



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

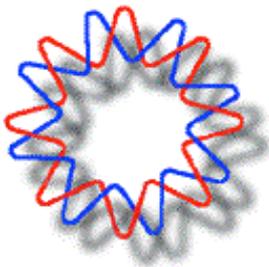
---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**PURIFICACIÓN DE LA PORINA OmpS1 DE  
*Salmonella enterica* SEROVAR  
TYPHIMURIUM: IMPLICACIONES EN LA  
REGULACIÓN Y EN ESTUDIOS DE  
INMUNIDAD PROTECTIVA**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS  
PRESENTA:  
BIOL. MARÍA DEL CARMEN GUADARRAMA ROMÁN**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. EDMUNDO CALVA MERCADO**



**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos, México. Laboratorio de los doctores Edmundo Calva Mercado y José Luis Puente. Bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado.

En el comité tutorial participaron:

Dr. Ernesto Méndez Salinas

Dr. Fernando Ezquivel Guadarrama

El jurado de Tesis estuvo integrado por:

Dr. Yvonne Rosenstein Azoulay

Dr. Juan Miranda Ríos

Dr. Constantino López Macías

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I.1</b> <i>Salmonella</i> .....	1
<b>I.2</b> Epidemiología .....	1
<b>I.3</b> Patogenia .....	2
<b>I.4</b> Desarrollo de una infección sistémica letal .....	4
<b>I.5</b> Desarrollo de una infección subletal .....	4
<b>I.6</b> Membranas de las bacterias Gram-negativas .....	7
<b>I.7</b> Proteínas de la Membrana Externa (PME) .....	8
<b>I.8</b> Función de las porinas y la regulación de su expresión .....	12
<b>I.9</b> Las porinas y su función en la virulencia .....	15
<b>I.10</b> Importancia de las porinas de <i>S. Typhimurium</i> como antígenos protectores .....	15
<b>I.11</b> Importancia de las porinas de <i>S. Typhi</i> como antígenos protectores .....	17
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	19
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>V. METODOLOGÍA</b> .....	21
<b>V.1</b> Cepas y condiciones de cultivo .....	21
<b>V.2</b> Preparación de células electrocompetentes .....	21
<b>V.3</b> Clonación de los genes <i>ompS1</i> y <i>ompS2</i> en el vector <i>pTrc99A</i> .....	21

V.4 Transformación de las cepas bacterianas .....	22
V.5 Obtención de plásmidos de las clonas candidatas .....	22
V.6 Expresión y purificación de las porinas en <i>S. Typhimurium</i> .....	23
V.7 Generación de mutantes por el método de Datsenko-Wanner .....	23
V.8 Purificación de las proteínas de membrana externa por el método de Schnaitman modificado .....	24
V.9 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS- PAGE) .....	24
V.10 Purificación de porinas por el método de Nikaido .....	24
V.11 Separación de las porinas por cromatografía de exclusión molecular .....	25
V.12 Cuantificación de concentración de porinas .....	26
V.13 Ensayo de la capacidad protectora de OmpS1 .....	26
V.14 Determinación de viabilidad (cuentas viables) .....	27
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	30
<b>VI.1</b> La expresión de la porina OmpS1 de <i>S. Typhimurium</i> es inducida por el regulador LeuO .....	30
<b>VI.2</b> Proteínas de la membrana externa de <i>S. Typhimurium</i> : Caracterización de mutantes .....	32
<b>VI.3</b> Expresión de OmpS1 y OmpS2 de <i>S. Typhimurium</i> en <i>E. coli</i> .....	35
<b>VI.4</b> Expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 en <i>S. Typhimurium</i> .....	37
<b>VI.5</b> Purificación de OmpS1 y OmpC por el método de Nikaido .....	39
<b>VI.6</b> Purificación de OmpS1 y OmpC por Cromatografía de Exclusión Molecular .....	41
<b>VI.7</b> Evaluación de capacidad protectora inducida por la porina OmpS1 .....	49
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	54
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>IX. PERSPECTIVAS</b> .....	62
<b>X. APÉNDICE</b> .....	63
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	65

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de la organización de la membrana de las bacterias Gram- negativas .....	8
<b>Figura 2.</b> Representación de la estructura de las porinas OmpF y OmpC de <i>E. coli</i> .....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura de LamB, definida por cristalografía de rayos X .....	11
<b>Figura 4.</b> Esquema de las regiones de regulación de los genes <i>ompS1</i> y <i>ompS2</i> de <i>S. Typhi</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Expresión de la porina OmpS1 en presencia de LeuO .....	32
<b>Figura 6.</b> Expresión de las porinas de la cepa 14028 y las mutantes derivadas STMR, STMRD, STMFD, en baja y alta osmolaridad .....	34
<b>Figura 7.</b> Expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 de <i>S. Typhimurium</i> en la cepa TOP-10 de <i>E. coli</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Expresión de la porina OmpS1 en la cepa STMRD de <i>S. Typhimurium</i> .....	38
<b>Figura 9.</b> Purificación de porinas Omps1 y OmpC por el método de Nikaido .....	41
<b>Figura 10.</b> Gráfica obtenida de la purificación de OmpS1 por Cromatografía de exclusión molecular.....	42
<b>Figura 11.</b> Análisis de la porina OmpS1 obtenida por cromatografía de exclusión molecular.....	44
<b>Figura 12.</b> Gráfica obtenida de la purificación de OmpC por cromatografía de exclusión molecular.....	45
<b>Figura 13.</b> Análisis de la porina OmpC obtenida por cromatografía de exclusión molecular .....	47
<b>Figura 14.</b> Capacidad protectora inducida por las porinas OmpS1 y OmpC de <i>S. Typhimurium</i> .....	53

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas usadas en este trabajo .....	28
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos usados en este trabajo .....	28
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos usados en este trabajo .....	29
<b>Tabla 4.</b> Esquema de inmunización y reto .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>CDC</b>	Centro para el Control de Enfermedades y Prevención (CDC, Atlanta, GA)
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal media
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diaminotetra acético (por sus siglas en inglés)
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (por sus siglas en inglés)
<b>F.T.</b>	Fiebre Tifoidea
<b>FL</b>	Fosfolípidos
<b>H-NS</b>	Proteína tipo histona del nucleoide (por sus siglas en inglés)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón-gama
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ip</b>	Intraperitoneal
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-Thiogalactopiranosido
<b>iv</b>	Intravenosa
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>KV</b>	Kilovoltios
<b>LB</b>	Medio de cultivo tipo Luria Bertani (por sus siglas en inglés)
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>mA</b>	Miliamperes
<b>MBL</b>	Lectina de unión a maltosa (por sus siglas en inglés)
<b>ME</b>	Membrana externa
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>MI</b>	Membrana interna
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar

<b>MN</b>	Medio de cultivo nutritivo
<b>MNN</b>	Medio de cultivo nutritivo de alta osmolaridad
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NK</b>	Células asesinas naturales (por sus siglas en inglés)
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Regulador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
<b>PD</b>	Peptidoglicano
<b>pg</b>	Picogramos
<b>PME</b>	Proteínas de membrana externa
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
<b>SPI-1</b>	Isla de Patogenicidad-1 (por sus siglas en inglés)
<b>SRE</b>	Sistema retículo endotelial
<b>subsp</b>	Subespecie
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral-alpha
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>Vi</b>	Antígeno capsular Vi (Virulencia)

## RESUMEN

*Salmonella* es el agente causal de dos cuadros clínicos importantes en los humanos: *S. enterica* serovar Typhi causa fiebre tifoidea (FT), mientras que *S. enterica* serovar Typhimurium causa gastroenteritis. Sin embargo, en ratones, *S. Typhimurium* puede causar una infección parecida a la que causa *S. Typhi* en humanos. Por tal motivo, el modelo de infección en ratón es muy usado en el estudio de la FT. Las porinas presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas están expuestas al medio exterior y se ha demostrado que pueden ser reconocidas por el sistema inmune del hospedero. En *S. Typhi*, se ha descrito la presencia de dos porinas de baja expresión, OmpS1 y OmpS2 (quiescentes). En este trabajo se describe la inducción de la expresión de la porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. Typhimurium*, así como su purificación para realizar estudios de inmunidad protectora. Se encontró que la expresión de la porina OmpS1 de *S. Typhimurium* se induce en presencia del regulador LeuO, a diferencia de lo reportado para *S. Typhi*, donde es OmpS2 la que se induce en presencia de este regulador. Además, la porina OmpS2 no se logró expresar de manera abundante a partir del plásmido pCGS2C1, en ninguna de las condiciones probadas. Por otra parte, la porina OmpS1 se logró expresar de manera abundante a partir del plásmido pCGS1C1, en la cepa STM RD ( $\Delta ompR, ompD$ ) y la porina OmpC se obtuvo a partir de la cepa STM FD ( $\Delta ompF, ompD$ ). También, se logró la purificación de OmpS1 y OmpC por el método de Nikaido, y posteriormente por cromatografía de exclusión molecular. Con las porinas obtenidas se realizó un experimento en el cual se evaluó la capacidad de éstas para conferir protección contra el reto de una cepa virulenta. Los resultados, aunque no pueden ser concluyentes, demuestran que la porina OmpS1 confirió solo el 80 % de protección al reto con 1 DL<sub>50</sub>. Por otra parte, OmpC (control), confirió un 60% de protección al reto de 1 y 10 DL<sub>50</sub> de la cepa 14028, datos muy similares a los reportados para una preparación que contiene a las porinas OmpC, OmpF y OmpD de *S. Typhimurium*. Para poder determinar la capacidad de la porina OmpS1 de conferir protección, se requiere continuar con los ensayos de inmunidad protectora. Para lo cual es necesario mejorar el protocolo de purificación de porinas de *S. Typhimurium*. Esto permitirá, asimismo, explorar en detalle la naturaleza de la respuesta inmune del ratón a cada una de estas porinas de manera individual.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 *Salmonella*

*Salmonella*, un bacilo Gram-negativo móvil, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es un patógeno importante de humanos y otros vertebrados. En humanos, la ingesta de la mayoría de los serovares de *Salmonella* causan infecciones del intestino delgado y gastroenteritis, y sólo un pequeño número de serovares de *Salmonella* pueden ocasionar una infección sistémica, como lo es la fiebre tifoidea (Mittucker y Kaufmann, 2000).

De acuerdo al Centro para el Control de Enfermedades y Prevención (CDC, Atlanta, GA), el género *Salmonella* tiene solamente dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La clasificación actual es la siguiente. *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies: I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; VI, *S. enterica* subsp. *indica*. Para indicar el serotipo o serovar el nombre se escribe después de la subespecie con la primer letra mayúscula. Por ejemplo: *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) (Benner *et al.*, 2000).

## I.2 Epidemiología

Se han identificado 2,463 serotipos del género *Salmonella*, la mayoría de ellos (59%) pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica*. Aproximadamente el 99% de las infecciones en humanos y otros animales son causadas por las cepas pertenecientes a este serotipo (Popoff y Le Minor, 1997).

*Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) es el agente causal de la Fiebre Tifoidea (FT) en humanos. Se estima una tasa mundial de 16 millones de casos de FT por año, de los cuales aproximadamente 600,000 son fatales (Pang *et al.*, 1998). La fiebre tifoidea es una enfermedad de prevalencia mundial; sin embargo, es poco frecuente en los Estados Unidos y en Europa. En estos lugares la FT se presenta ocasionalmente y los brotes se controlan muy rápido, usualmente la adquieren las personas que viajan a las áreas endémicas. En Latinoamérica, Asia y África se localizan

las zonas endémicas de FT, donde ésta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública (Edelman y Levine, 1986; Cryz *et al.*, 1989).

Se estima que se presentan 1.3 millones de casos de gastroenteritis causadas por otros serotipos, no Typhi; y junto con la FT, ambos cuadros clínicos ocasionan aproximadamente 3 millones de muertes anualmente (Pang *et al.*, 1998). La gastroenteritis en humanos es causada por varios serotipos, siendo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), la cepa aislada con mayor frecuencia (Mead *et al.*, 1999; Raffatellu *et al.*, 2006). *S. Typhimurium* es transmitida a los humanos por animales domésticos lo cual representa un serio problema de la industria alimentaria (Mastroeni, 2002).

*S. Typhi* no es virulenta para la mayoría de los animales en cambio *S. Typhimurium* en los ratones causa una infección sistémica letal parecida a la fiebre tifoidea, con síntomas similares a los observados en los humanos al infectarse con *S. Typhi*. Motivo por el cual el modelo de la infección en el ratón ha sido muy usado para el estudio de los mecanismos de patogenia así como de la respuesta inmune del hospedero contra la infección por *Salmonella* (Mittucker y Kaufmann, 2000).

El modelo experimental para el estudio de la fiebre tifoidea, consiste en la infección en ratones susceptibles (*nramp1*<sup>-/-</sup>) mediante la vía oral con *S. Typhimurium*. El gen *nramp1* codifica para proteína Nramp1, la cual interviene en el transporte de intermediarios del óxido nítrico y cationes divalentes (Mg<sup>++</sup>) hacia los fagolisosomas. El locus *lty* (*lsh* o *bcg*), se localiza en el cromosoma 1 y se ha descrito que los ratones que expresan el alelo *lty*<sup>r</sup> pueden sobrevivir a las primeras fases de la infección. Mientras que los ratones susceptibles *lty*<sup>s</sup> son incapaces de controlar la multiplicación temprana de *Salmonella* dentro de los macrófagos y mueren rápidamente (Benjamín *et al.*, 1990; Eckmann *et al.*, 1996).

### **I.3 Patogenia.**

*Salmonella* normalmente infecta a los humanos y a los animales por la vía oral, mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados. Después de la ingestión, una proporción de las bacterias resisten el pH bajo del estómago y a varios de los mecanismos de resistencia en el lumen intestinal, como lo son las sales biliares, la lisozima, las defensinas, e IgA neutralizantes (Calva *et al.*, 1988). Los mecanismos moleculares por los cuales *Salmonella* resiste al pH bajo y a las sales biliares no se

conocen; sin embargo, existe evidencia de que algunos de los genes involucrados en esta respuesta están controlados por el sistema de reguladores PhoP/PhoQ (Bearson *et al.*, 1997; van Valkinburgh y Gunn, 1999; Cotter y DiRita, 2000).

Una proporción de las salmonelas que han resistido al pH bajo del estómago llegan al intestino delgado, el primer sitio de colonización, donde se adhiere a las células epiteliales mediante varias fimbrias. Se han identificado en *Salmonella* al menos cinco fimbrias involucradas en la adherencia y colonización: Fim (fimbria tipo I), Agf (fimbria tipo curli), Lpf (fimbria polar larga), Pef (fimbria codificada en plásmido) y Sef (fimbria de *S. enterica* serotipo Enteritidis) (Baumler *et al.*, 1996 a, 1996 b, 1996 c; Cotter y DiRita, 2000). La invasión de las células epiteliales por *Salmonella* es el resultado de la activación de una gran variedad de respuestas en las células del hospedero, siendo la más importante la reorganización del citoesqueleto que lleva a la formación de proyecciones citoplasmáticas en la membrana, “ruffling”, que envuelven y permiten la internalización de la bacteria (Ohl y Miller, 2001; Cotter y DiRita, 2000). Este proceso es inducido por genes de virulencia presentes en *Salmonella* que codifican para proteínas efectoras tales como SopE, SipA, SipC y SptP, las cuales son translocadas por el sistema de secreción tipo III (TTSS) codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) (Hardt *et al.*, 1998; Fu y Galan, 1998; Zhou *et al.*, 1999). Después de que *Salmonella* penetra el epitelio intestinal, se dirige a las placas de Peyer, los cuales son órganos linfoides secundarios localizados en la mucosa intestinal. Uno de los mecanismos de entrada de *Salmonella* en las placas de Peyer es a través de las células M, las cuales son células epiteliales especializadas en la captura de antígenos del lumen intestinal hacia los folículos linfoides (Jones *et al.*, 1994). Una vez que *Salmonella* atraviesa el epitelio, se encuentra con los macrófagos residentes en la lámina propia, donde induce su internalización por macrofagocitosis. Subsecuentemente, *Salmonella* activa mecanismos de virulencia para evadir las funciones antimicrobianas del macrófago, lo que le permite sobrevivir y replicarse en el ambiente intracelular (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). La sobrevivencia de *Salmonella* dentro del macrófago involucra la activación del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. PhoQ es una proteína de membrana que actúa como sensor de señales ambientales y es capaz de fosforilarse; a su vez transfiere el fosfato a PhoP, que está en el citoplasma y funciona como regulador transcripcional. Las salmonelas que sobreviven son transportadas por los macrófagos de los ganglios mesentéricos al torrente sanguíneo. Una vez que el proceso de invasión se completa, la bacteria se encuentra de manera transitoria en la

sangre, donde está expuesta a los factores del complemento, a las proteínas de fase aguda, como lo es MBL (mannose-binding-lectin) (Mastroeni, 2002).

#### **I.4 Desarrollo de una infección sistémica letal.**

La letalidad de la infección sistémica ocasionada por *Salmonella* depende de la combinación de varios factores, como son: la virulencia de la cepa de *S. Typhimurium* (SL1344, 14028), la dosis de infección o un inóculo alto (arriba de la  $DL_{50} > 10^8$ ) en ratones resistentes (*nramp1<sup>+/+</sup>*), la vía de infección en condiciones experimentales y el estado inmunológico del hospedero (Mastroeni, 2002). En estos casos, para que el animal logre sobrevivir, la carga bacteriana no debe ser mayor de  $10^8$  ufc. Cuando la carga bacteriana alcanza índices mayores a  $10^8$ - $10^9$  ufc, en hígado y bazo, el animal es incapaz de contener la infección y como consecuencia se produce una bacteremia secundaria, choque endotóxico, falla orgánica múltiple y la muerte rápida del animal (Collins, 1974; Makela y Hormaeche, 1997). La toxicidad del LPS (lipopolisacárido) y la repuesta del hospedero por medio de la red de citocinas proinflamatorias, se encuentran entre los factores que contribuyen a los efectos letales de una gran carga bacteriana en una infección por *Salmonella* (Mastroeni, 2002).

#### **I.5 Desarrollo de una infección subletal**

Una infección no letal consiste en la capacidad del ratón en restringir, hasta cierto nivel, la carga bacteriana. Dependiendo de la cepa de ratón utilizada y de la cepa de *S. Typhimurium*, una infección subletal puede durar de una a varias semanas (Makela y Hormaeche 1997; Eisenstein, 1999).

El curso de una infección primaria subletal en el modelo de ratón involucra cuatro fases: 1) eliminación de la bacteria en sangre e inactivación temprana del reto; 2) crecimiento exponencial de la bacteria; 3) supresión del crecimiento de la bacteria (fase de meseta); 4) eliminación de la bacteria en los órganos (Mastroeni, 2002). Las diferentes fases de la infección por *S. Typhimurium* constan de una gran variedad de mecanismos de inmunidad innata y adquirida, que contribuyan a la respuesta contra esta bacteria (Makela y Hormaeche 1997; Eisenstein, 1999).

### **Fase 1: Eliminación de la bacteria en sangre y su muerte temprana**

Una vez que las bacterias se encuentran en el torrente sanguíneo, la fase inicial de la eliminación de la bacteria es rápida y la mayoría son removidas de la sangre debido a una eficiente activación del sistema inmune innato. Las salmonelas con LPS de tipo rugoso son eliminadas más rápidamente que las bacterias con LPS tipo liso (Valtonen *et al.*, 1975). Después de ser removida de la circulación, la bacteria se localiza intracelularmente en los macrófagos, las células polimorfonucleares (PMN), las células dendríticas presentes en el hígado y bazo y, como se ha descrito recientemente, también puede infectar al linfocito B utilizándolo para diseminar la infección (Dunlap *et al.*, 1991; Yrild *et al.*, 2001; Salcedo *et al.*, 2001; Rosales-Reyes *et al.*, 2005).

### **Fase 2: Crecimiento exponencial en el Sistema Retículo Endotelial (SRE)**

Cuando se realiza una infección por la vía intravenosa, una proporción de las salmonelas son eliminadas por las células de la estirpe mieloide, aproximadamente a las seis horas (Dunlap *et al.*, 1991). Las bacterias sobrevivientes comienzan a replicarse exponencialmente en el SRE: en esta fase es importante hacer notar que *S. Typhimurium* puede sobrevivir tanto en células fagocíticas como células no fagocíticas (Mittucker y Kaufmann, 2000). El crecimiento exponencial de *Salmonella* en el SRE del ratón está controlado por el gen de resistencia *nramp1*: la proteína Nramp1 se recluta rápidamente en el fagosoma de las células que contienen bacterias (Vidal, 1993). En esta fase, los macrófagos son cruciales para combatir a *Salmonella*. La activación de los macrófagos por citocinas tales como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ ), es muy importante en la respuesta proinflamatoria contra *Salmonella*. Ambas citocinas están involucradas en la inducción de los mecanismos bactericidas en macrófagos (Liang-Takasaki *et al.*, 1983; Warren *et al.*, 2002).

