their functional reassembly. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:2302-2306.
82. Schnaitman CA. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. I. Effect of preparation conditions on the migration of protein in polyacrylamide gels. Arch Biochem Biophys 1973; 157: 541-552.
83. Schulein K, Benz R. LamB (maltoporin) of *Salmonella typhimurium*: isolation, purification and comparison of sugar binding with LamB of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1990; 4: 625-632.
84. Schulein K, Schmid A, Benz R. The sugar-specific outer membrane channel ScrY contains functional characteristics of general diffusion pores and substrate-specific porins. Mol Microbiol 1991; 5: 2233-2241.

85. Schulz GE. Bacterial porins: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:702-707.
86. Schweizer M, Henning U. Action of a major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1977; 129: 1651-1652.
87. Schweizer M, Hindennach I, Garten W, Henning U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. Interaction of protein II\* with lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 1978; 82: 211-217.
88. Sethi S, Hill SL, Murphy TF. Serum Antibodies to outer membrane proteins (OMPs) of *Moraxella catarrhalis* in patients with bronchiectasis: identification of OMP B1 as an important antigen. *Infect Immun* 1995; 63 1516-1520.
89. Simpson DS, Ho Y, Rice PA, Wetzler LM. T lymphocyte response to *Neisseria gonorrhoeae* porin in individuals with mucosal gonococcal infection. *J Infect Dis* 1999; 180:762-773.
90. Slauch JM, Silhavy. *cis*-acting *ompF* mutations that result in OmpR-dependent constitutive expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1991; 173: 4039-4048.
91. Stathopoulos C. An alternative topological model for *Escherichia coli* OmpA. *Protein Science* 1996, 5: 170-173.
92. Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U. The envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 1978; 136: 280-285.
93. Stinavage P, Martin LE, Spitznagel. O antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to non-oxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 1989; 57: 3894-3900.

94. Stites D, Stobo J, Fuderberg H, Well V. Complemento. En :Inmunología Básica y Clínica. De El Manual Moderno. México. 1985 16-142.
95. Strauch KL, Beckwirth J. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. Proc Natl Acad Sco USA 1988; 185:1576-1580.
96. Sugawara E, Nikaido H. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem 1992; 4: 2507-2511.
97. Sugawara E, Nikaido H. OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms. J Biol Chem 1994; 27: 17981-17987.
98. Sugimura K, Nishihara. Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. J Bacteriol 1988; 170:5625-5632.
99. Terakado N, Ushijima T, Samejima T, Ito H, Hamaoka T, Murayama S, Kawahara K and Danbara H. Transposon insertion mutagenesis of a genetic region encoding serum resistance in an 80 plasmid of *Salmonella dublin*. J Gen Microbiol 1990; 136: 1833-1838.
100. Todt JC, Rocque WJ, Megroarty EJ. Effects of fgpH on bacterial porin funcion. Biochem 1992; 31: 10471-10478.
101. Tomas JM, Ciurana B, Benedi VJ, Juarez A. Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to non-immune serum. J Gen Microbiol 1988; 134: 1009-1016.
102. Tufano MA, Ianniello R, Galdiero M, De martino L, Galdiero F. Effect of *Salmonella typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. Microb Pathog 1989; 7: 337-346.

103. Udhayakumar V, Muthukkarupan. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infec. Immun* 1987; 55: 816-821.
104. UNA., (1999). Compendio de indicadores económicos del sector avícola. Unión Nacional de Avicultores. México, D.F. pp: 8-20.
105. Van Alphen L, Havekes L, Lugtenberg B. Major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. Purification and in vitro activity of bacteriophage K3 and f-pilus mediated conjugation. *FEBS Lett* 1977; 75: 285-290.
106. Vázquez NJ, Suárez GF, Huerta AL, Quintana LJA, Puente JL, Calva E, Verdugo-Rodríguez, A. *Salmonella gallinarum* outer membrane protein preparations in the diagnosis of fowl typhoid. 74<sup>th</sup> Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, Ill., USA. 1993: 63.
107. Verdugo-Rodríguez A, Calva E Denaturing treatment of *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations for improved immunodiagnosis of typhoid fever. *Asia Pac J Mol Biol Biochem* 1993; 1: 113-116.
108. Verdugo-Rodríguez A, Lay-Ham SD, Koh CL Puthucheary SD, Calva E, Pang T. Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparation in typhoid fever patients. *Asia Pac J Allergy Immun* 1993<sup>a</sup>; 11: 45-32.
109. Verdugo-Rodríguez A, López-Vidal Y, Puente JL, Ruiz-Palacios GM, Calva E. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis* 1993<sup>b</sup>; 4: 248-254.

110. Vytvytska O, Jakobsen JS, Balcunaite G, Andersen JS, Baccarini M. Host factor I, binds to *Escherichia coli ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. Proc Natl Acad Sci USA 1998. 95: 14118-14123.
111. Wandersman C, Delepelaire P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4776-4780
112. Wang L, Huang J, Nagesha HS, Smit SC, Phelps A, Holmes I, Martyn JC, Coloe PJ, Reeves PR. Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7 induces a neutralizing immune response in mice. Vaccine 1999; 17: 2636-2645.
113. Webster RE. The tol genes and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1990; 5: 1005-1011.
114. Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. Infect Immun 1991; 7: 2252-2258.
115. Weiss MS, Wacker T, Weckesser J, Welte W, Schulz GE. The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3 Å resolution. FEBS Lett 1990; 267: 268-272.
116. White DA, Lennarz WJ, Schnaitman CA. Distribution of lipids in the wall and cytoplasmic membrane subfractions of the cell envelope of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1972; 109: 686.
117. Yamada H, Mizushima S. Interaction between major outer membrane protein (O-8) and lipopolysaccharide in *Escherichia coli* K12. Eur J Biochem 1980; 103:209-218