### **Fase 3: La fase de meseta**

En una infección subletal, la supervivencia del hospedero requiere de la supresión del crecimiento exponencial de la bacteria en el SRE y el establecimiento de una fase de meseta. Este punto es crucial y requiere de la activación de una respuesta inmune adaptativa compleja por parte del hospedero. El establecimiento de la fase

meseta coincide con la infiltración y la activación de macrófagos en el bazo e hígado, el desarrollo de esplenomegalia y con la formación de granulomas ricos en macrófagos, esto se requiere para la supresión del crecimiento de la bacteria en la fase de meseta, la cual no requiere de células B y T funcionales (Hormaeche *et al.*, 1990; Mastroeni *et al.*, 2000; Mastroeni, 2002). Además, la acción concertada de varias citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-15 e IL-18, es necesaria para la supresión del crecimiento bacteriano en esta fase de la infección.

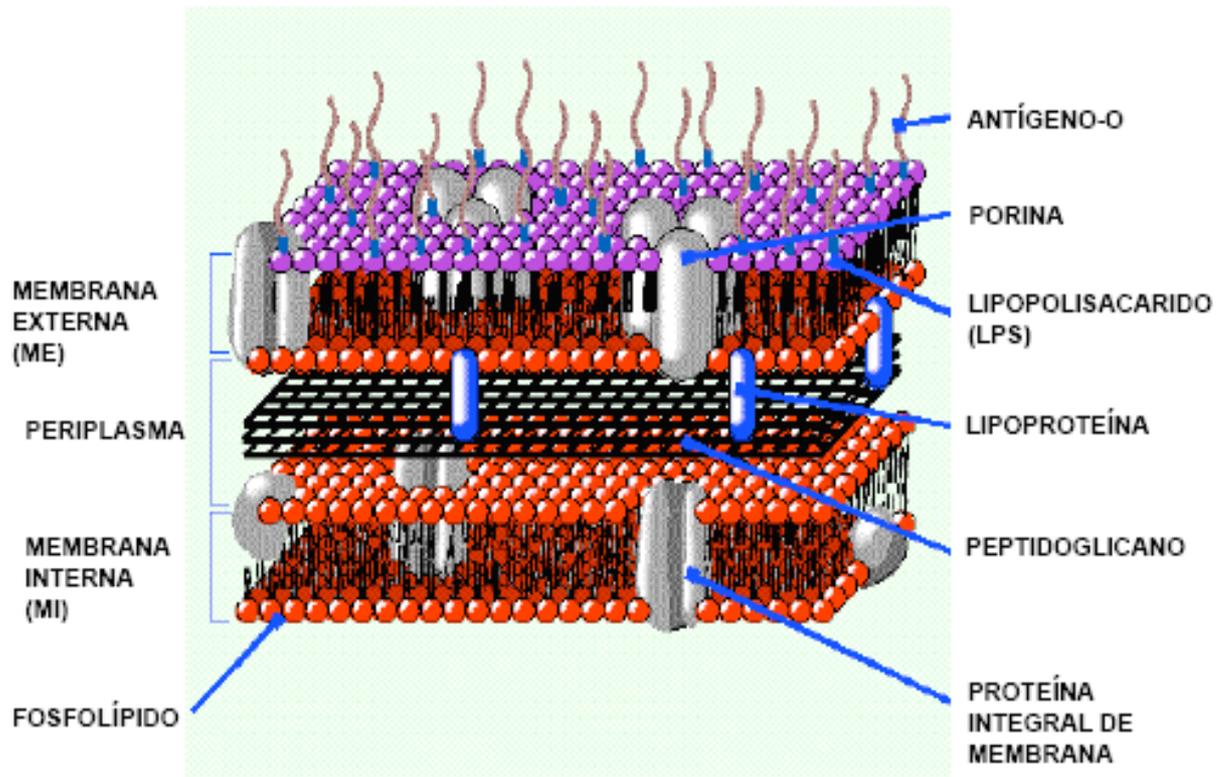
#### **Fase 4: Eliminación de la bacteria del Sistema Retículo Endotelial (SRE)**

La eliminación de la bacteria del SRE requiere de la activación de células T, siendo las células T CD4<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> las principales mediadoras de la resistencia tardía y la eliminación de *Salmonella* (O'Brien y Metcalf 1982; Mittucker *et al.*, 1999; McSorley *et al.*, 2000). En esta fase de la infección, hay un incremento en la producción de IFN $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Mittucker *et al.*, 2002; Monack *et al.*, 2004). Los ratones que carecen de células T CD4<sup>+</sup> pueden suprimir el crecimiento de la bacteria en los tejidos en las fases tempranas de la infección (fase tres), pero mueren tres semanas después debido a un incremento progresivo en la carga bacteriana (Hess *et al.*, 1996). Así, para que se lleve a cabo la eliminación de la bacteria, se requiere de la activación del sistema inmune del hospedero, que pueda inducir una respuesta inmune protectora. En este sentido existe una gran variedad de antígenos presentes en *Salmonella* como el LPS (lipopolisacárido), el antígeno capsular Vi, porinas, proteínas de membrana externa, lipoproteínas, proteínas de choque térmico, flagelo y la fimbria que son reconocidos por anticuerpos específicos generados en humanos y otros animales cuando han estado expuestos a la bacteria (Calderón *et al.*, 1986; Harrison *et al.*, 1997; Brown y Hormaeche, 1989; Cooper y Thorns, 1996; McSorley y Jenkins, 2000; Szein *et al.*, 1994; Kuusi *et al.*, 1979). La mayoría de los antígenos reconocidos por el sistema inmune están presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas; por tal motivo el estudio de estos antígenos, como las porinas, han sido de gran importancia como posibles candidatas en el desarrollo de vacunas de subunidades.

## **I.6 Membranas de las bacterias Gram-negativas.**

Las bacterias Gram-negativas, como *Salmonella*, poseen dos membranas: la membrana interna o citoplasmática (MI) y la membrana externa (ME). El péptidoglicano separa y le da rigidez a las membranas (Verhoef *et al.*, 1979). También tiene un compartimiento celular denominado periplasma. La MI es una bicapa fosfolipídica, la cual tiene una gran variedad de polipéptidos. Ésta actúa como barrera semipermeable permitiendo el paso de aminoácidos y azúcares para los cuales existen mecanismos de transporte específicos (Buechner *et al.*, 1990). La ME consiste en una bicapa de moléculas anfipáticas y proteínas, las cuales son muy abundantes ya que cubren la cara interna y externa de dicha membrana, en un 50 % aproximadamente (Hancock, 1991).

El lipopolisacárido (LPS) es un componente único de la ME; se encuentra en la parte exterior, anclado mediante la unión a proteínas de la ME. El LPS confiere varias propiedades como son: la resistencia a los antibióticos hidrofóbicos, a las sales biliares, detergentes, proteasas, lipasas y lisozima (Nikaido y Vaara, 1985). En la Fig. 1, se muestra una representación esquemática de la organización de los principales componentes de la envoltura de las bacterias Gram-negativas.



**Fig. 1. Esquema de la organización molecular de membranas de las bacterias Gram-negativas.** Membrana interna o citoplásmica (MI); Periplasma; Membrana externa (ME); Proteínas de membrana externa PME; Lipopolisacárido (LPS); Fosfolípidos (FL); Peptidoglicano (PD). Imagen tomada de [www.bio.davidson.edu/.../Chamaloux/first.html](http://www.bio.davidson.edu/.../Chamaloux/first.html).

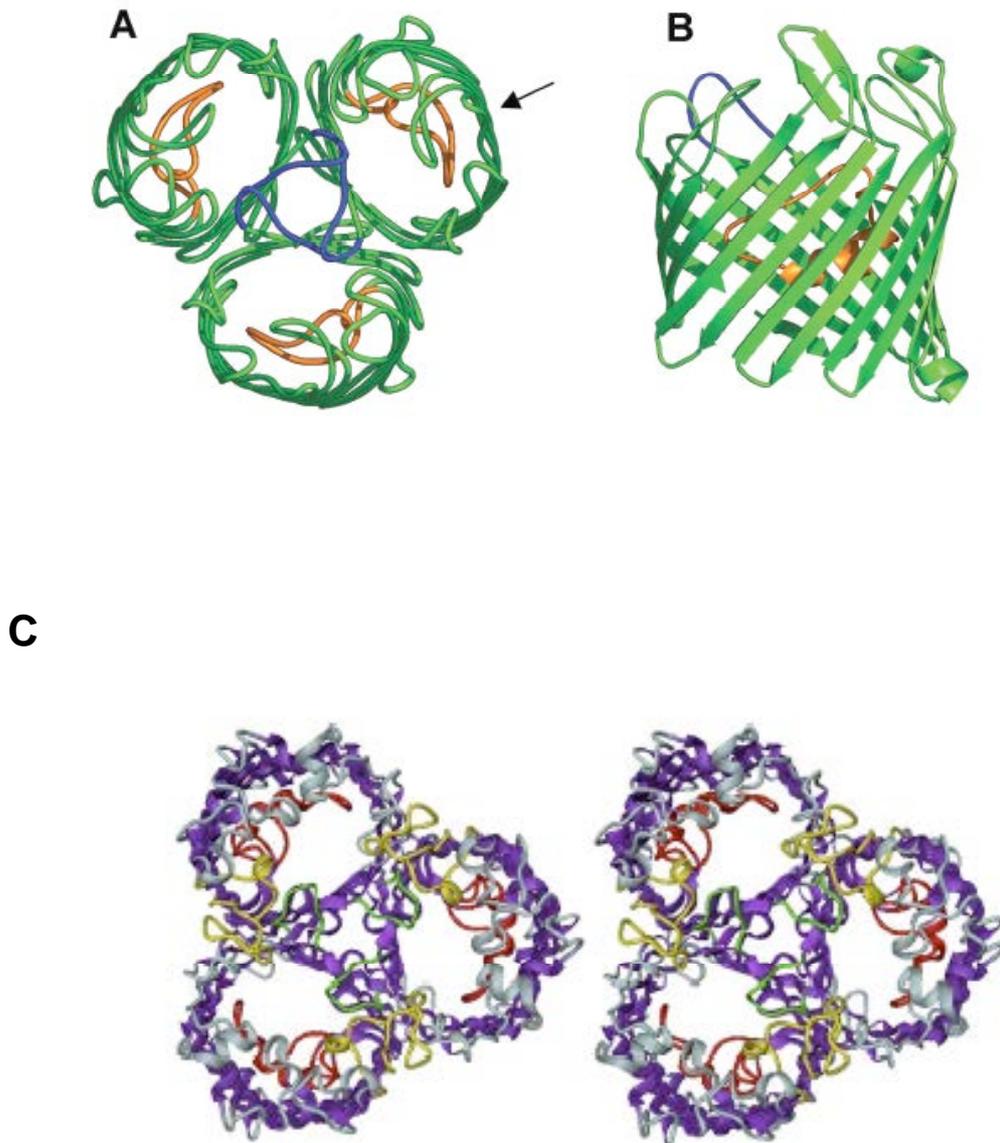
### **I.7 Proteínas de la Membrana Externa (PME)**

Las ME de las bacterias Gram-negativas, son poco permeables a solutos hidrofílicos, como lo son la mayoría de los nutrientes. Por tal motivo tiene proteínas formadoras de canales que permiten el flujo de nutrientes y posiblemente para la salida de desechos. Las proteínas de la membrana externa se clasifican en principales (mayoritarias) y menores. Las proteínas principales son muy abundantes y pueden llegar a expresarse hasta 100,000 moléculas por bacteria (Nikaido, 1996). En este grupo se encuentran las porinas: el término “porinas” se propuso específicamente para las proteínas que forman canales de difusión inespecíficos o “poros”. Las porinas clásicas son OmpC, OmpF y PhoE, las cuales poseen un peso molecular entre 36 y 42 kDa. En términos de selectividad, se ha reportado que OmpC y OmpF tienen preferencia hacia

compuestos catiónicos, mientras que PhoE tiene preferencia por los aniones (Nikaido, 2003). La porina OmpD es un miembro adicional de la familia de porinas y sólo está presente en *S. Typhimurium*, y ausente en otras bacterias Gram negativas incluyendo *E. coli* y *S. Typhi*. OmpD es una de las proteínas más abundantes en la membrana externa de *S. Typhimurium*, bajo condiciones favorables, representa cerca de la mitad de las porinas en dicha bacteria. OmpD es el homólogo de las porinas NmpC y NmpL de *E. coli* K-12; es muy parecida en secuencia de aminoácidos y en las propiedades del canal a OmpC y OmpF, también presentes en *S. Typhimurium* (Singh *et al.*, 1992).

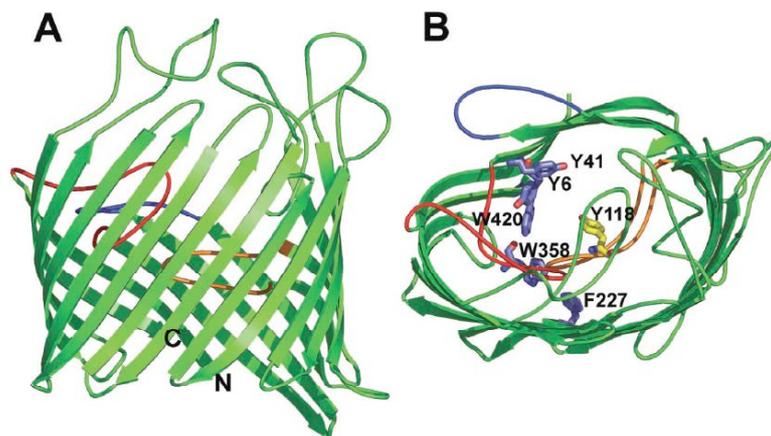
Otra proteína de las moléculas principales es OmpA, o proteína modificable por calor, la cual forma monómeros y su peso es de 35 kDa. Ésta desempeña una función estructural dando rigidez a la membrana. Además, participa en los procesos de conjugación y se ha descrito como receptor de fagos y colicinas. Todas las estas proteínas han sido ampliamente estudiadas en *Escherichia coli* (Datta *et al.*, 1977).

Las porinas forman trímeros de monómeros idénticos que le dan una forma que se asemeja a un barril. Por análisis de cristalografía de rayos X de las porinas OmpF, PhoE y recientemente de la porina OmpC, se sabe que cada monómero consiste en 16  $\beta$  plegadas que forman 16 regiones de hojas anti-paralelas unidas por 8 asas largas externas y 8 asas cortas hacia el periplasma, también tiene  $\alpha$ -hélices intercaladas. En la Fig. 2, se muestran las representaciones de la estructura del trímero y del monómero de la porina OmpF y del trímero de OmpC de *E. coli* (Cowan *et al.*, 1992; Baslé *et al.*, 2006).



**Fig. 2. Representación de la estructura de las porinas OmpF y OmpC de *E. coli*.** A: vista superior del trímero de OmpF, en dirección perpendicular al plano de la membrana. El asa 2, en color azul, tiene una función en la organización estructural de los monómeros para la formación del trímero. El asa 3, en naranja, delimita el tamaño del canal. B: vista lateral del monómero de OmpF (Fig. tomada de Nikaido, 2003). C: representación de la estructura del trímero de la porina OmpC de *E. coli*; vista superior desde el lado extracelular. El asa 3, en rojo; el asa 2, en verde y el asa 4 extracelular en amarillo. Las otras asas están representadas en gris y las hojas  $\beta$ -plegadas en morado (Fig. tomada de Baslé *et al.*, 2006).

Dentro de las proteínas menores, se encuentran los llamados canales específicos como LamB o receptor del fago  $\lambda$  de *E. coli*, la cual cataliza el flujo de maltosa y otros oligosacáridos de la serie de maltosa. Al igual que las porinas, forma homotrimeros; cada monómero forma un barril- $\beta$  formado por 18 cadenas  $\beta$ -plegadas transmembranales (ver Fig. 3). La expresión de LamB en *E. coli* se desreprime en condiciones de falta de carbohidratos, y la presencia de LamB no sólo le confiere ventajas en limitación de glucosa sino también en limitación de lactosa, arabinosa y glicerol. Otro canal específico es ScrY, un homólogo de LamB, el cual está codificado en un plásmido y le permite a algunas cepas de *E. coli* y *S. Typhimurium* utilizar sacarosa como fuente de carbono. Otros compuestos, como sideróforos y la vitamina B<sub>12</sub>, son muy grandes para pasar a través de las porinas clásicas. Estos compuestos son transportados utilizando receptores dependientes de Ton-B. Algunos ejemplos de estos receptores en *E. coli* son: BtuB, para la vitamina B<sub>12</sub>, y seis receptores de sideróforos complejos de Fe<sup>3+</sup>. Estos receptores se unen a su ligando con alta afinidad y para su función requiere de la interacción con TonB (Nikaido, 2003).



**Fig. 3. Estructura de LamB definida por cristalografía de rayos X.** A, vista lateral del monómero, el barril  $\beta$  tiene 18 cadenas a diferencia de las 16 cadenas presentes en las porinas. El asa 3 (naranja), el asa 1 (rojo), se proyecta hacia dentro del canal. El asa 2 (azul), se proyecta al exterior e interacciona con otro monómero en el trímero. B, vista superior del monómero, se muestran algunos aminoácidos importantes en la constricción del canal (Fig. tomada de Nikaido, 2003).

## **I.8 Función de las porinas y la regulación de su expresión.**

Las porinas controlan la permeabilidad de la ME en las bacteria Gram-negativas, por lo que la limitación en nutrientes es uno de los factores principales en la regulación de su expresión. Además, las porinas son sensibles a una gran variedad de factores ambientales, tales como la osmolaridad, la temperatura, el pH, la fase de crecimiento y la densidad celular (Nikaido, 2003).

Uno de los mecanismos más estudiados en la regulación de la expresión de las porinas involucra a los productos del operón *ompB* (EnvZ y OmpR). EnvZ es una histidina cinasa, la cual está en la membrana interna donde actúa como proteína detectora de los cambios en la osmolaridad. Como respuesta a estos cambios, EnvZ se autofosforila y, a su vez, es capaz de fosforilar y defosforilar al regulador OmpR. La fosforilación de OmpR es esencial para la transcripción de los genes de porinas, donde niveles altos de OmpR fosforilado inducen la expresión de OmpC y reprimen a OmpF, mientras que niveles bajos de OmpR fosforilado favorecen la expresión de OmpF (Liu y Ferenci, 2001). En *E. coli* y *S. Typhimurium*, las porinas OmpC y OmpF son reguladas recíprocamente por la osmolaridad del medio. OmpC se expresa preferentemente en osmolaridad alta y OmpF aumenta su expresión en baja osmolaridad (Jovanovich *et al.*, 1988; Liu y Ferenci, 2001; Puente *et al.*, 1991; Martínez-Flores *et al.*, 1999).

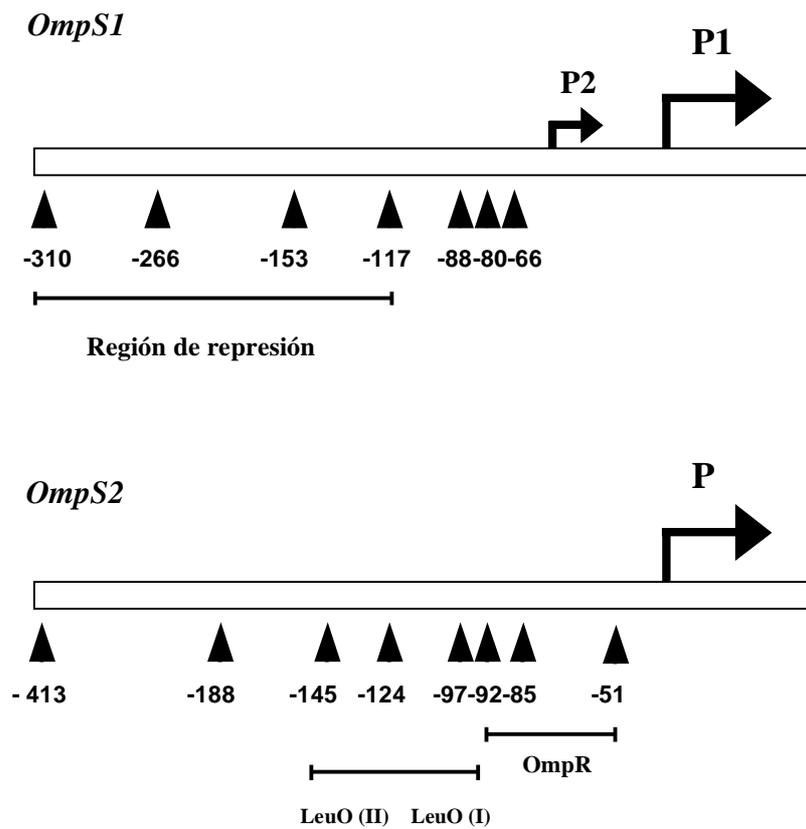
La regulación de la porina OmpD no responde a cambios en la osmolaridad y, a diferencia de las porinas OmpC y OmpF, no depende del sistema de regulación de dos componentes EnvZ/OmpR. Se ha determinado que la abundancia relativa de la porina OmpD, en la membrana externa de *S. Typhimurium*, es regulada por varios factores ambientales, como lo son la anaerobiosis, el pH bajo y la represión catabólica (Santiviago *et al.*, 2003).

*S. Typhi* expresa a las porinas OmpC, OmpF y OmpA. En esta bacteria, los cambios en osmolaridad sólo afectan la expresión de OmpF, la cual se reprime en osmolaridad alta, mientras que la expresión de OmpC no se afecta por los cambios en la osmolaridad (Puente *et al.*, 1991; Martínez-Flores *et al.*, 1999). Además, en *S. Typhi* se identificaron otras dos porinas llamadas OmpS1 y OmpS2, las cuales no se lograron detectar en condiciones de crecimiento estándar de laboratorio (Fernández-Mora *et al.* 1995). En trabajos posteriores se inició el estudio de la regulación de la expresión de estos dos genes, con la finalidad de lograr establecer su función y la razón de la represión de su expresión en condiciones estándar de laboratorio.

Para el caso de OmpS1 se ha encontrado que su expresión se libera cuando se recorta una región de 222 pares de bases (pb), río arriba del promotor 1 (P1) el cual es dependiente de OmpR; además se identificó un segundo promotor (P2), el cual no requiere de OmpR para activarse. Se ha determinado que la expresión de OmpS1 no se induce en varias de las condiciones probadas, tales como los cambios en la osmolaridad o en condiciones de estrés, como lo son los cambios de pH y temperatura o en anaerobiosis o en presencia de sales biliares y péptidos catiónicos (Oropeza *et al.*, 1999). En otro trabajo sobre el estudio de la regulación de la expresión de OmpS1, se ha descrito que H-NS (una proteína nucleóide), la cual es un regulador global de unión a ADN, regula negativamente la expresión de la porina OmpS1 (Flores-Valdez *et al.*, 2003).

En un trabajo acerca de la expresión de la porina OmpS2, en *S. Typhi*, se encontró que se requiere de una región mínima necesaria para su expresión, río arriba de inicio de la transcripción y que, al igual que la porinas mayoritarias, su regulación también depende del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR. Además, de manera interesante, en este trabajo se describe que la expresión de la porina OmpS2 se induce en presencia del regulador LeuO (Fernández-Mora *et al.*, 2004). En la Fig. 4, se muestra un esquema de las regiones de regulación río arriba de los genes *ompS1* y *ompS2* de *S. Typhi*. (Flores-Valdez *et al.*, 2003; Fernández-Mora *et al.*, 2004).

El regulador LeuO pertenece a la familia de reguladores LysR (Henikoff *et al.*, 1988). Su función se ha relacionado con la respuesta a estrés, por lo que se ha considerado que puede ser importante en la sobrevivencia en el ambiente, en condiciones diferentes a las probadas en el laboratorio. Existen trabajos en *E. coli* donde se ha descrito la probable función de LeuO, se ha encontrado que la sobre expresión de LeuO causa la supresión de una cepa mutante en *hns*, sobre la expresión del gen *cadC*: H-NS reprime la expresión de este gen, por lo que al sobreexpresar LeuO, también lo reprime. Además, se ha descrito que al sobre expresar LeuO se induce la expresión del operón *bgl* (Shi y Bennett, 1995; Ueguchi *et al.*, 1998). También se ha reportado que ejerce un efecto negativo en la expresión del RNA pequeño DsrA, involucrado en la traducción de RpoS (Klauck y Bohringer, 1997). Además, se ha descrito que el gen *leuO* es regulado negativamente por H-NS y que tiene regiones de control negativo y positivo río arriba del inicio de transcripción (Chen *et al.*, 2001).



**Fig. 4. Esquema de las regiones de regulación de los genes *ompS1* y *ompS2* de *S. Typhi*.** Se muestra la región de regulación del gen *ompS1*, los dos promotores y una región de represión. Se muestra la región de regulación del gen *ompS2*, el promotor, dos zonas de pegado de LeuO y la zona de pegado de OmpR. En ambos casos se señalan diferentes recortes con los que se han delimitado las zonas de regulación positiva y negativa (Flores-Valdez *et al.*, 2003; Fernández-Mora *et al.*, 2004).

## **I.9 Las porinas y su función en la virulencia.**

La función de las diferentes porinas, así como del regulador OmpR, en la virulencia, se ha estudiado usando cepas de *S. Typhimurium* mutantes en los diferentes genes, en el modelo de infección en ratón. En un primer trabajo se reportó que una cepa mutante en el regulador OmpR estaba muy atenuada en virulencia, pero que las cepas mutantes sencillas, tanto en OmpF o en OmpC, no mostraron tener un efecto en la virulencia, ya que presentaban valores en la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), muy parecidos al de la cepa silvestre. En ese mismo trabajo, los autores reportaron que una cepa mutante en la porina OmpD, presentaba una ligera atenuación en la virulencia cuando se comparaba con la cepa silvestre (Dorman *et al.*, 1989).

Posteriormente, se demostró que una cepa de *S. Typhimurium* doble mutante *ompC*, *ompF* estaba atenuada en la virulencia en el modelo de infección en ratón, pero no se observó lo mismo con las cepas mutantes sólo en OmpC u OmpF, coincidiendo con el trabajo anterior (Chatfield *et al.*, 1991). Posteriormente se evaluó una vez más la función de OmpD en virulencia, observándose, de manera interesante, que cepas mutantes en *ompD* no presentan atenuación en la virulencia ya que mostraron valores en la DL<sub>50</sub> similares a los de la cepa silvestre (Meyer *et al.*, 1998).

Recientemente se reportó que mutantes en los genes de porinas, *ompS1* y *ompS2*, de *S. Typhimurium*, cepa 14028, están altamente atenuadas en virulencia en el modelo de infección en ratón. La carga bacteriana en bazo e hígado se redujo con respecto a la cepa silvestre, debido a que se encontraron de 250 a 400 veces menor cantidad de bacterias de las cepas mutantes en bazo e hígado, cuando se realizaron índices de competitividad con la cepa silvestre, después de la infección por vía oral (Rodríguez-Morales *et al.*, 2006).

## **I. 10 Importancia de las porinas de *S. Typhimurium* como antígenos protectores.**

Se estima que aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la bacteria se localizan en la membrana (Schulz, 2002). Debido a que las porinas son proteínas que están expuestas al medio externo, se ha propuesto que éstas podrían ser reconocidas directamente por el sistema inmune del hospedero durante la infección, específicamente por anticuerpos. En este sentido, se piensa que las porinas pueden influir o prevenir la

infección si son utilizadas en el desarrollo de vacunas contra la fiebre tifoidea, así como de sistemas de inmunodetección.

Las porinas de *S. Typhimurium* han conferido protección contra el reto con cepas virulentas en el modelo de ratón. En uno de los primeros estudios al respecto, las porinas se extrajeron de una cepa rugosa, tanto la inmunización como el reto con una cepa lisa de *S. Typhimurium* ( $DL_{50} = 10^5$ ) fue por la vía intraperitoneal (ip). Las porinas de 34, 35 y 36 kDa, confirieron una protección del 40% y 90 % con 1 y 10  $DL_{50}$ , respectivamente. Además, reportaron que la transferencia pasiva de suero también fue capaz de conferir protección a los ratones retados con la cepa virulenta de *S. Typhimurium* (Kuusi *et al.*, 1979).

En otro trabajo, se inmunizaron a los ratones por la vía subcutánea con 50  $\mu$ g de PME y se retaron con 50  $DL_{50}$  ( $5 \times 10^6$ ) por la vía intravenosa. Esta preparación de PME confirió a los ratones inmunizados una protección del 100% contra 50  $DL_{50}$ . Se observó que las PME provenientes de una cepa rugosa (carente del antígeno O) confiere un 90 % de protección. Esta preparación de proteínas de membrana externa (PME) de *S. Typhimurium* consta de aproximadamente 30 polipéptidos, con pesos moleculares entre 12 y 120 kDa, conteniendo 100  $\mu$ g de LPS por mg de proteína. Se demostró que en los ratones inmunizados con LPS proveniente de una cepa lisa o rugosa, confirió 22 y 0 % de protección, respectivamente. Además, se pudieron detectar títulos altos de anticuerpos anti-porinas en los ratones inmunizados con 50  $\mu$ g de PME con respecto a los ratones no inmunizados. En otro estudio la inmunización con 50  $\mu$ g de porinas confirió una protección del 36 % contra 10  $DL_{50}$ , sin embargo, no se observó protección al reto con 50  $DL_{50}$ . Por otra parte la inmunización con 100 y 200  $\mu$ g de porinas confirió un 42 y 45 % de protección a un reto con 10  $DL_{50}$ , respectivamente, pero no protegió al reto con 50  $DL_{50}$  de la cepa virulenta. En este trabajo se menciona que las porinas de *S. Typhimurium* asociadas al LPS inducen mayores índices de protección contra la *Salmonella* en comparación con los ratones inmunizados con porinas libres de LPS. Posteriormente, se reportó que los ratones inmunizados con LPS mostraron un 36 % de protección, y la inmunización con porinas mostró una protección del 25 %, la combinación de porinas con el LPS indujo un 100 % de protección contra 10  $DL_{50}$ . Estos resultados indican que para obtener una protección del 100 % se requiere la presencia de trazas de LPS unido a las porinas. Sin embargo, se cree que esto se puede deber a la inducción de anticuerpos anti-LPS y las subclases de anticuerpos IgG,

generados contra las porinas (Udhayakumar y Muthukkaruppan, 1987; Udhayakumar y Muthukkaruppan, 1989; Muthukumar y Muthukkaruppan, 1993).

Además se ha reportado que las porinas inducen la secreción de citocinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 en monocitos y de IFN- $\gamma$  e IL-4 en linfocitos provenientes de humanos. Debido a que se tenía 10 pg de LPS por 10  $\mu$ g de porinas, se demostró que la cantidad de LPS presente en la preparación de porinas no es suficiente para producir el mismo efecto. Además, se encontró que la inmunización intraperitoneal con porinas indujo una respuesta de linfocitos cooperadores tipo 2 (Th2) con la producción de IL-4 y no se detectó secreción de IFN- $\gamma$ . También se reportó que con 10  $\mu$ g de porinas se induce una protección del 100% y del 80 % en ratones con una dosis subletal de *S. Typhimurium* ( $DL_{50} = 2 \times 10^4$ ), (Galdiero *et al.*, 1993; Galdiero *et al.*, 1998).

### **I. 11 Importancia de las porinas de *S. Typhi* como antígenos protectores.**

Respecto a las porinas de *S. Typhi* como antígenos protectores, fue muy importante un estudio donde se detectó, por ensayos de ELISA, la presencia de anticuerpos anti-porinas, IgG e IgM en sueros de pacientes con fiebre tifoidea. Posteriormente, se determinó que las PME entre un peso molecular de 36-42 kDa, pesos moleculares correspondientes a las porinas, tenían un mayor reconocimiento de anticuerpos IgG presentes en los sueros de pacientes con FT. Además, se detectó la presencia de anticuerpos de clase IgG, IgM, e IgA en sueros de pacientes con fiebre tifoidea, los cuales reconocieron en forma específica a las PME de *S. Typhi* (Calderón *et al.*, 1986; Ortiz-Navarrete *et al.*, 1989; Verdugo-Rodríguez *et al.*, 1993). Estos resultados indicaban que las porinas podían ser reconocidas como antígenos durante la fiebre tifoidea y que son las proteínas más inmunogénicas presentes en las PME, por lo cual podrían ser capaces de generar protección. Para el estudio de las PME de *S. Typhi* como antígenos protectores, se ha aceptado el modelo experimental en ratón que consiste en inyecciones intraperitoneales (i.p.) de la bacteria (*S. Typhi*) suspendida en mucina. Esta produce una inflamación local, lo cual ayuda a que los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal sean capaces de internalizar a *S. Typhi* (Spaun, 1964; Sein *et al.*, 1993). Utilizando este modelo, se demostró que 30  $\mu$ g de PME de una cepa de *S. Typhi*, que contenía 4% de LPS, confirieron una protección del 100 % al reto con 500 y 1000  $DL_{50}$  de *S. Typhi* ( $DL_{50} = 1.5 \times 10^5$ ). Cuando el reto se realizó con una cepa

de *S. Typhimurium*, se observó una protección del 45 y 30 % al reto con 500 y 1000 DL<sub>50</sub>. La inmunización con 1.25 µg de LPS, la cantidad de LPS presente en 30 µg de PME, confirió una protección del 40% y 10% al reto con 100 y 300 DL<sub>50</sub>. Con lo cual se estableció que es la fracción de proteínas la que confiere protección y no las trazas de LPS contenido en las preparaciones de PME. También, se encontró el suero de conejo anti-PME confirió el 100 % de protección al reto con 100 DL<sub>50</sub>. Posteriormente, las porinas fueron purificadas de la misma cepa de *S. Typhi* y se observó que confirieron una protección del 90% a un reto de 500 DL<sub>50</sub>. Y no se observó protección al reto con *S. Typhimurium*. Después, se obtuvo a la porina OmpC de manera recombinante (OmpC<sub>r</sub>), en una cepa de *E. coli* la cual confirió protección del 40 % al reto con 100 LD<sub>50</sub> (Isibasi *et al.* 1988; Isibasi *et al.*, 1992; Isibasi *et al.*, 1994; Paniagua-Solis *et al.*, 1995).

De manera más específica, se ha estudiado a las porinas OmpC u OmpF de *S. Typhi*. Los ratones fueron inmunizados con 10 µg de OmpC y de OmpF, sin adyuvante, observándose que la porina OmpC confiere una protección del 100% al reto con 20 y 100 DL<sub>50</sub>, y una protección del 80% contra 500 DL<sub>50</sub>. Por otro lado, para OmpF se observó una protección de 100, 70 y 60% al reto con 20, 100 y 500 DL<sub>50</sub>, respectivamente. Estos datos indican que la porina OmpC tiene mayor capacidad de conferir protección contra el reto con la cepa virulenta de *S. Typhi* (Secundino *et al.*, 2006). Se observó que la porina OmpC induce la generación de mayores títulos de anticuerpos con capacidad bactericida (IgG2a e IgG2b), en comparación con los anticuerpos generados por la inmunización con OmpF. También se determinó que la respuesta es específica para las porinas de *S. Typhi*, ya que no presenta reacción cruzada con porinas de *S. Typhimurium* y poca reacción cruzada contra las porinas de *E. coli*. Esto sugería nuevamente, que la protección cruzada observada en trabajos anteriores puede deberse a la homología que existe entre las porinas de los diferentes serotipos. Pero a su vez sugiere que hay epítomos no compartidos entre las porinas de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* (Paniagua-Solis *et al.*, 1995). Así, la respuesta es específica para el serotipo de *Salmonella* de donde se obtienen las porinas.

## II. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, se identificaron a las porinas OmpS1 y OmpS2 en *S. Typhi*, las cuales no se lograron detectar en condiciones de crecimiento estándar de laboratorio. De igual manera que para las porinas OmpC y OmpF, OmpS1 y OmpS2 requieren del operón *ompB* para su expresión. En *S. Typhi* la expresión de OmpS1 ha sido relacionada con represión por H-NS, y para OmpS2 se encontró que su expresión se induce por el regulador LeuO (Fernández-Mora *et al.*, 1995; Flores-Valdez *et al.*, 2003; Fernández-Mora *et al.*, 2004). *S. Typhimurium* también tiene los genes que codifican para las porinas OmpS1 y OmpS2; sin embargo, al igual que lo observado en *S. Typhi*, estas no se expresan en condiciones de crecimiento *in vitro*. A diferencia de lo mucho que se ha avanzado en el conocimiento de la regulación de la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 en *S. Typhi*, poco o nada se sabe de la regulación de la expresión de estas porinas en *S. Typhimurium*.

Sin embargo, lo que se ha hecho en *S. Typhimurium* con respecto a estas dos porinas de baja expresión fue lo reportado por Rodríguez-Morales y cols, donde se demostró que cepas mutantes en cada una de estas porinas o en la cepa que carece de ambas, derivadas de la cepa virulenta 14028, presentaron atenuación en la virulencia al ser administradas por la vía oral, en el modelo de infección en el ratón. Además, se realizaron ensayos de índices competitivos con mezclas de cada una de las mutantes con la cepa silvestre 14028, tanto por la vía oral como intraperitoneal. Estos resultados indican que las porinas OmpS1 y OmpS2 podrían tener una función principalmente en las etapas tempranas de la infección, ya que la virulencia de estas cepas mutantes no se afectó cuando se infectaron los ratones vía intraperitoneal (Rodríguez-Morales *et al.*, 2006). Con este trabajo se logró establecer que las porinas OmpS1 y OmpS2, a pesar de que no se ha logrado encontrar las condiciones adecuadas para inducir su expresión en condiciones de crecimiento estándar de laboratorio, podrían tener un efecto en la virulencia de *S. enterica* serovar Typhimurium durante la infección. Por tal motivo, se pretende continuar con el estudio de ambas porinas, con la finalidad de elucidar su importancia *in vivo* utilizando el modelo de la infección en ratón por la vía oral (vía natural de infección).

### **III. HIPÓTESIS**

Las porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. enterica* serovar Typhimurium, pueden expresarse de manera abundante. Estas porinas, serán capaces de generar protección contra el reto con la cepa virulenta 14028 de *S. Typhimurium*, en los ratones inmunizados.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **GENERAL:**

Establecer las condiciones de expresión óptima de las porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. Typhimurium* y lograr su purificación. Con las porinas obtenidas se podrá evaluar su capacidad de generar protección al reto con la bacteria en el modelo de infección en ratón.

#### **PARTICULARES:**

- Inducir la expresión de la porina OmpS2 en *S. Typhimurium*, en presencia del regulador positivo LeuO.
- Expresar la porina OmpS1 de *S. Typhimurium* mediante la clonación del gen *ompS1*, en un vector de inducción y determinar las condiciones de crecimiento para su óptima expresión.
- Caracterización del perfil de PME de las diferentes cepas mutantes, derivadas de la cepa silvestre 14028 de *S. Typhimurium*.
- Purificar las porinas OmpS1, OmpS2 y OmpC de *S. Typhimurium*, mediante el método de Nikaido y por cromatografía de exclusión molecular.
- Evaluar la capacidad de las porinas OmpS1, OmpS2 y OmpC de generar protección en ratones inmunizados al reto con la cepa silvestre 14028 de *S. Typhimurium*.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 1. Para la purificación de PME, las bacterias se crecieron aeróbicamente a 37°C, con agitación a 200 rpm, en matraces de 250 ml con 100 ml de medio MN, MN con 0.3 mM de NaCl (MNN) o LB. Se agregaron diferentes antibióticos según fuera el caso: tetraciclina (20 µg/ml), ampicilina (400 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml) y cloranfenicol (30 µg/ml).

### V.2 Preparación de células electrocompetentes.

Las bacterias se inocularon en 100 ml de medio SOB; se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{550} = 0.8$ . Los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm (revoluciones por minuto) por diez minutos; la pastilla obtenida se lavó dos veces con 100 ml glicerol al 10%. Después de los dos lavados, la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de glicerol al 10%, y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 0.6 ml estériles y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

### V.3 Clonación de los genes *ompS1* y *ompS2* en el vector pTrc99A

Para inducir la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. Typhimurium* y lograr ver las proteínas en la membrana externa, se procedió a clonar los genes *ompS1* y *ompS2*, que codifican para dichas porinas respectivamente, en el plásmido multicopia pTrc99A (ver Tabla 2).

Para obtener los genes de *ompS1* y *ompS2*, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes (Tabla 3), se utilizó como molde el ADN genómico de la cepa 14028, de *S. Typhimurium*. Los genes *ompS1* y *ompS2* se amplificaron sin su región reguladora, ni promotor, a partir del inicio de la transcripción, en donde se generó un sitio *NcoI*. Después del codón de paro, se generó un sitio *BamHI*. La clonación se realizó en los sitios únicos para *BamHI* y *NcoI* del vector pTrc99A; el sitio *NcoI*, está junto al promotor *trc*, permitiendo que los insertos se ligen y se expresen directamente bajo este promotor, el cual puede ser inducido con IPTG.

Tanto los productos de PCR, como el plásmido p*Trc99A*, fueron digeridos con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* (Invitrogen). Con los productos de la digestión se realizó la reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Promega), en una relación de 3:1 respectivamente.

Con los productos de la ligación, se transformó a la cepa TOP-10 de *E. coli* por medio de electroporación (ver más adelante). De algunas clonas candidatas se obtuvieron los plásmidos y estos fueron caracterizados por su movimiento electrofóretico, su perfil de restricción mediante el empleo de endonucleasas, en geles de agarosa al 1% (datos no mostrados). Con esto se corroboró la presencia del inserto correspondiente a los tamaños esperado para los genes de *ompS1* u *ompS2*. A los plásmidos recombinantes, que contienen al gen *ompS1* y *ompS2*, se les dio el nombre pCGS1C1 y pCGS2C1, respectivamente.

#### **V.4 Transformación de las cepas bacterianas**

Para transformar las diferentes cepas utilizadas en este trabajo, se utilizaron celdas de electroporación (BIORAD), las bacterias electrocompetentes se descongelaron en hielo por aproximadamente 10 minutos: también las celdas fueron enfriadas previamente. Se mezclaron de 50 pg a 100 ng de plásmido con 50  $\mu$ l de células electrocompetentes en las celdas de electroporación. Se les dio un pulso de 2.5 KV en un electroporador (micropulse, BIORAD). Las células se recuperaron en 1 ml de medio SOC a 37°C por 60 minutos; después se cultivaron en medio agar LB, con los antibióticos correspondientes, para seleccionar a las clonas que tuvieran los plásmidos recombinantes.

#### **V.5 Obtención de los plásmidos de las clonas candidatas**

A las clonas candidatas, para comprobar la presencia de los plásmidos recombinantes, se les extrajeron los plásmidos por medio de la técnica de lisis alcalina (Miniprep), como se describe brevemente a continuación: Se crecieron las colonias en 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, se cosecharon las bacterias y se les agregó RNAasa (10  $\mu$ g/ml), se resuspendieron en 200  $\mu$ l del amortiguador SET. Después se agregaron 400  $\mu$ l de la solución de lisis (20 % de SDS y 2 N de NaOH), se

incubaron en hielo por 5 minutos y se agregó 300  $\mu$ l de Acetato de Potasio 3 M y se centrifugaron a 14,000 rpm por media hora. El sobrenadante se mezcló con 500  $\mu$ l de isopropanol y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos. El pastilla se lavó 3 veces con etanol al 70%, la pastilla obtenida se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua.

## **V.6 Expresión y purificación de las porinas OmpS1 y OmpS2 en *S. Typhimurium***

Una vez que se caracterizaron a los plásmidos recombinantes pCGS1C1 y pCGS2C1, que contienen a los genes *ompS1* y *ompS2*, y se verificó la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 en la cepa TOP-10 de *E. coli*. Estos plásmidos fueron introducidos por medio de electroporación en *S. Typhimurium*. De igual manera, se comprobó la presencia de los plásmidos en dicha cepa por su movimiento electroforético y patrón de restricción, específicos para cada uno de los genes *ompS1* y *ompS2* (datos no mostrados). Después se procedió a analizar la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, y se probaron las condiciones óptimas para su sobre expresión. Para ello, se evaluó el crecimiento en medio LB y en medio MN con diferentes concentraciones de IPTG (0.1 a 0.5 mM). Después se procedió a realizar la purificación de PME de la cepa silvestre, 14028 de *S. Typhimurium*.

## **V.7 Generación de mutantes por el método de Datsenko-Wanner**

Con la finalidad de obtener una preparación más limpia, así como para caracterizar las diferentes porinas presentes en *S. Typhimurium*, se obtuvieron una serie de mutantes en las diferentes porinas mayoritarias, así como del regulador OmpR (Tabla 1). Las mutantes se generaron mediante la técnica descrita por Datsenko-Wanner, 2001.

## **V.8 Purificación de las proteínas de membrana externa, mediante el método de Schnaitman modificado.**

El análisis de la expresión de las porinas de las diferentes cepas, se realizó por purificación de las proteínas de membrana externa de acuerdo al método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991), el cual se describe brevemente a continuación. Las cepas se crecieron en medio LB, MN o MNN con el antibiótico correspondiente. Cuando fue necesario, se agregó 0.5 mM de IPTG al inicio de la incubación, se realizó una curva de crecimiento midiendo la absorbancia a 590 nm hasta alcanzar una absorbancia de 1.0 (+/- 0.05). Las bacterias se cosecharon y se lavaron con PBS, después se resuspendieron en el amortiguador Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM). Las células se lisaron utilizando un sonicador (Sonics & Materials). Las bacterias lisadas se centrifugaron a 12,000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se centrifugó a 10,000 rpm a 4° C durante 30 min. La pastilla se resuspendió en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM) con Tritón al 2 % y se incubó por 30 min a 37°C. Después se centrifugó a 10,000 a 4°C por 30 min. La pastilla se lavó con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y se centrifugó a 10,000 a 4°C durante 30 min. Finalmente, la pastilla obtenida se resuspendió en un volumen de 50 µl de PBS.

## **V.9 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

La electroforesis SDS-PAGE de las porinas se realizó en un sistema de electroforesis vertical (BioRad System). El gel se utilizó a una concentración del 12% de poliacrilamida. El amortiguador fue Tris-HCl 0.125 M pH 6.8 con SDS al 2%. La separación se realizó a 10 mA por gel. Los geles se visualizaron mediante su tinción con azul de Coomassie.

## **V.10 Purificación de Porinas por el método de Nikaido**

Para la obtención de las porinas OmpC y OmpS1, a partir de las cepas STMFD y STMRD/pCGS1C1 (ver Tabla 1 y Tabla 2), se realizó la purificación por el método de Nikaido. Para obtener una gran cantidad de porinas, el creciendo las cepas se realizó en un total de 10 litros de medio LB. La fermentación se realizó en las condiciones

antes mencionadas, a 37 °C, 200 rpm. Primero se creció la cepa semilla (STMFD y STMRD/pCGS1C1) en 6 matraces de 1 litro con 150 ml de LB, se incubó y se realizó una curva de crecimiento; el crecimiento se detuvo cuando se obtuvo una lectura de 1.0 (+, - 0.5) a 540 nm. El cultivo se vertió en matraces de 4 litros conteniendo 1.5 litros de medio LB; este cultivo se incubó nuevamente a 37 °C a 200 rpm, y nuevamente se realizó una curva de crecimiento con estos cultivos. La cepa se cosechó cuando la lectura de la absorbancia fue de 1.0 (+, - 0.5) a 590 nm.

Después se procedió a la purificación de porinas por el método de Nikaido, el cual se describe a continuación. Las cepas que se cosecharon en fase de crecimiento logarítmico tardío se lavaron con Tris-HCl pH 7.7. Las bacterias se lisaron con ayuda de la Prensa Francesa; después se centrifugaron a 7,000 rpm por 15 minutos, para separar la suspensión bacteriana del resto del contenido celular. El sobrenadante se incubó a 37°C por 30 minutos con DNasa (10,000 u/ml), RNasa (10,000 u/ml) y MgCl<sub>2</sub> (1 M). El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación a 25,000 rpm por 45 minutos a 4 °C. La pastilla se solubilizó en Tris-HCl pH 7.7, SDS 2 % pH 7.7, y se incubó a 32 °C por 30 minutos. Se sometió nuevamente a ultracentrifugación a 25,000 rpm por 45 minutos a 20 °C. La pastilla se solubilizó con Tris-HCl pH 7.7, SDS 2 % y se ultracentrifugó a 25,000 rpm por 45 minutos a 20 °C. La pastilla se solubilizó con Tris-HCl pH 7.7, SDS 1 %, NaCl (0.4 M), EDTA (0.005 M), β-Mercaptoetanol (amortiguador de Nikaido) y se incubó por dos horas a 37 °C con agitación a 120 rpm; posteriormente se ultracentrifugó a 25,000 rpm por 45 minutos a 20 °C. En este último paso se recuperó el sobrenadante, que es en donde se encuentran las porinas.

#### **V.11 Separación de las porinas por cromatografía de exclusión molecular**

Después de extraer a las porinas por el método de Nikaido, se sometieron a purificación mediante cromatografía de exclusión, utilizando una columna de Sephacryl S-200 de 2.6 cm de diámetro y 60 cm de longitud. La cual tiene una resolución para péptidos y proteínas con pesos moleculares entre 5,000 y 250,000 Da (Amersham Biosciences). Se ha reportado que este paso del proceso de purificación, separa la preparación de porinas de otras proteínas presentes en la membrana externa y de la mayoría del LPS que se encuentra unido a las porinas (Salazar-González *et al.*, 2004). La columna se conectó a un minicromatógrafo AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech); La columna se calibró con Tris-HCl pH 7.7, SDS 0.5 %, NaCl (0.4 M),

EDTA (0.005 M) (amortiguador de Nikaido para purificación de porinas). Para recuperar las porinas, se utilizó el mismo buffer y se aplicó un flujo de 0.3 ml/min. Se colectaron fracciones de 4 ml y se guardaron a 4 °C, hasta su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las porinas se colectaron en el primer pico de desprendimiento, y se guardaron a 4°C, hasta la cuantificación de la concentración y su uso para ensayos de protección (ver en Resultados).

## **V.12 Cuantificación de concentración de porinas**

La concentración de proteínas (porinas) en las fracciones colectadas por cromatografía de exclusión molecular se determinó utilizando el estuche comercial BCA (Pierce), en un lector de microplacas computarizado modelo Ceres (Biotek) mediante un programa con una curva de referencia de albúmina bovina (Sigma, Co).

## **V.13 Ensayo de la capacidad protectora de la porina OmpS1**

Para el ensayo de protección se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad. Durante el transcurso del experimento, los animales inmunizados e infectados con *S. Typhimurium* se mantuvieron en el cuarto de cuidado de animales infectados con patógenos en el Bioterio del Instituto de Biotecnología (UNAM). Se decidió utilizar la cepa de ratones BALB/c, debido a que son susceptibles a las infecciones con patógenos intracelulares por una mutación en el gen (*Nramp1*<sup>G169</sup>); este gen está involucrado en el control de la multiplicación temprana de *S. Typhimurium* dentro de los macrófagos y sucumben a la infección. Es esta característica de la cepa BALB/c, de susceptibilidad a la infección por *Salmonella*, por la cual se decidió evaluar la capacidad de las porinas para generar protección contra el reto con una cepa virulenta.

El esquema de inmunización se elaboró de acuerdo a lo reportado (Secundino *et al* 2006). En este experimento se utilizaron grupos de 5 animales: la primera inmunización se realizó por vía intraperitoneal con 20 µg de porinas; al día 15 se aplicó un refuerzo con una segunda inmunización intraperitoneal, con la misma cantidad de porina de la primera inmunización (20 µg). Los antígenos (porinas), se disolvieron en PBS, sin adyuvante y la inmunización se realizó con 300 µl de PBS conteniendo los 20

$\mu\text{g}$  de porina (OmpS1 u OmpC). El reto con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (14028 con una  $\text{DL}_{50}=10^3$ ) se realizó al día 25 de la primera inmunización, vía oral con: 1  $\text{DL}_{50}=10^3$ , 10  $\text{DL}_{50}=10^4$  y 100  $\text{DL}_{50}=10^5$ . Como grupo control se inmunizaron a grupos de 5 ratones con 300  $\mu\text{l}$  de PBS y se retaron con la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, siguiendo el mismo esquema para los grupos inmunizados con porinas.

Se realizó el monitoreo a los grupos de ratones inmunizados y retados por un período de 28 días después del reto. El nivel de protección se define como el porcentaje de sobrevivencia de los ratones inmunizados con porinas y retados con la cepa virulenta de *S. Typhimurium*, comparados con los ratones inmunizados con PBS y retados con la cepa virulenta.

#### **V. 14 Determinación de viabilidad (cuentas viables)**

Para realizar el reto con la cepa 14028 de *S. Typhimurium*, ésta se creció en 5 ml de medio LB por 12 horas. Después este cultivo se vertió en 40 ml de medio LB en un matraz de 250 ml y se incubó a 37° C con agitación, a 200 rpm, hasta alcanzar una  $\text{DO}_{590} = 0.6$ . El cultivo se centrifugó a 6,000 rpm por 10 minutos y la pastilla se resuspendió en 2 ml de PBS. De este concentrado se tomaron 150  $\mu\text{l}$  y se resuspendió en 10 ml de PBS, a partir del cual se realizaron las siguientes diluciones:  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ . Se tomaron 300  $\mu\text{l}$  de las diluciones  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ , con los cuales se llenaron las jeringas para inocular a los ratones por vía oral. Para los grupos control se utilizó 300  $\mu\text{l}$  de PBS.

Para realizar las cuantas viables se cultivaron 100  $\mu\text{l}$  por duplicado de las diluciones  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  en cajas con medio agar LB, las cuales se incubaron a 37 °C, toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de las colonias y se determinó la dosis real de inoculación la cual fue de:  $2.31 \times 10^3$ ,  $2.31 \times 10^4$  y de  $2.31 \times 10^5$ .

**Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.**

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
TOP-10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> .	ATCC
<i>S. Typhimurium</i>		
14028	Cepa silvestre virulenta (Sp <sup>r</sup> ).	ATCC
STMR	Mutante derivada de la cepa 14028, Δ <i>ompR</i> ::Km. generada por el método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000).	Vázquez, Alejandra
STMFD	Mutante derivada de la cepa 14028, Δ <i>ompF</i> ::Km, Δ <i>ompD</i> ::Cm, generada por el método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000).	Vázquez, Alejandra
STMRD	Mutante derivada de la cepa 14028, Δ <i>ompR</i> ::Km, Δ <i>ompD</i> ::Cm generada por el método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000).	Vázquez, Alejandra
STMS14	Mutante derivada de la cepa 14028, Δ <i>ompS1</i> ::Km. generada por el método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000).	Rodríguez-Morales <i>et al.</i> , 2006
STMS23	Mutante derivada de la cepa 14028, Δ <i>ompS2</i> ::Km. generada por el método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000).	Rodríguez-Morales <i>et al.</i> , 2006
STMS23S15	Mutante derivada de la cepa 14028, Δ <i>ompS1</i> ::Cm, Δ <i>ompS2</i> ::Km generada por el método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000).	Rodríguez-Morales <i>et al.</i> , 2006

**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Descripción	Referencia
pTrc99A	Vector de expresión derivado de pKK233-2: tiene el promotor fuerte ( <i>trc</i> ) río arriba de un sitio múltiple de clonación con un sitio único de <i>NcoI</i> junto al promotor <i>trc</i> , permitiendo que los insertos se ligen y se expresen directamente a partir del sitio de inicio de la transcripción (ATG). Contiene el gen de <i>lac I<sup>q</sup></i> , origen de replicación <i>colE1</i> , y el gen que da resistencia Ampicilina (Amp <sup>R</sup> ).	Pharmacia Biotech
pCGS2C3	Derivado de pTrc99A, contiene el gen de <i>ompS2</i> de <i>S. Typhimurium</i> .	Este trabajo
pCGS1C1	Derivado de pTrc99A, contiene el gen de <i>ompS1</i> de <i>S. Typhimurium</i> .	Este trabajo
pFMTrc12	Derivado de pTrc99A, contiene el origen de replicación P15A1, <i>lac I</i> , el promotor <i>trc</i> , y el gen que da resistencia Ampicilina (Amp <sup>R</sup> ).	Fernández-Mora <i>et al.</i> , 2004
pFMTrc12 <i>leuO</i> His	Derivado de pFMTrc12, contiene el gen <i>leuO</i> bajo un promotor inducible por IPTG, tiene una etiqueta de seis histidinas después del codón de termino del gen <i>leuO</i> .	Fernández-Mora <i>et al.</i> , 2004

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Descripción</b>
S2NcoI-5'	AAGGATAAAACCATGGAAAAGAAAAGTATTGGC	Usado para amplificar el gen de <i>ompS2</i> de <i>S. Typhimurium</i> , a partir del ATG; genera un sitio <i>NcoI</i> .
StmS2B-3'	ATCTGTGCCAGGGATCCGTGCGTCTG	Usado para amplificar el gen de <i>ompS2</i> de <i>S. Typhimurium</i> , a partir del extremo 3'; genera un sitio <i>BamHI</i> .
S1Nco I-5'	AGGGAATACACCATGGACAGAAAAGTTGTG	Usado para amplificar el gen de <i>ompS1</i> de <i>S. Typhimurium</i> ; a partir del ATG genera un sitio <i>NcoI</i> .
StmS1B-3'	CTTTGCGCCGGGATCCGTTATTAATTC	Usado para amplificar el gen de <i>ompS1</i> de <i>S. Typhimurium</i> , a partir del extremo 3'; genera un sitio <i>BamHI</i> .
99ACG-5'	CTGGCAAATATTCTGAAATG	Usado para secuenciar el promotor <i>trc</i> de los plásmidos pCGS1C1 y pCGS2C1 a partir del extremo 5'.
99ACG-3'	CCAAAACAGCCAAGCTTGC	Usado para secuenciar el promotor <i>trc</i> de los plásmidos pCGS1C1 y pCGS2C1 a partir del extremo 3'.
S1StmCG-5'	GAAAACGGCGACGGTTTC	Usado para secuenciar el gen de <i>ompS1</i> del plásmido pCGS1C1 a partir del extremo 5'.
S1StmCG-3'	GCTTAACCCGAAGTCAAAG	Usado para secuenciar el gen de <i>ompS1</i> del plásmido pCGS1C1 a partir del extremo 3'.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 La expresión de la porina OmpS1 de *S. Typhimurium* es inducida por el regulador LeuO

En el primer reporte donde se describió que *S. Typhi*, además de poseer los genes de las porinas mayoritarias presenta dos genes adicionales de porinas, *ompS1* y *ompS2*, los cuales tenían similitud con los de las porinas mayoritarias, se mencionó que el producto de estos genes no se lograban detectar en geles de poliacrilamida, en condiciones de crecimiento estándar de laboratorio (Fernández-Mora, 1995). En trabajos subsecuentes en *S. Typhi*, se estudió la regulación de la expresión de estos genes denominados quiescentes y se describió para ambos zonas de control negativo y de control positivo, río arriba del inicio de la transcripción. Para OmpS1 se encontró que su expresión está reprimida por el regulador global H-NS y que la expresión a partir del promotor 1 (P1) depende del regulador OmpR; mientras que el promotor 2 (P2) es independiente de OmpR. (Valdez-Flores, 2004). En el caso de OmpS2, se encontró que su expresión podía ser inducida en presencia del regulador LeuO, perteneciente a la familia de reguladores LysR (Fernandez-Mora, 2005). Con base en los antecedentes en la regulación de la expresión de los genes *ompS1* y *ompS2* de *S. Typhi*, se inició la exploración de la inducción de estos genes en *S. Typhimurium*.

Primero se trato de inducir la expresión de la porina OmpS2 de *S. Typhimurium* en presencia del regulador LeuO. Para lo cual, la cepa 14028 de *S. Typhimurium* se transformó con el plásmido pFMTrc12*leuO*His y con el vector pFMTrc12 (ver Tabla 2). Las cepas se crecieron en medio LB, la expresión del regulador LeuO se indujo con 100  $\mu$ M de IPTG, y las bacterias se crecieron hasta una  $DO_{590} = 1.0$ .

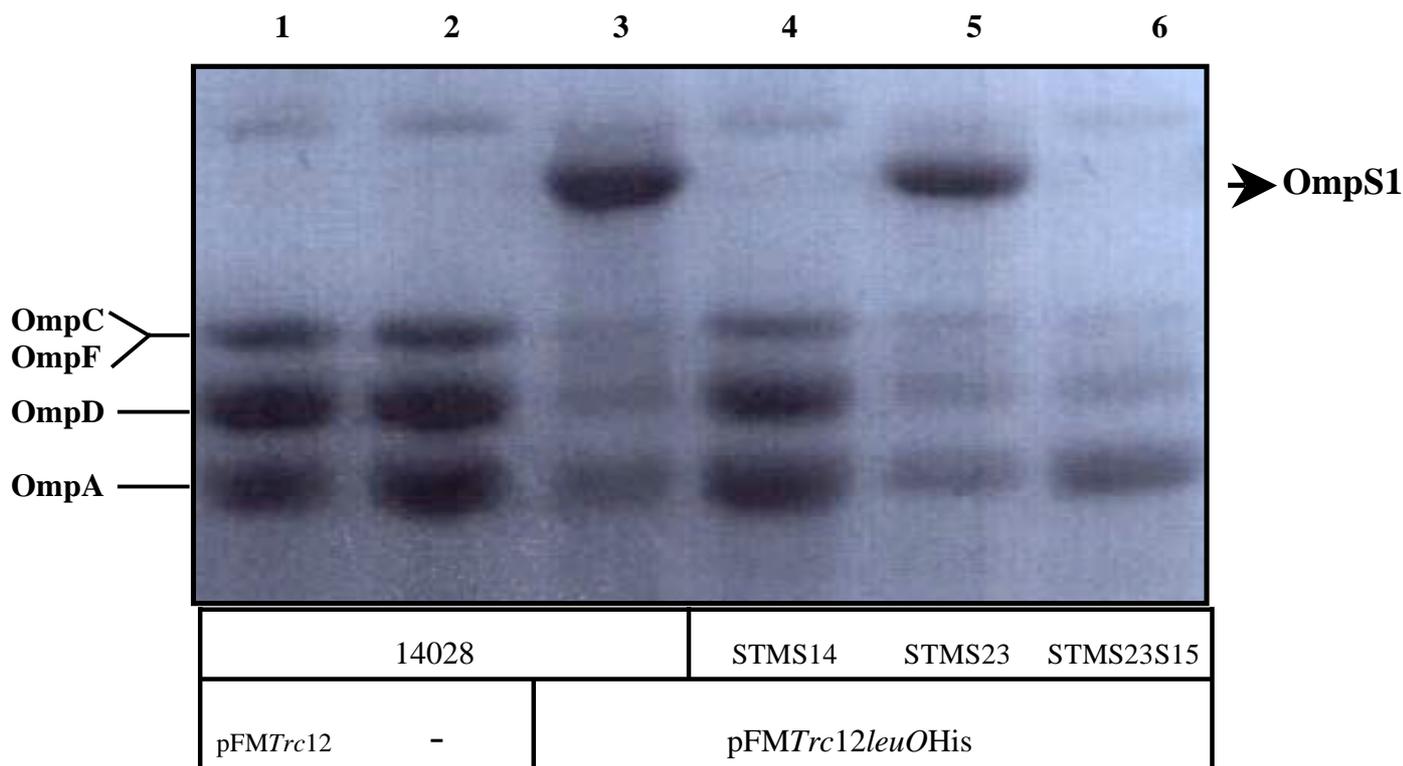
La extracción de PME de las cepas se realizó por el método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991) y el perfil de porinas de la cepa 14028 de *S. Typhimurium* en presencia de LeuO y se evaluó en un gel de poliacrilamida. Esto para verificar si se lograba inducir la expresión de la porina OmpS2 de igual manera como ocurre en *S. Typhi*. En la Fig. 5, se puede observar el triplete correspondiente a las porinas mayoritarias OmpC, OmpF, y OmpD, así como OmpA, características de *S. Typhimurium*. Tal como se esperaba, se puede observar claramente la aparición de una banda que migra en el peso esperado para OmpS2, esto cuando se induce la expresión

del regulador LeuO (Fig. 5, carril, 3). Esta banda no se observa en la cepa silvestre, sin plásmido, o con el vector pFM*Trc*12 (Fig. 5 carriles 1 y 2).

Para comprobar que esta banda correspondía a la porina OmpS2, se evaluó el perfil de porinas de una serie de mutantes derivadas de la cepa 14028. La mutante *ompS2* (cepa STMS23), la mutante *ompS1* (cepa STMS14), además de la doble mutante en *ompS1* y *ompS2* (cepa STMS23S15) (Tabla 1). Al igual que la cepa silvestre, estas cepas mutantes se transformaron con el plásmido pFM*Trc*12*leuO*His, y la expresión del regulador LeuO se indujo con 100  $\mu$ M de IPTG.

Como se puede observar en la Fig. 5, en la cepa STMS14, que carece del gen *ompS1*, la banda que se observa en la cepa silvestre en presencia de LeuO, desaparece (Fig. 5, carril 4). Al analizar la mutante STMS23 en el gen *ompS2*, la banda se mantiene; esto nos indicaba que la banda observada en la cepa silvestre, en presencia de LeuO, pertenece a la porina OmpS1 y no a la porina OmpS2, como se pensó en un principio (Fig. 5, carril 5).

Para verificar los resultados anteriores, se analizó el perfil de porinas de la cepa STMS23S15, que carece de ambos genes, *ompS1* y *ompS2*. En el carril 6 de la Fig. 5, se puede observar que la banda también desaparece y no se logra ver la desaparición de otra banda, la cual nos indicaría la localización de la porina OmpS2.



**Fig. 5. Expresión de la porina OmpS1 en presencia de LeuO.** Electroforesis en SDS-PAGE de las preparaciones de PME de las cepas de *S. Typhimurium* en presencia de LeuO. Carril 1, cepa silvestre con pFMTrc12; carril 2, cepa silvestre; carril 3, cepa silvestre con el plásmido pFMTrc12leuOHis. Carril 4, cepa STMS14 ( $\Delta ompS1::Km$ ); carril 5, cepa STMS23 ( $\Delta ompS2::Km$ ), carril 6; cepa STMS23S15 ( $\Delta ompS1::Cm$ ,  $\Delta ompS2::Km$ ) todas con el plásmido pFMTrc12leuOHis. Las cepas fueron crecidas en medio LB, las muestras fueron tomadas a  $DO_{590} = 1.0$ . La expresión de LeuO, a partir del plásmido pFMTrc12leuOHis, se indujo con 0.1 mM de IPTG.

## VI.2 Proteínas de la membrana externa de *S. Typhimurium*: Caracterización de mutantes

*S. Typhimurium* presenta en la membrana externa tres porinas principales, OmpC, OmpF y OmpD, así como a la proteína OmpA, a diferencia de *S. Typhi* y *E. coli* que presentan solo dos porinas mayoritarias en su membrana externa (OmpC, OmpF) y a OmpA. La regulación de la expresión de las porinas principales ha sido ampliamente estudiada en ambas cepas (Jovanovich *et al.* 1988, Puente *et al.*, 1991, Martínez-Flores, *et al.*, 1999, Liu, X. y Ferenci, T., 2001, Santiviago *et al.*, 2003).

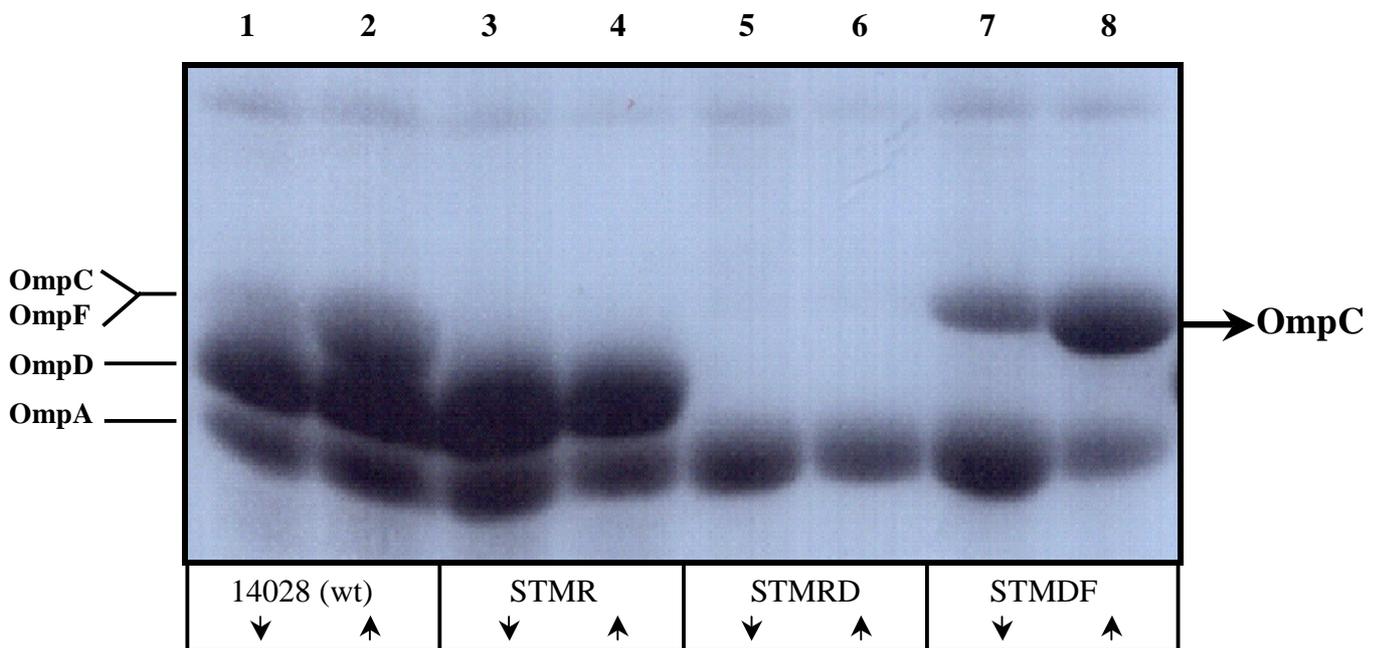
Tanto las porinas mayoritarias como las porinas OmpS1 y ompS2 (quiescentes) requieren del regulador OmpR, aún en presencia del regulador LeuO. Debido a que se pretende abatir la presencia de las porinas mayoritarias, se requiere realizar la remoción del gen que codifica para el regulador OmpR, para eliminar la presencia de OmpC y OmpF que copurifican con OmpS1. De esta manera, es recomendable producir OmpS1 y OmpS2 en un fondo mutante *ompR* y *ompD*, ya que OmpD es muy abundante pero no es regulada por OmpR. Para lo cual se clonaron los genes *ompS1* y *ompS2* en un plásmido con un promotor inducible por IPTG, lo cual los haría independientes de OmpR y de LeuO y se transformó la cepa STMRD ( $\Delta ompR, ompD$ ) (ver Tabla 1).

Para obtener la porina OmpC y descartar a OmpF, se generó una cepa mutante a la cual se le removió el gen que codifica para la porina OmpF; después, a partir de esta cepa mutante, se generó otra remoción del gen que codifica para la porina OmpD (PM, 34 kDa), dando origen a la cepa, STMFD ( $\Delta ompF, ompD$ ) (ver Tabla 1).

Las diferentes cepas fueron crecidas en medio nutritivo de baja osmolaridad (MN) y medio nutritivo de alta osmolaridad (MNN), posteriormente se realizó la extracción de PME por el método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991). Después se analizó el perfil de porinas de cada una de las cepas mutantes generadas para verificar su fenotipo.

En la Fig. 6, se muestra la electroforesis: en los carriles 1 y 2, se observa el triplete característico de porinas presentes de la cepa silvestre 14028. Tanto en baja como en alta osmolaridad, se puede apreciar una banda correspondiente a las porinas mayoritarias OmpC y OmpF, una banda muy abundante correspondiente a OmpD y una tercera correspondiente a OmpA. En los carriles 3 y 4, se muestra el perfil de porinas de la cepa STMR ( $\Delta ompR$ ): en esta cepa se puede observar de manera clara la ausencia de las porinas mayoritarias, OmpC y OmpF, lo cual confirma claramente que la ausencia del regulador OmpR abate la expresión de dichas porinas. Para la cepa STMRD ( $\Delta ompR, ompD$ ), en la cual se pretende expresar las porinas OmpS1 y OmpS2, tal como se esperaba, no se observan las bandas correspondientes a las porinas OmpC, OmpF y OmpD, y sólo se observa la proteína OmpA (Fig. 6, carriles 5 y 6). Con la obtención de esta cepa se logró abatir la presencia de las porinas mayoritarias y se comprobó que la cepa es viable y sólo presentó un retraso en la curva de crecimiento de 2 horas con respecto al crecimiento de la cepa silvestre (datos no mostrados).

También se observa el perfil de porinas de la cepa STMFD ( $\Delta ompF, ompD$ ), en el cual se aprecia una banda correspondiente a la porina, OmpC. La porina OmpC está sujeta a osmorregulación, siendo preferentemente expresada en medio MN de alta osmolaridad (Fig. 6, carril 8), en donde también se aprecia la presencia de OmpA (Fig. 6, carriles 7 y 8). Con el análisis anterior, se pudo caracterizar el perfil de porinas de las cepas utilizadas en este trabajo.



**Fig. 6. Expresión de las porinas en la cepa 14028 y las mutantes derivadas, STMR, STMRD, STMFD, en baja y alta osmolaridad.** Electroforesis en SDS-PAGE, cepa 14028, carril 1-2; cepa STMR ( $\Delta ompR$ ), carril 3 y 4; cepa STMRD, carriles 5 y 6, cepa STMFD, carriles 7 y 8. Las cepas fueron crecidas en baja osmolaridad MN (▼) carriles 1, 3, 5, y 7 y alta osmolaridad MNN (▲), (MN con 0.3 mM de NaCl) carriles 2, 4, 6 y 8; las muestras fueron tomadas a  $DO_{590} = 1.0$ .

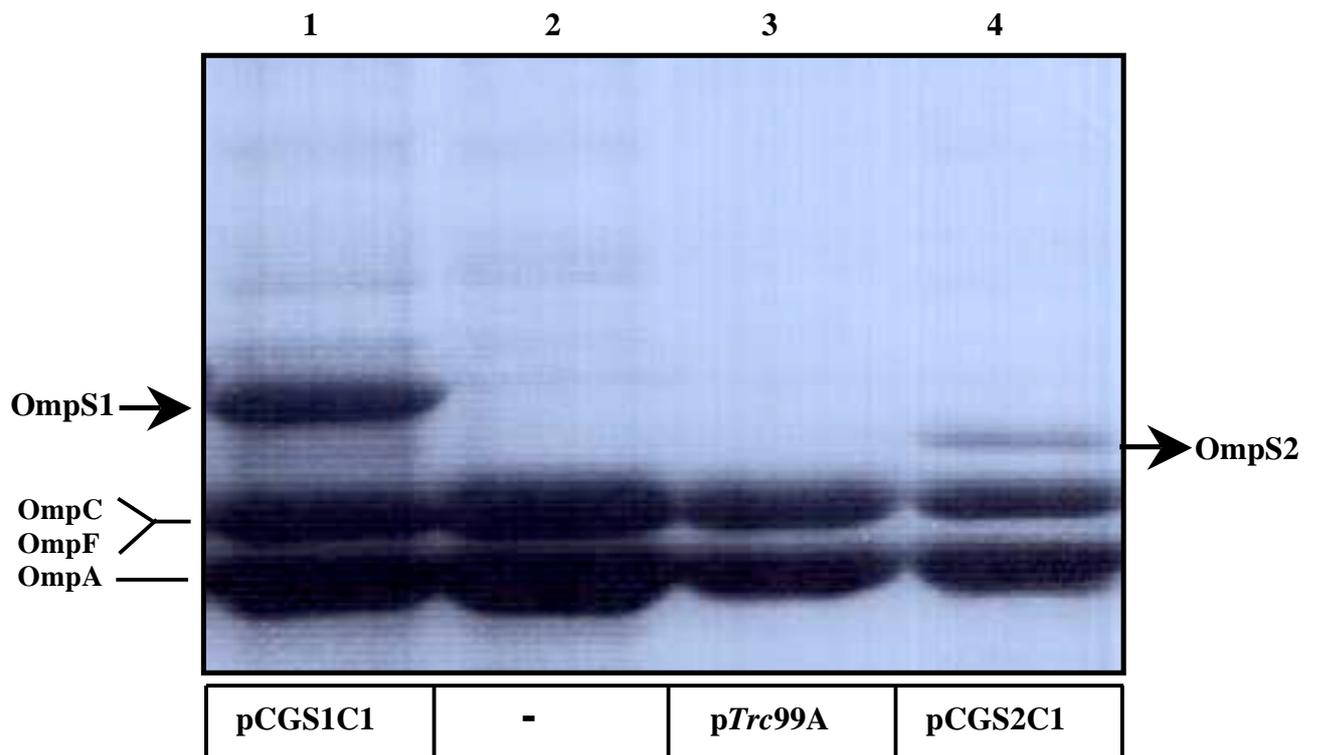
### VI.3 Expresión de OmpS1 y OmpS2 de *S. Typhimurium* en *E. coli*

Para lograr la expresión de OmpS1 y de OmpS2, se procedió a amplificar por la técnica de PCR los genes *ompS1* y *ompS2* de *S. Typhimurium*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes (Tabla 3), y como molde el ADN cromosomal de la cepa silvestre 14028. Los fragmentos generados de la amplificación de los genes *ompS1* y *ompS2* se clonaron en el vector pTrc99A (Tabla 2), en los sitios de restricción de las enzimas *NcoI* y *BamHI*, quedando en fase con el promotor *trc* el cual se induce con IPTG.

Para la obtención de los plásmidos recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli* TOP-10; a las clonas candidatas se les realizó la caracterización de dichos plásmidos por medio de su movimiento electrofórico con respecto al vector y por digestión con enzimas de restricción (*NcoI* y *BamHI*) para verificar que tuvieran el inserto (datos no mostrados). A los plásmidos generados se les dió el nombre de pCGS1C1 (gen *ompS1*) y pCGS2C1 (gen *ompS2*). Una vez que se verificó que las clonas candidatas de la cepa TOP-10 tuvieran los plásmidos recombinantes, se procedió a realizar la caracterización del perfil de proteínas de membrana externa y verificar la presencia de las porinas OmpS1 y OmpS2 en estas preparaciones. Las cepas se crecieron en LB a 37°C, en agitación hasta alcanzar una lectura de absorbancia a D.O<sub>590</sub>= 1.0. La extracción de PME se realizó por el método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991), las preparaciones se analizaron en el sistema de electroforesis SDS-PAGE.

En la Fig. 7 se puede observar el perfil de porinas característico de una cepa de *E. coli*, una banda que corresponde a las porinas mayoritarias OmpC y OmpF y otra banda que indica la presencia de la proteína OmpA. Además se puede observar otras bandas que migran arriba de las porinas mayoritarias; estas bandas migran en el peso molecular esperado para las porinas OmpS1 OmpS2 (Fig. 7, carriles 1 y 4). Estas proteínas sólo se observan en las cepas que tienen los plásmidos recombinantes pCGS1C1 y pCGS2C1, no así en el perfil de porinas de la cepa TOP-10 sin plásmido y la transformada con el vector pTrc99A (Fig. 7, carriles 2 y 3).

Como se puede observar, la porina OmpS1 se expresa de manera abundante; sin embargo, la expresión de la porina OmpS2 es muy baja. Esta diferencia no se explica ya que ambos genes están clonados en el mismo vector de expresión.



**Fig. 7. Expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. Typhimurium* en la cepa TOP-10 de *E. coli*.** Preparación de PME de la cepa TOP-10, con el plásmido pCGS1C1 carril 1; cepa TOP-10 sin plásmido, carril 2; con el vector pTrc99A, carril 3; con pCGS2C1, carril 4. Se observa el perfil de porinas característico de *E. coli*: en una banda, las porinas mayoritarias OmpC y OmpF y en otra banda la proteína OmpA. También se observa la porina OmpS1 y la porina OmpS2, en las cepas que contienen los plásmidos pCGS1C1 y pCGS2C1, respectivamente. Las cepas se crecieron en medio LB, con 0.1 mM de IPTG. La muestra se colecto a D.O.<sub>590</sub>= 1.0.

#### VI.4 Expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 en *S. Typhimurium*

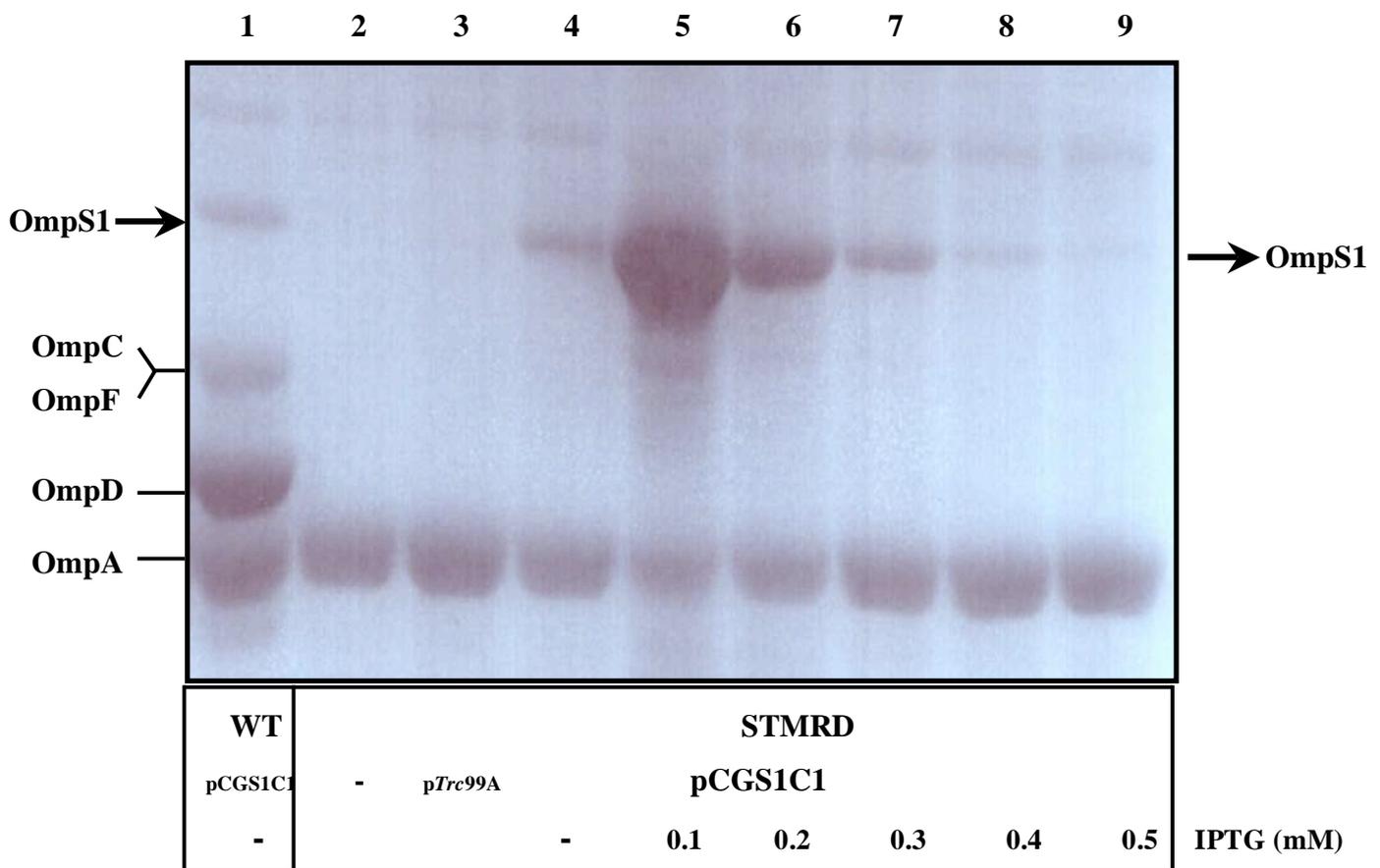
Para los propósitos de este trabajo, se requiere que las porinas OmpS1 y OmpS2 sean expresadas y purificadas a partir de la cepa 14028 de *S. Typhimurium*, ya a que se ha sugerido que los antígenos nativos inducen la mejor respuesta protectora en comparación con los antígenos recombinantes (Isibasi *et al.*, 1994).

Así, los plásmidos generados pCGS1C1 y pCGS2C1, purificados de la cepa TOP-10 de *E. coli*, fueron introducidos por medio de electroporación a la cepa 14028 de *S. Typhimurium*. Se obtuvieron varias clonas candidatas conteniendo los plásmidos recombinantes, de las cuales se eligieron al azar algunas de ellas para la caracterización del perfil de proteínas de membrana externa, y así verificar la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2. Las cepas se crecieron en LB, a 37°C, en agitación hasta una DO<sub>590</sub>= 1.0. Después se procedió a purificar las PME por el método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991), las preparaciones obtenidas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12 %.

En estas preparaciones de PME, se observó que la porina OmpS1 se expresó de manera abundante, de manera muy similar a lo que se observado en la cepa TOP-10 de *E. coli*. Sin embargo, la porina OmpS2 se expresó en mínimas cantidades, aún menores que las observadas en *E. coli* (datos no mostrados). Después se transformó la cepa mutante STMRD ( $\Delta ompR, ompD$ ) de *S. Typhimurium*, con los plásmidos pCGS1C1 y pCGS2C1 para expresar las porinas OmpS1 y OmpS2 y facilitar su separación de las porinas mayoritarias. En la cepa STMRD ( $\Delta ompR, ompD$ ) con el plásmido pCGS2C1, tampoco se observó una expresión abundante que la porina OmpS2, e incluso su expresión es menos abundante que la observada en *E. coli* (Fig. 7) y en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (datos no mostrados). Dado que se requieren cantidades abundantes de la porinas para realizar los ensayos de inmunización, y así evaluar su inmunogenicidad y capacidad protectora, se decidió no utilizar la porina OmpS2 en los experimentos subsecuentes.

Tal como se esperaba en la cepa STMRD ( $\Delta ompR, ompD$ ), transformada con el plásmido pCGS1C1, la expresión de la porina OmpS1 es abundante, de acuerdo a lo observado tanto en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, así como en la cepa TOP-10 de *E. coli* (Fig. 7, carril 1). Para lograr determinar cual es la condición óptima de expresión de la porina OmpS1, se realizó el experimento dicha en medio LB, la expresión de OmpS1 se indujo con diferentes concentraciones de IPTG (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5

mM), se tomaron muestras a  $D.O_{590} = 1.0$ . La purificación de PME se realizó por el método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991), y las preparaciones se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12 %. En la Fig. 8, se puede observar que la porina OmpS1 se expresa aún cuando no se agrega IPTG, pero su abundancia incrementa cuando se agrega 0.1 mM de IPTG. Sin embargo, se observa claramente que cuando se agregan cantidades mayores a 0.1 mM de IPTG, la expresión de la porina OmpS1 va disminuyendo de manera gradual, siendo mucho menor cuando se agrega una cantidad alta de IPTG (0.5 mM).



**Fig. 8. Expresión de la porina OmpS1 en la cepa STMRD de *S. Typhimurium*.** Preparaciones de PME, de la cepa STMRD expresando OmpS1. Carril 1, cepa silvestre con pCGS1C1; carril 2, STMRD; carril 3, STMRD/pTrc99A; carril 4, STMRD/pCGS1C1, sin IPTG; carril 5, 6, 7, 8, 9 y 10, STMRD/pCGS1C1 con diferentes concentraciones de IPTG (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM).

Como referencia del perfil de PME, se incluyó la cepa silvestre 14028, con y sin el plásmido pCGS1C1. En la Fig. 8, carriles 1 y 2, se puede observar las bandas correspondientes a las porinas mayoritarias presentes en *S. Typhimurium*; OmpC, OmpF y OmpD y la proteína OmpA. Además, se puede observar otra banda que migra arriba de las porinas mayoritarias: ésta sólo se encuentra en las preparaciones de PME de las cepas que tiene el plásmido pCGS1C1. Esta banda no se observa en la cepa silvestre sin plásmido o con el vector (p*Trc99A*), la cual migra aproximadamente en el peso molecular esperado para la porina OmpS1 (40 kDa). Con este experimento se logró determinar las condiciones óptimas de crecimiento que permiten la expresión abundante de OmpS1 en la cepa mutante STM RD. Por lo tanto, con esta estrategia se planteó la posibilidad de obtener OmpS1 de manera abundante y sin contaminantes de otras porinas.

#### **VI.5 Purificación de OmpS1 y OmpC por el método de Nikaido**

Para evaluar la capacidad protectora de las porinas, en los ratones, se realizó la purificación de OmpS1 y OmpC por el método de Nikaido, el cual presenta límites de purificación para las proteínas comprendidas entre los rangos de 36–42 kDa. La purificación de porinas por el método de Nikaido está basado en su peculiar característica de formar trímeros resistentes al SDS. Además, las porinas se mantienen asociadas al peptidoglicano por enlaces iónicos, y estos se pueden romper mediante la solubilización con un amortiguador que contenga SDS.

Para la producción de OmpS1 y OmpC, las cepas STM RD/pCGS1C1 y SRMFD, fueron crecidas en un total de 10 litros de medio rico LB a 37°C a 120 rpm. La expresión de OmpS1 se indujo con 0.1 mM de IPTG. Se obtuvieron 20 y 29 gramos de biomasa de las cepas STM RD/pCGS1C1 y STMFD, respectivamente.

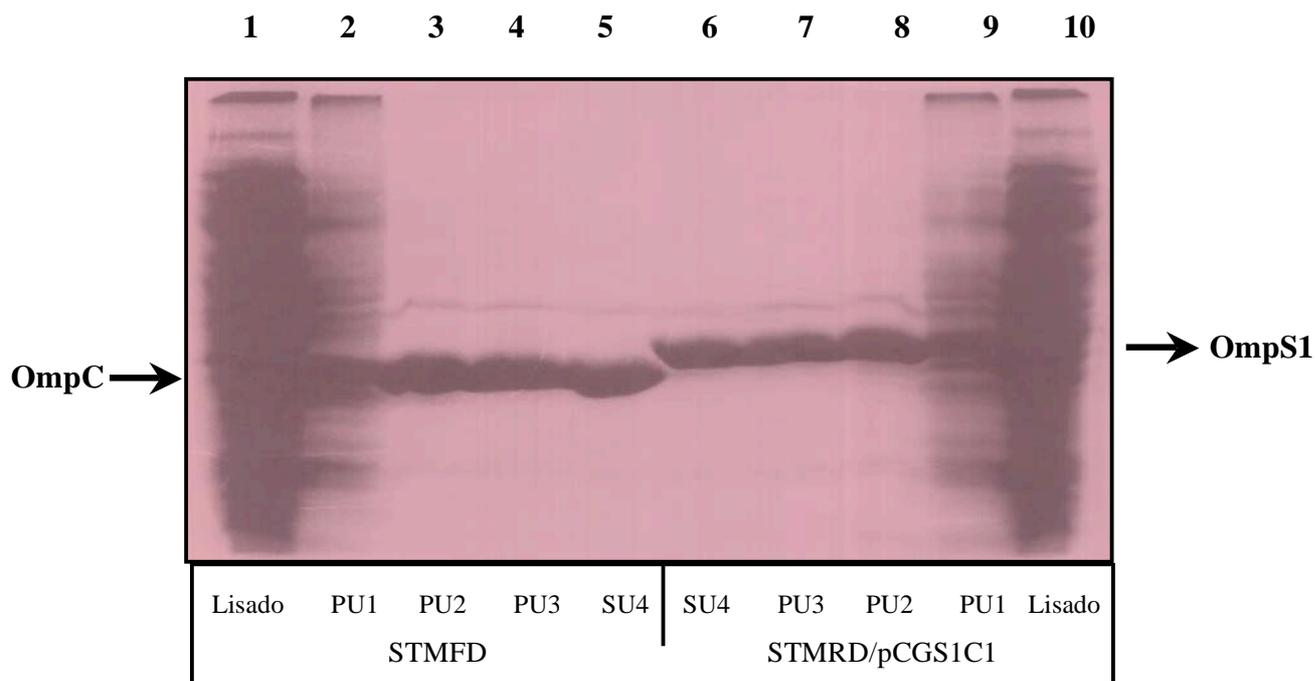
La biomasa obtenida se procesó para la obtención de porinas por el método descrito por Nikaido (ver Métodos). En el paso final de este proceso de purificación se obtuvo 20 ml de sobrenadante de amortiguador de Nikaido, en el cual están la porinas. Para confirmar la purificación de las porinas, se tomaron muestras de los diferentes pasos y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12 %.

En la Fig. 9, se muestran las proteínas purificadas por el método de Nikaido a partir de las cepas STM RD/pCGS1C1 y STMFD. Se analizaron los diferentes pasos de

la purificación, para mostrar como se logran separar las porinas del resto de las proteínas presentes en el extracto total, a partir del cual se inició la purificación. Los carriles 1 al 5 corresponden a la cepa STMFD, de la cual se obtuvo OmpC; el carril 1 es el lisado de la cepa y los demás corresponden a las pastillas que se obtuvieron en los diferentes pasos de la purificación, siendo el carril 5 el sobrenadante recuperado en el último paso, donde se obtienen las porinas. Los carriles del 6 al 10 corresponden a la cepa SRMRD/pCGS1C1; el carril 10 corresponde al lisado total del cual se realizó la purificación. Los carriles del 6 al 9 corresponden a diferentes pasos en la purificación, siendo el carril 6 el que corresponde al último paso, del cual se recuperan 20 ml de sobrenadante en donde se encuentra la porina OmpS1.

Como se puede observar en la Fig. 9, se parte de un lisado que contiene una cantidad indefinida de proteínas; el análisis de los diferentes pasos de la purificación nos permite observar como se va limpiando la preparación. Sin embargo, en el último paso donde se recupera el sobrenadante y solo contiene a la porina, se pueden observar otras bandas (de las cuales se hablará más adelante) que son de mayor y menor peso molecular que las porinas OmpS1 y OmpC.

Aún cuando se obtuvieron algunas proteínas contaminantes, es evidente que para el caso de la porina OmpS1, no se observan las porinas mayoritarias, OmpC, OmpF y OmpD. Para el caso de la preparación de OmpC, no se encuentra OmpF u OmpD y en ambas preparaciones no se observa la presencia de la proteína OmpA (Fig. 9).

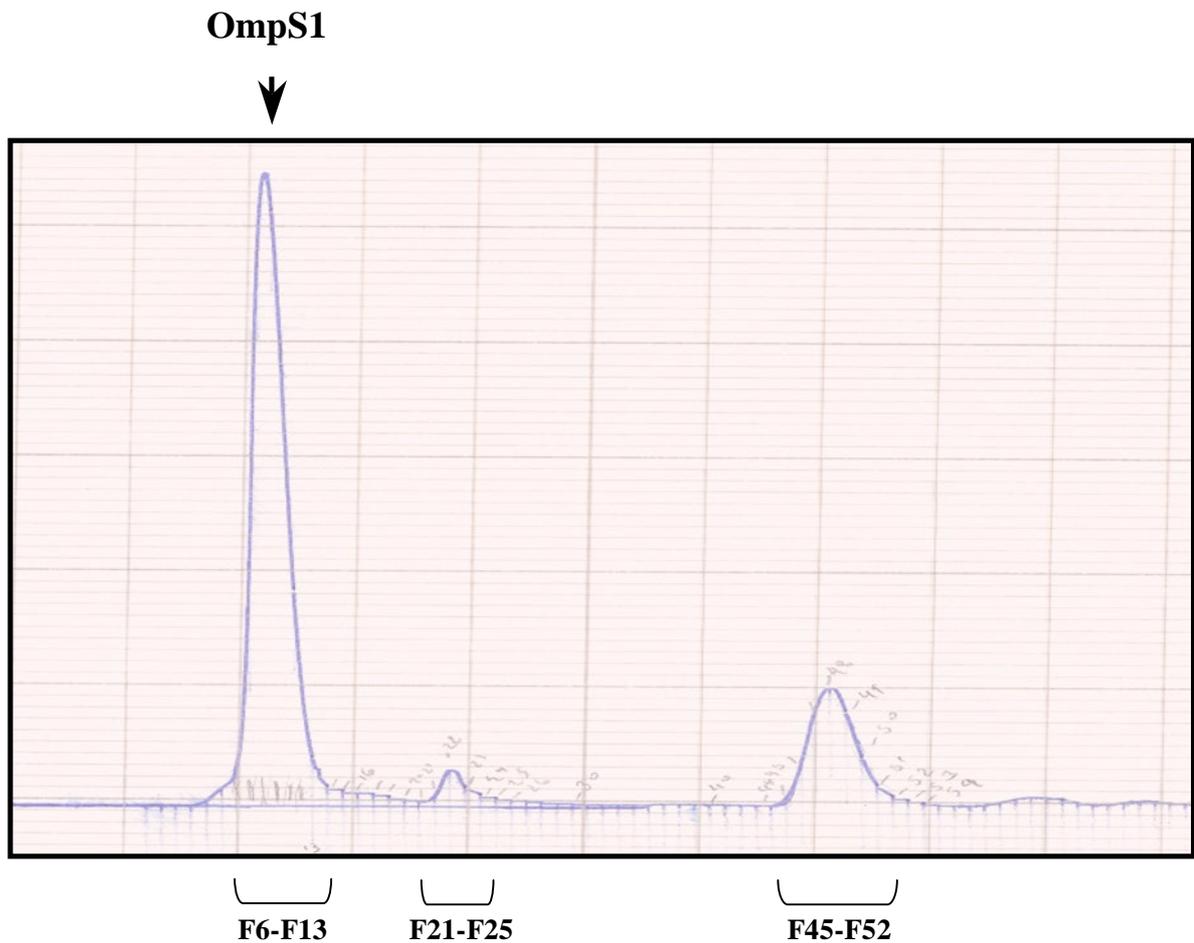


**Fig. 9. Purificación de las porinas OmpC y OmpS1 por el método de Nikaido.** Se muestran diferentes pasos del procedimiento; los carriles 1-5 corresponden a la cepa STMFD y los carriles del 6-10 corresponden a la cepa STMRD/pCGS1C1. Carril 1 y 10 lisado total de ambas cepas; los carriles 2-4 y los carriles del 7-9, muestras de precipitados de las ultracentrifugaciones (PU) del proceso de purificación, de las cepas STMFD y STMRD/pCGS1C1, respectivamente. El carril 5 y el carril 6 corresponden al sobrenadante (SU4) del último paso de la purificación en donde se recupera la porina OmpC y la porina OmpS1. Las cepas fueron crecidas en medio LB, y la expresión de OmpS1, se indujo con 0.1 mM de IPTG.

## VI.6 Purificación de OmpS1 y OmpC por cromatografía de exclusión molecular

Una vez que se obtuvieron las porinas por el método de purificación de Nikaido, se procedió a realizar la purificación por cromatografía de exclusión molecular, con lo que se pretendió excluir a las otras proteínas de la membrana presentes en la purificación (Fig. 9). Además, con este proceso de purificación se logra quitar la mayor cantidad del LPS, el cual está unido a las porinas. Para la purificación de las porinas por cromatografía de exclusión molecular, el sobrenadante de 20 ml que se obtuvo del último paso del método de Nikaido, se inyectó a la columna de Sephacryl S-200 (2.6 y 60 cm). Para recuperar las porinas se aplicó un flujo constante de 0.3 ml por minuto del

amortiguador de Nikaido, 0.5 % de SDS, utilizando un minicromatógrafo AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech). Se colectaron fracciones de 4 ml, obteniéndose 80 fracciones totales, para ambas muestras de porinas.

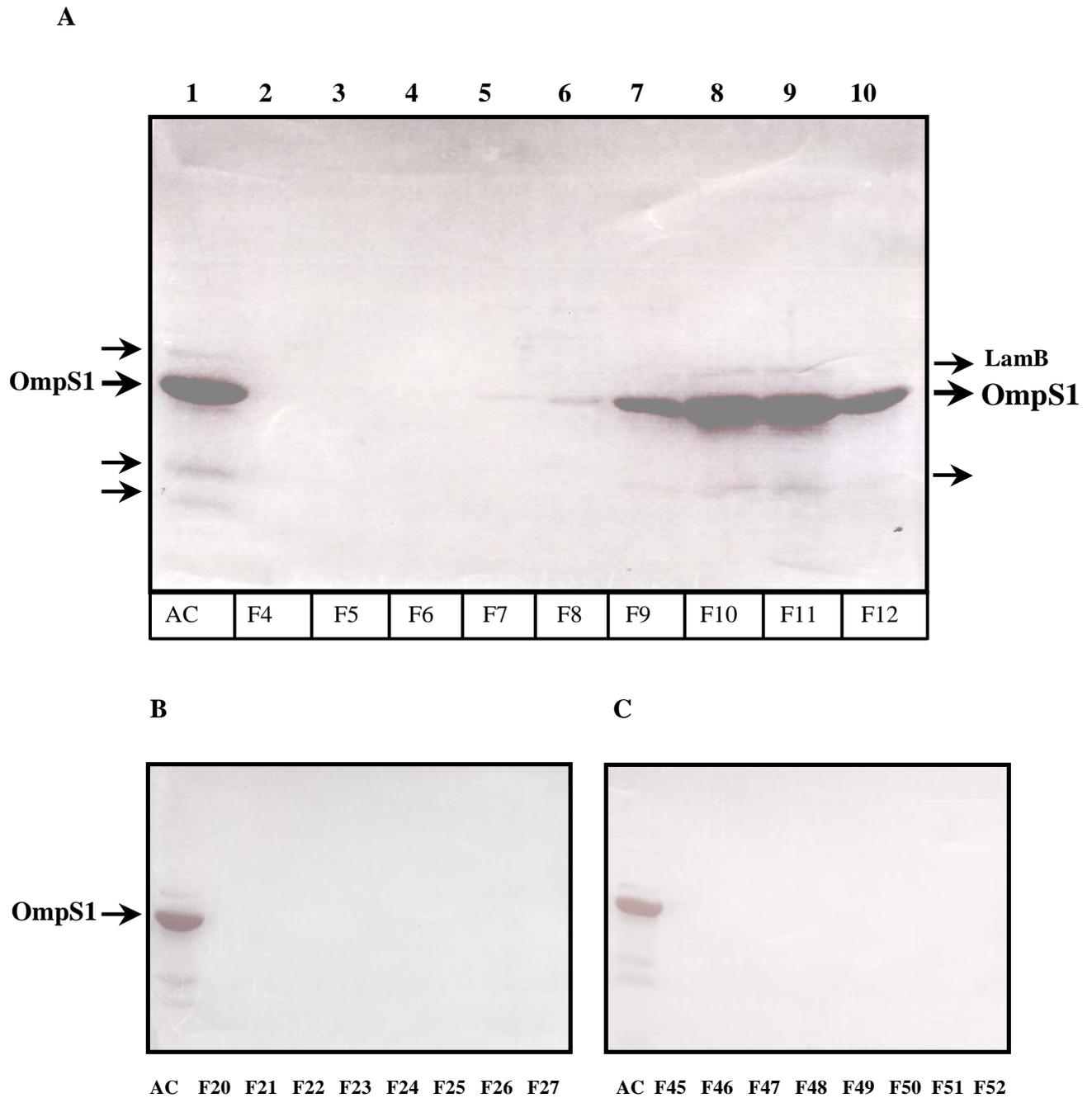


**Fig. 10. Gráfica obtenida de la purificación de OmpS1 por cromatografía de exclusión molecular.** Se utilizó una columna Sephacryl S-200. En la gráfica se pueden observar tres picos; el primero corresponde a las fracciones 6 a la 13. El segundo pico corresponde a las fracciones 21 a la 25 y el tercero a las fracciones 45 a la 52.

La Fig. 10 muestra la gráfica correspondiente a la purificación de la porina OmpS1 por la columna de Sephacryl S-200. En ella se observan tres picos: el primero es muy pronunciado y corresponde a las fracciones de la 6 a la 13; los otros dos picos, mucho menos pronunciados, corresponden a las fracciones 21 a 25 y 45 a la 52. Para determinar cual es el pico que contiene a las porinas, las fracciones correspondientes a los tres picos fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 12 %.

En la Fig. 11 A, se muestra el gel donde se analizaron las fracciones colectadas, correspondientes al primer pico: se incluyeron desde la fracción 4 hasta la fracción 12 (F4 a F12). El carril corresponde a la muestra antes del paso por la columna de Sephacryl-S200; como se mencionó anteriormente, en esta muestra se observan unas bandas que migran tanto arriba como por debajo de la proteína de interés, en este caso OmpS1. Se puede observar que es en las fracciones 9 a la 12 donde aparece una banda que corresponde al peso molecular esperado para OmpS1, de 41 kDa (Fig. 11 A). El análisis de las fracciones obtenidas en el primer pico nos muestra que se pudo obtener la porina OmpS1 abundantemente. Sin embargo, las proteínas que se observaban antes del paso por la columna aparecen nuevamente en las fracciones donde se encuentra la porina OmpS1.

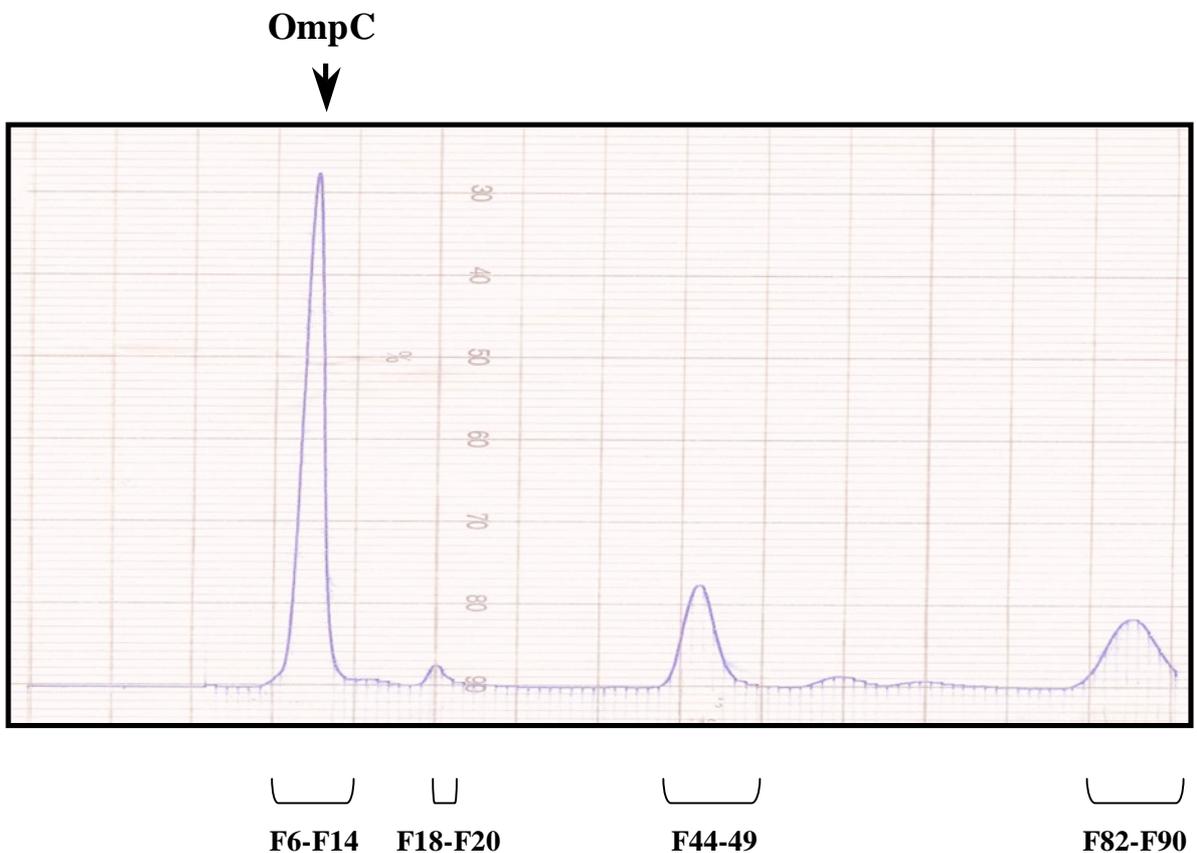
En la Fig. 11 B y 11 C, se analizaron las fracciones correspondientes al segundo y tercer pico, respectivamente, que aparecen en la gráfica de la purificación por exclusión molecular de la porina OmpS1 (Fig. 10). En los geles se puede observar que en estas fracciones no hay proteínas, al menos cercanas no de tamaños cercanos a las porinas.



**Fig. 11. Análisis de la porina OmpS1 obtenida por cromatografía de exclusión molecular.** Electroforesis de la purificación de porinas de la cepa STMRD/pCGS1C1, por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200. A; del carril 2 al 9 se muestran las fracciones, F4 a F12, correspondientes al primer pico. B; electroforesis de las fracciones 20 a 27, correspondientes al segundo pico. C; electroforesis de las fracciones 45 a 52, correspondientes al tercer pico (Fig. 10). El primer carril, corresponde a la muestra de porinas antes de la purificación por la columna de exclusión molecular (AC).

## Purificación de OmpC por Cromatografía de exclusión molecular

La porina OmpC se obtuvo partir de la cepa STMFD (Tabla 1), de la cual previamente se hizo la caracterización del patrón de PME (Fig. 2). La cepa se creció en medio LB, el cual representa mediana osmolaridad y en el que se ha observado un crecimiento óptimo de las todas las cepas utilizadas en este trabajo. De igual manera que lo descrito para la porina OmpS1, se realizó la purificación de la porina OmpC por el método de Nikaido (Fig. 9). La muestra obtenida de 20 ml la cual contiene a la porina OmpC se purificó por cromatografía de exclusión molecular.



**Fig. 12.** Gráfica obtenida de la purificación de OmpC por cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó una columna Sephacryl S-200. En la gráfica se pueden observar cuatro picos; el primero correspondiente a las fracciones 6 a la 14. El segundo pico corresponde a las fracciones 18 a la 20, el tercero a las fracciones 44 a la 49, y un cuarto pico de la fracciones 82 a la 90.

En la Fig. 12, se muestra la gráfica que se obtuvo de la purificación de las porina OmpC por la columna de Sephacryl S-200. En ella se observan cuatro picos: el primero correspondiente a las fracciones 6 a la 14, el segundo a las fracciones 18 a 20, el tercero a las fracciones 44 a las 49; además de otro pico en la fracción 82 que abarca hasta la fracción 90.

Las fracciones obtenidas por el paso de la preparación de porinas se colectaron y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %. En la Fig. 13 A, se muestran las fracciones correspondientes al primer pico, F6 a F14. En el carril 1 se muestra la purificación de porinas antes de la purificación por la columna Sephacryl S-200. En este gel se observó la aparición de una banda muy abundante que migra en el peso esperado para la porina OmpC; esta proteína se desprende en las fracciones 8 a la 12, siendo la 9, 10 y 11 donde se encuentra más concentrada. De manera similar a lo observado para la OmpS1, OmpC no se logró separar de las otras proteínas que aparecen por arriba y por abajo. Sin embargo, en las fracciones 9, 10 y 11, donde se tiene en mayor concentración a OmpC, se observan que ya no están presentes unas bandas de pesos moleculares muy altos, aunque todavía se puede observar la misma banda que aparece en la purificación de OmpS1, con un peso aproximado de 50 kDa.

En la Fig. 13 B, se analizaron las fracciones correspondientes al segundo pico, de las fracciones de la 18 a la 20 y también las fracciones correspondientes al tercer pico, de la 44 a la 49. En la Fig. 12 C, se presentan las fracciones correspondientes al cuarto pico que abarcan de la fracción 82 a la 90. En ambos geles, el carril 1 corresponde a la muestra antes de la cromatografía por exclusión molecular. Como lo sucedido con la purificación de OmpS1, se puede observar que en las fracciones correspondientes al segundo, tercer y, en este caso, cuarto pico, no se observa la presencia de ninguna otra proteína, tanto arriba como por debajo de la banda que corresponde al peso de OmpC.



Las purificaciones de las porinas OmpS1 y OmpC por la columna Sephacryl-S200 mostraron un comportamiento similar, obteniéndose en el primer pico. Los otros picos que se pudieron observar en la gráfica probablemente corresponden a péptidos presentes en la preparación de porinas. Además se pudo observar que en ambas purificaciones, tanto de OmpS1 como de OmpC, la presencia de una banda relativamente abundante (más que las otras proteínas contaminantes) desde la purificación por el método de Nikaido e incluso después de la purificación por cromatografía de exclusión molecular. Esta proteína que migra en un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, era desconocida cuando se realizaron estos experimentos y su caracterización fue necesaria como se describe más adelante, debido a su relativa abundancia en ambas preparaciones de porinas (Fig. 9, Fig.11 A, Fig. 13 A).

El análisis de los geles indica que las porinas de interés OmpS1 y OmpC se obtuvieron de manera abundante. Se cuantificó la concentración de proteínas en ambas purificaciones, antes y después de su paso por la columna. Por el método de Nikaido se obtuvieron 4.0 y 5.0 mg/ ml de proteína y después del paso por la columna se obtuvieron 2.0 y 2.5 mg/ ml para OmpS1 y OmpC, respectivamente.

Además, se procedió a secuenciar las proteínas obtenidas después de la purificación. La secuenciación se realizó por LC-MS/MS en el Servicio de identificación de proteínas en Unidad de proteómica, UPRO-IBT. Los resultados de la secuenciación fueron los esperados y revelaron que la proteína que se obtuvo en las fracciones 9 a la 12 de la Fig. 10 A, corresponde a la porina OmpS1 de *S. Typhimurium* y que la banda que se observa en las fracciones 9 a la 12 de la figura 13 A, corresponde a la porina OmpC de *S. Typhimurium* en ambos casos (datos no mostrados).

Como se mencionó anteriormente, en ambas purificaciones se observaron otras bandas de mayor y menor peso molecular: la de mayor interés es la más abundante, que migra en un peso molecular aproximada de 50 kDa. Esta proteína desconocida también fue secuenciada por LC-MS/MS (Servicio de identificación de proteínas en Unidad de proteómica, UPRO - IBT). Este análisis reveló que la proteína corresponde a LamB de *S. Typhimurium*.

## VI.7 Evaluación de la capacidad protectora inducida por la porina OmpS1

Las porinas de *S. Typhimurium* han mostrado inducir protección contra el reto a la cepa virulenta en el modelo de infección en ratón. En estos trabajos, la preparación de porinas estuvo compuesta por dos bandas, una correspondiente a OmpC y OmpF, y otra a OmpD (Kuusi *et al.*, 1979; Udhayakumar y Muthukkaruppan, 1987, 1989; Muthukumar y Muthukkaruppan, 1993; Galdiero *et al.*, 1993, 1998). Sin embargo, el efecto de cada una de las porinas de manera independiente sólo se ha estudiado para las porinas de *S. Typhi*. Así se ha demostrado que al inmunizar ratones, cada una de ellas induce protección, además de que los anticuerpos generados poseen capacidad bactericida, y su presencia se detectó durante toda la vida del ratón (Secundino *et al.*, 2006). Además, la inmunización en humanos con las porinas OmpC y OmpF han mostrado la producción de altos niveles de anticuerpos antiporinas con capacidad bactericida (Salazar-González *et al.*, 2004).

Por tal motivo, para poder evaluar la capacidad inmunogénica de la porina OmpS1, se decidió comparar su efecto protector con respecto a una de las porinas mayoritarias de *S. Typhimurium*. Debido a que el efecto individual de cada una de las porinas de *S. Typhimurium* no se ha evaluado, se decidió evaluar la capacidad de generar protección con la porina OmpC purificada. Esto, en base a los antecedentes respecto a esta porina en *S. Typhi*, donde se mostró que es un antígeno con mayor capacidad en generar protección con respecto a OmpF (Secundino *et al.*, 2006).

A pesar de los resultados inesperados, en donde se obtuvo a las porinas OmpS1 y OmpC con la presencia de algunas proteínas contaminantes como LamB, se decidió hacer una primera evaluación de la capacidad de cada una de las preparaciones de porinas enriquecidas con OmpS1 y OmpC para conferir protección. En este punto cabe mencionar que se realizó un solo experimento el cual se describirá a continuación. El mejoramiento del proceso de purificación de las porinas y las repeticiones del ensayo en el modelo de ratón son objeto de una siguiente etapa del proyecto.

La capacidad de la porina OmpS1 y de la porina OmpC de inducir una respuesta inmune que confiera protección en ratones contra una cepa virulenta de *S. Typhimurium*, fue evaluada utilizando el modelo de ratón infectado con la cepa 14028 de *S. Typhimurium*. El reto se realizó por vía oral, la cual es la ruta natural de infección de *Salmonella*. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad, los cuales fueron inmunizados con 20 µg de la muestra de la porina OmpS1 y de la porina

OmpC. Como control se utilizaron grupos de cinco ratones, inmunizadas con PBS, y retados con las mismas dosis letales, DL<sub>50</sub>. Los grupos de ratones se monitorearon por 28 días posteriores al reto con la cepa silvestre 14028 de *S. Typhimurium* (DL<sub>50</sub>= 10<sup>3</sup>). El esquema de inmunización y reto se realizó como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 4. Esquema de inmunización y reto.**

<b>Día</b>	<b>Inmunización (vía i.p.) 20 µg de porina en 300 ml de PBS</b>	<b>Reto vía oral (DL<sub>50</sub>)</b>
<b>0</b>	Porina OmpS1 Porina OmpC PBS	-
<b>15</b>	Porina OmpS1 Porina OmpC PBS	-
<b>25</b>	-	1, 10 y 100

En la Fig. 14 se muestran los resultados del experimento de protección, donde el índice de protección se define como el porcentaje de sobrevivencia después del reto. La Fig. 14 A muestra las curvas de sobrevivencia de ratones inmunizados con OmpS1, OmpC y PBS, y retados con la dosis letal media DL<sub>50</sub>= 10<sup>3</sup> que se ha determinado para esta cepa en este laboratorio. Las cuentas viables mostraron que se inocularon 2.3X10<sup>3</sup> bacterias. Como se puede observar, los ratones inmunizados con la porina OmpC muestran un 60 % de sobrevivencia; mientras que para el caso de los ratones inmunizados con OmpS1 se obtuvo un 80 % de sobrevivencia. El grupo control inmunizados con PBS, presentó un 20 % de sobrevivencia.

En la Fig. 14 B, se muestran las curvas de sobrevivencia de los ratones inmunizados y retados con 10 DL<sub>50</sub> (2.3X10<sup>4</sup>). En este caso se observa que los ratones inmunizados con OmpC muestran, de igual manera a una dosis de 1 DL<sub>50</sub> (2.3X10<sup>3</sup>) un 60 % de sobrevivencia. Sin embargo, para los ratones inmunizados con OmpS1 y

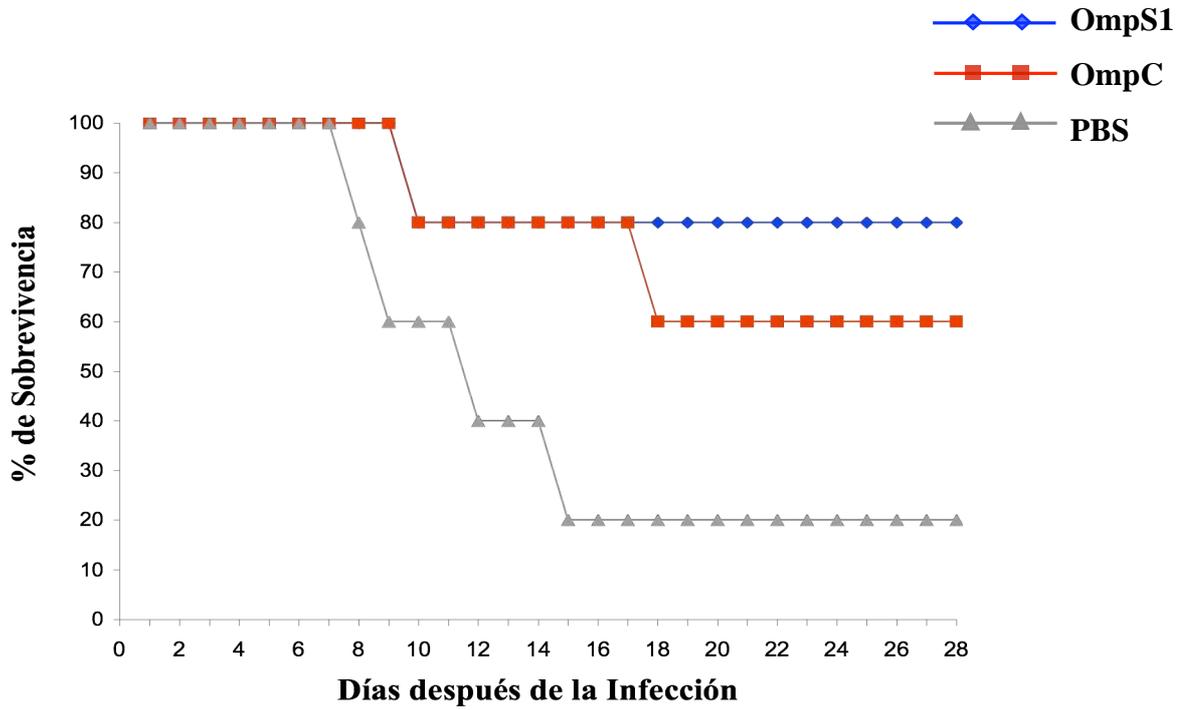
retados con  $DL_{50} = 2.3 \times 10^4$ , se obtuvo 0 % de sobrevivencia, lo mismo ocurrió para el grupo control inmunizadas con PBS.

La Fig. 14 C, corresponde a las curvas de sobrevivencia de los ratones inmunizados y retados con 100  $DL_{50}$  ( $2.3 \times 10^5$ ). Como se puede observar, como era de esperarse, los ratones inmunizados con PBS mostraron un 0 % de sobrevivencia ya que esta es una carga de bacterias con la que los ratones no pueden contender. Sin embargo, para los ratones inmunizados con las porinas OmpS1 y OmpC, también se observó un 0 % de sobrevivencia, indicando que las porinas no pudieron generar una respuesta inmune capaz de ayudar al ratón a contender con esta carga bacteriana.

A pesar de que este es un solo experimento, el trabajo ilustra que las porinas OmpS1 y principalmente OmpC de *S. Typhimurium* son capaces de generar protección en ratones BALB/c retados por vía oral, que es la vía natural de infección, con una cepa silvestre virulenta. Además, con este experimento se logró comprobar que la porina OmpC confiere aproximadamente un 60 % de protección contra el reto de una cepa virulenta, el cual es un nivel muy cercano a lo que se ha reportado para una preparación de porinas compuesta por OmpC, OmpF y OmpD.

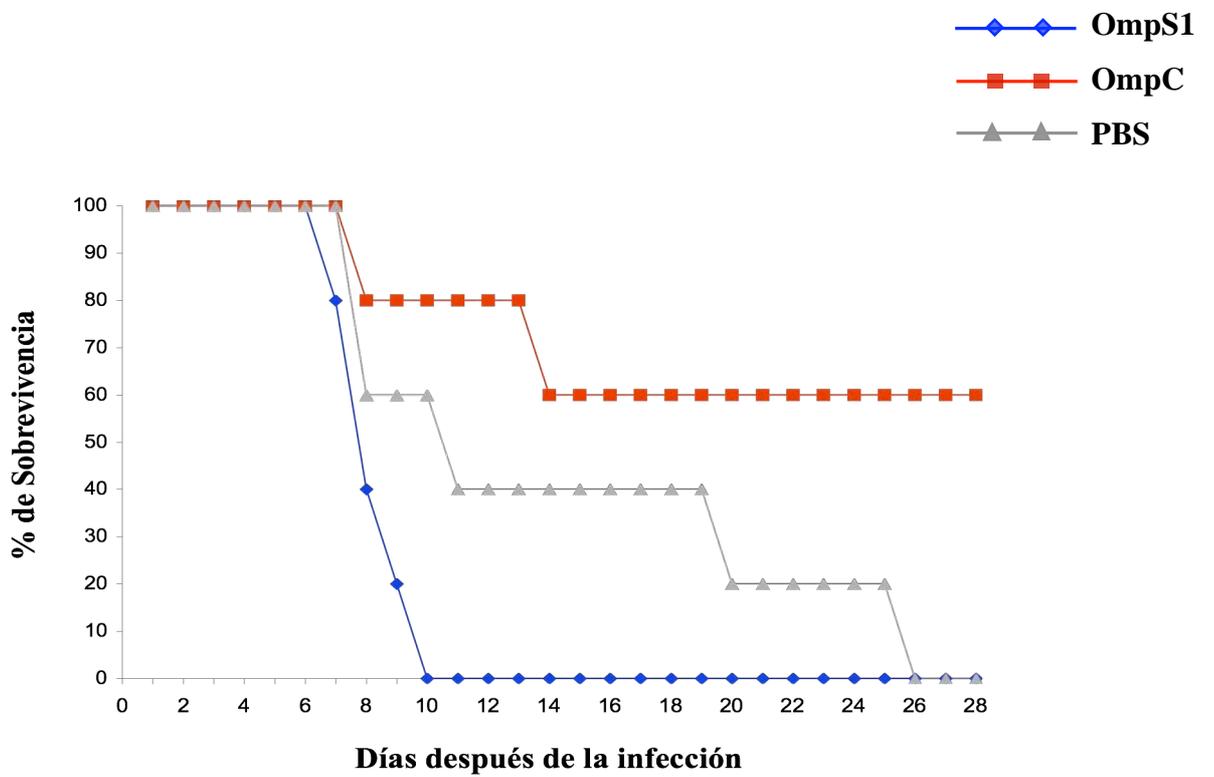
**A**

**RETO: DOSIS  $10^3$**

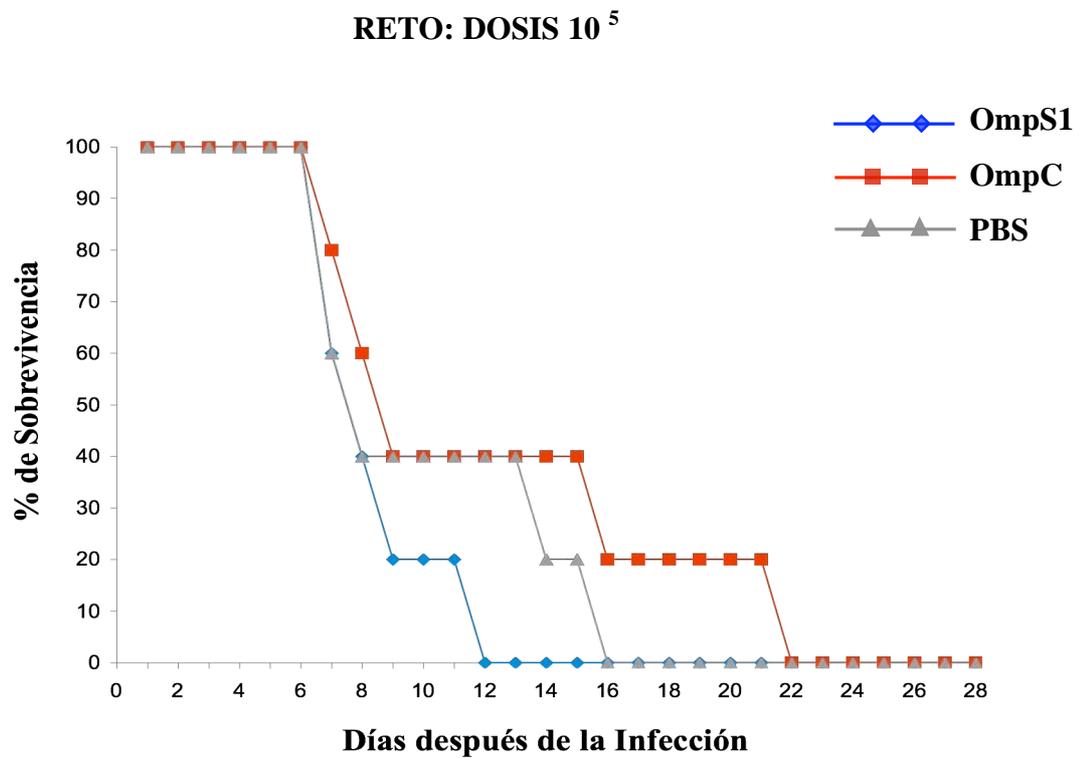


**B**

**RETO: DOSIS  $10^4$**



C



**Fig. 14. Capacidad protectora inducida por las porinas OmpS1 y OmpC de *S. Typhimurium*.** Curvas de sobrevivencia de los grupos de ratones BALB/c, inmunizados con porinas y retados con la cepa virulenta 14028. A, curvas de sobrevivencia de ratones inmunizados con OmpS1, OmpC y PBS, retados con una  $DL_{50}$  ( $2.3 \times 10^3$ ); B, curvas de sobrevivencia de ratones inmunizados con OmpS1, OmpC y PBS, retados con  $10 DL_{50}$  ( $2.3 \times 10^4$ ); C, curvas de sobrevivencia de ratones inmunizados con OmpS1, OmpC y PBS, retados con  $100 DL_{50}$  ( $2.3 \times 10^5$ ).

## VII. DISCUSIÓN

*Salmonella enterica* serovar Typhi cuenta con los genes, *ompS1* y *ompS2*, que presentan gran similitud con las porinas mayoritarias. Sin embargo, las porinas OmpS1 y OmpS2 no se expresan de manera abundante en condiciones estándar de laboratorio (Fernández-Mora *et al.* 1995). En trabajos posteriores, se encontró que la proteína HNS, de unión a ADN, reprime la expresión de OmpS1 y que LeuO regula positivamente la expresión de OmpS2 (Flores-Valdez *et al.*, 2003 Fernández-Mora *et al.* 2004). Estos genes también se encuentran en *S. Typhimurium*, sin embargo la regulación de su expresión no se había estudiado.

Lo que se encontró fue que la remoción de estos genes afectan la virulencia de la cepa 14028 de *S. Typhimurium* en el modelo de infección en ratón (Rodríguez-Morales *et al.*, 2006). Estos resultados indicaban que estas porinas podrían ser importantes para la bacteria durante la infección. Esto también se ha reportado, para las porinas mayoritarias y para el regulador OmpR, donde la remoción de estos genes afectan la virulencia de *S. Typhimurium* (Dorman *et al.*, 1989; Chatfield *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1998). También se sabe que las porinas pueden ser reconocidas por el sistema inmune del hospedero y se ha demostrado que son capaces de generar protección contra la infección de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* en el modelo del ratón (Kuusi *et al.*, 1979; Udhayakumar y Muthukkaruppan, 1987, 1989; Muthukumar y Muthukkaruppan, 1993; Galdiero *et al.*, 1998, 1993; Isibasi *et al.*, 1988; Isibasi *et al.*, 1994; Paniagua-Solis *et al.*, 1995; Secundino *et al.*, 2006).

En base a los antecedentes acerca de la capacidad protectora inducida por las porinas mayoritarias de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, en este trabajo se inició con la inducción de la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 de *S. Typhimurium*. Esto con el propósito de purificarlas y una vez obtenidas utilizarlas para inmunizar ratones y probar su efecto en la protección contra la cepa virulenta 14028.

Al evaluar la inducción de la expresión de la porina OmpS2 de *S. Typhimurium*, en presencia de LeuO; de manera sorprendente, se encontró que en *S. Typhimurium* es la porina OmpS1 la que se induce en presencia de este regulador. Esto se verificó al analizar el perfil de PME de las diferentes cepas mutantes, STMS14, STMS23 y STMS23S15. Donde se observó que efectivamente la banda que aparece en presencia de LeuO, corresponde a la porina OmpS1. Con respecto a la cepa doble mutante la banda también desaparece y no se observó algún indicio de la ubicación de la porina OmpS2

(Fig. 5). La certeza de las diferentes mutantes transformadas con el plásmido pFMTrc12leuOHis, se verificó por medio de PCR (datos no mostrados). Demostrando así, que las cepas mutantes son correctas y que en las condiciones empleadas en este trabajo, la porina OmpS1 de *S. Typhimurium* es la que se induce preferentemente en presencia del regulador LeuO, estableciendo una línea de estudio muy importante que conduce al análisis de la regulación de la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2, la cual parece ser diferente con respecto a lo que se ha reportado en *S. Typhi* (Fernández-Mora *et al.*, 2004).

La diferencia en la expresión de genes entre *S. Typhi* y *S. Typhimurium* no parece ser sólo para las porinas de baja expresión OmpS1 y OmpS2. En el caso de la porina OmpC, en *E. coli* y en *S. Typhimurium* se ha observado que se expresa preferentemente en alta osmolaridad, mientras que en *S. Typhi* la expresión de dicha porina es la misma en alta o baja osmolaridad (Delgado *et al.*, 1993; Puente *et al.*, 1991; Martínez-Flores *et al.*, 1999 y datos no publicados por nuestro laboratorio). Por lo que podemos sugerir que, aunque ambos serotipos son muy similares en relación de su genoma, tienen diferencias en la regulación de la expresión de sus genes. Lo anterior podría explicar de alguna manera la diferencia en patogénesis de *S. Typhimurium* en humanos, comparada con la que provoca en el ratón.

Por otro lado, para evaluar la capacidad de generar protección, se requiere que las porinas OmpS1 y OmpS2 sean expresadas y purificadas en *S. Typhimurium* y así realizar el reto con esa misma cepa. Así mismo se requirió producir grandes cantidades de las porinas, OmpS1, OmpS2 y OmpC, además de separarlas de las otras porinas presentes en la membrana externa de *S. Typhimurium*. Se utilizó como control a la porina OmpC, de *S. Typhimurium*, para poder comparar el papel individual de cada porina. Tomando como referencia lo que se ha hecho para las porinas OmpC y OmpF de *S. Typhi*, en donde se ha demostrado que la porina OmpC induce una respuesta inmune y confiere mayores índices de protección en ratones contra el reto con *S. Typhi*, con respecto a OmpF, (Secundino *et al.*, 2006), además de que se sabe que es un inmunógeno en humanos (Salazar-González *et al.*, 2004).

Para facilitar el proceso de separación de las porinas presentes en *S. Typhimurium*, se generaron diferentes cepas mutantes derivadas de la cepa silvestre 14028. Se comprobó la viabilidad de las diferentes cepas mutantes, realizando curvas de crecimiento donde mostraron un retraso de dos horas con respecto a la silvestre, pero llegaban a presentar lecturas de absorbancia a  $DO_{590} = 1.0$  o más (datos no mostrados).

Las cepas mutantes se caracterizaron por su perfil de PME, utilizando el método de Schnaitman modificado (Puente *et al.*, 1991). Con estos experimentos verificó que la cepa STM RD carece de las porinas mayoritarias y que la cepa STM FD sólo expresa la porina OmpC, la cual es más abundante cuando la cepa es crecida en un medio con alta osmolaridad, MNN (Fig. 6).

Para la obtención de la porina OmpS1, y a pesar de que su expresión se induce en presencia del regulador LeuO, se requiere de la presencia del regulador OmpR. Esto se comprobó utilizando una cepa mutante STM R ( $\Delta ompR$ ), a la cual se le introdujo el plásmido pFMTrc12leuOHis y aún cuando se indujo la expresión del regulador LeuO, la expresión de la porina OmpS1 decreció considerablemente (datos no mostrados). Y para el caso de OmpS2 en *S. Typhimurium*, su expresión no se indujo por el regulador LeuO. Para lograr que los genes *ompS1* y *ompS2*, sean independientes de OmpR y de LeuO y poder ser expresados en la cepa STM RD, dichos genes se clonaron en un plásmido multicopia, donde su expresión se induce con IPTG. Se obtuvieron los plásmidos pCGS1C1 y pCGS2C3, que tienen los genes *ompS1* y *ompS2*, respectivamente y se logró obtener la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 en la cepa TOP-10 de *E. coli*. Se observó que la expresión de la porina OmpS1 es mucho más abundante que la de OmpS2. Esto no se debe a diferencia de carga de muestra, ya que en todos los carriles la proteína OmpA, la cual se utiliza como referencia de carga, se observa de manera similar (Fig. 7). Posteriormente, al analizar la expresión de la porina OmpS2, en la cepa silvestre 14028 y en la cepa STM RD a partir del plásmido pCGS2C1, se observó muy poca expresión (datos no mostrados), al igual que lo observado en *E. coli* (Fig. 7, carril 4). Y cuando se agregó diferentes concentraciones de IPTG (0, 0.1, 0.3, 0.5) su expresión no se indujo de manera abundante y comienzan a aparecer varias bandas de menor peso molecular que OmpS2 (datos no mostrados). La poca expresión de la porina OmpS2 pudiera deberse a que en el proceso de clonación hubiesen sucedido mutaciones tanto en el promotor como en la región estructural del gen y que dichas mutaciones interfirieran con la expresión óptima de la porina. Sin embargo, la secuencia de los plásmidos pCGS1C1 y pCGS2C1, revelaron que ambos genes están clonados en fase y que ni el gen estructural ni los promotores habían sufrido mutaciones. Debido a que estos datos no explican la reducida expresión de la porina OmpS2, existe la posibilidad de que, a pesar de la inducción de dicha porina con IPTG, esta sea poco estable y por lo tanto no se logra exportar eficientemente a la membrana externa, lo que lleva a su posterior degradación. Debido a que se requiere de una

cantidad abundante porina para los experimentos de inmunización no seguir trabajando con la porina OmpS2

Por otro lado, en el caso de la porina OmpS1 de *S. Typhimurium*, esta se logró expresar de manera abundante partir del plásmido pCGS1C1, en cantidades muy similares a la porina OmpD, tanto en la cepa silvestre (datos no mostrados) como en la cepa STM RD (Fig. 8). Se determinó que a partir del plásmido pCGS1C1 la concentración de 0.1 mM de IPTG es la condición óptima de expresión de OmpS1. Además, se observó que la expresión de OmpS1 no aumenta cuando se agregan concentraciones más altas de IPTG. De la misma manera se observó que al sobreexpresar la porina OmpS1, aparece una proteína de menor peso molecular (Fig. 8), pero en este caso es mucho menos abundante que la observada para OmpS2 (datos no mostrados). Con esto se demostró que, a pesar de que estas porinas no se logran detectar en preparaciones de PME de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* en condiciones estándar de crecimiento, los genes son funcionales y sus productos pueden ser transportados a la membrana externa. Sin embargo, es muy notable que existen diferencias en la abundancia de su expresión, por motivos que aún no entendemos.

La aparición de otras bandas cuando las porinas OmpS1 y OmpS2 son sobreexpresadas, puede deberse a que la bacteria comienza a degradarlas. Este fenómeno se ha estudiado en *E. coli*, en donde la sobre expresión de las porinas mayoritarias, OmpC u OmpF, provoca su degradación. Esta degradación es una señal de estrés en la bacteria y la respuesta a esta señal es mediada por factor sigma E ( $\sigma^E$ ). El regulón de este factor sigma incluye chaperonas y proteasas, que tienen su blanco de acción en la envoltura celular y las cuales pueden ayudar a replegar o a degradar proteínas mal plegadas (Ades, 2004).

Una vez que se logró la expresión de las porinas OmpS1 y OmpC a partir de las cepas STM RD/pCGS1C1 y STMFD, respectivamente, se procedió a realizar su purificación por el método de Nikaido por el cual se obtuvieron ambas porinas de manera muy abundante. Sin embargo, a pesar de que se lograron separar de la gran mayoría de las proteínas presentes en la bacteria se observaron otras bandas de mayor y de menor peso molecular en ambas purificaciones (Fig. 9, carril 1 y 5; carril 6 y 10). Este resultado fue inesperado debido a que el método de Nikaido, el cual es exclusivo para extracción de porinas, es muy utilizado en otras cepas. Donde se ha reportado que para *S. Typhi* funciona perfectamente, y se ha logrado la obtención de las porinas mayoritarias sin proteínas contaminantes (Salazar-González *et al.*, 2004; Secundino *et*

*al.*, 2006). Por lo tanto parece ser un fenómeno que se presentó en este trabajo para el caso de *S. Typhimurium*.

Para mejorar la obtención de las porinas obtenidas por el método de Nikaido, se sometieron a la purificación por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Sephacryl S-200. Se verificó que las porinas OmpS1 y OmpC se obtienen en las fracciones correspondientes al primer pico (Fig. 11 A y 13 A). Además, se logró separar una proteína que migra muy arriba en el gel, pero de manera inesperada se observó la presencia de otras proteínas poco abundantes de menor peso molecular y una muy conspicua de un peso molecular aproximado de 50 kDa (Figuras 11 A y 13 A).

Al analizar las fracciones correspondientes a los otros picos que aparecen en ambas graficas, no se observó ninguna proteína que migrará en el peso molecular próximo a OmpS1 y OmpC. Sin embargo, estos picos indican la presencia de proteínas, por lo que pueden corresponder a péptidos presentes en la preparación y que se lograron separar de las porinas (Fig. 11 B, 11C y Fig. 13 B y 13 C). Esto se pudo confirmar al cuantificar la concentración de porinas antes y después del paso por la columna. Se observó que en el proceso de purificación se perdió aproximadamente la mitad de proteína, esto indica que las porinas se separaron de otras proteínas presentes en la purificación por el método de Nikaido. Y a pesar que en el proceso purificación por cromatografía de exclusión molecular, se perdió cierta cantidad de porinas, al final se obtuvieron con gran rendimiento.

Para verificar la identidad de las porinas obtenidas por cromatografía de exclusión molecular y asegurarnos que a partir de las cepas STMRD/pCGS1C1 y STMFD, se obtuvieron OmpS1 y OmpC, respectivamente, estas se secuenciaron por LC-MS/MS en el Servicio de identificación de proteínas Unidad de proteómica, UPRO-IBT. Los resultados mostraron que efectivamente se trataban de las porinas OmpS1 y OmpC de *S. Typhimurium* (datos no mostrados). Respecto a la presencia de una banda 50 kDa, la cual es la más abundante en ambas purificaciones, aun después del paso por la columna, ésta también se mandó secuenciar, los resultados indicaron que se trata de la proteína LamB (datos no mostrados).

Es claro que en el proceso de purificación de las porinas por el método de Nikaido y después por cromatografía de exclusión molecular se presentaron complicaciones técnicas. Por lo cual no se logró obtener las porinas OmpS1 y OmpC de *S. Typhimurium* del todo limpias, por lo tanto se requiere mejorar el protocolo de purificación de porinas para obtenerlas sin proteínas contaminantes.

A pesar de esto, se tenía el interés de saber si las porinas purificadas, OmpS1 y OmpC eran capaces de generar una respuesta inmune y por lo tanto conferir protección contra el reto con la cepa silvestre 14028 de *S. Typhimurium*, en el modelo de ratón. Por lo cual se decidió realizar un experimento con las preparaciones de porinas obtenidas. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, los cuales son sensibles a la infección por *S. Typhimurium*. Se inmunizaron dos veces con 20 µg tanto de la preparación de la porina OmpS1 como de la porina OmpC. El reto fue con la cepa virulenta 14028 de *S. Typhimurium* al día 25 de la primera inmunización (ver Métodos). Los resultados obtenidos del ensayo de protección muestran que, los ratones inmunizados con 20 µg de la porina OmpC presentan un 60 % de sobrevivencia, cuando los ratones son retados tanto con 1 y 10 DL<sub>50</sub> (dosis bacteriana de 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup>). No así cuando los ratones son retados con 100 DL<sub>50</sub> (2.3 x 10<sup>5</sup> bacterias), ya que en este caso ningún ratón logro sobrevivir a la infección (Fig. 14). Los ratones inmunizados con 20 µg de la porina OmpS1 presentaron un 80% de sobrevivencia al reto con la dosis letal media (DL<sub>50</sub> = 2.3 x 10<sup>3</sup> bacterias). Sin embargo, cuando el reto se realizó con 10 y 100 DL<sub>50</sub> (2.3 x 10<sup>4</sup> y 2.3 x 10<sup>5</sup> bacterias), los ratones inmunizados con OmpS1 no sobrevivieron (0 % de sobrevivencia) (Fig. 14). A pesar de que los ratones inmunizados con OmpS1, presentaron niveles de sobrevivencia bajos con respecto a los inmunizados con OmpC, esto resulta interesante ya que no se tenía ningún dato, de esta porina, con respecto a la protección.

La porina OmpC, la cual se utilizó como control, los resultados indican que es capaz de proteger a los ratones contra la infección con la cepa virulenta 14028 de *S. Typhimurium*. En este trabajo la porina OmpC presentó niveles de protección muy similares a los reportados para la preparación de las porinas mayoritarias OmpC, OmpF y OmpD de *S. Typhimurium* (Kuusi *et al.*, 1979; Udhayakumar y Muthukkaruppan, 1987, 1989; Muthukumar y Muthukkaruppan, 1993; Galdiero *et al.*, 1998, 1993). Esto es novedoso, debido a que para el caso de *S. Typhimurium* la capacidad de cada una de las porinas mayoritarias de inducir protección no ha sido estudiada. Por lo que resulta interesante realizar este tipo de estudios para cada una de las porinas mayoritarias, OmpC, OmpF y OmpD, de *S. Typhimurium*.

Estos resultados son preliminares, y se requiere realizar las repeticiones necesarias que nos permitan establecer si la porina OmpS1 es capaz de generar una respuesta inmune en los ratones inmunizados, y por lo tanto, pueda proteger contra el reto con una cepa virulenta. Además, se pueden realizar otros experimentos, de acuerdo

a lo reportado para otros inmunógenos, modificando variables en el ensayo de inmunización para modelos con patógenos entéricos, como son el caracterizar la respuesta inmune generada en el ratón utilizando diferentes concentraciones de antígeno (porina), utilizar adyuvantes, así como probar otras vías de inmunización, como la vía oral o intravenosa (Datta *et al.*, 2006).

Así, en este trabajo se logró establecer que la porina OmpS1 de *S. Typhimurium* se puede expresar de manera abundante y que ésta se puede purificar por métodos utilizados para otras porinas, obteniéndose con un gran rendimiento. Además, se logró establecer un protocolo de inmunización y reto por la vía oral, en el modelo de infección con *S. Typhimurium* en el ratón, la cual es la ruta natural de entrada de la *Salmonella*. Con esto se puede partir para futuras repeticiones del experimento de ensayos de protección.

## VIII. CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró que en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, la porina OmpS1 se induce de manera abundante en presencia del regulador LeuO, no así como sucede, en *S. enterica* serovar Typhi para la porina OmpS2. También se logró expresar de manera abundante a la porina OmpS1 de *S. Typhimurium*, siendo su expresión óptima bajo la inducción con 0.1 mM de IPTG. Sin embargo, no se logró expresar de manera abundante a la porina OmpS2 de *S. Typhimurium*. Las evidencias aportadas en este trabajo sugieren existen diferencias en la regulación de la expresión de las porinas OmpS1 y OmpS2 entre ambos serotipos.

Además, las porinas OmpS1 y OmpC se lograron purificar con gran rendimiento por el método de Nikaido y por cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, en el proceso se copurificaron otras proteínas. A pesar de ello se realizó un experimento de protección; donde la inmunización con la porina OmpC (control), indujo una protección de aproximadamente el 60 %, un nivel muy similar a los reportados para el conjunto de porinas mayoritarias. En este mismo experimento, la porina OmpS1 indujo un 80 % de sobrevivencia de los ratones retados con la dosis letal media. Esto aporta un dato muy importante, para futuras repeticiones del ensayo, acerca de la capacidad de las porinas OmpS1 y OmpC, de manera individual, en conferir inmunidad protectora.

## IX. PERSPECTIVAS

- Con el objetivo de mejorar la purificación de las porinas OmpS1 y OmpS2, se requiere realizar el crecimiento de las cepas en medio mínimo suplementado con glucosa, condición en la cual se inhibe la expresión de LamB. Además de realizar modificaciones en el método de Nikaido para las porinas de *S. Typhimurium*.
- Revisar la purificación de las porinas por cromatografía de exclusión molecular, para lograr separarlas de otras proteínas presentes en la preparación y verificar que en este proceso se logra separar la mayor parte del LPS.
- Una vez que se haya obtenido de manera más pura las porinas, se pueden realizar las repeticiones del ensayo de inmunización y reto. Probar diferentes concentraciones de la porina OmpS1 para lograr establecer si existe una dosis ideal para conferir una mayor protección y una óptima respuesta inmune.
- También se pueden probar diferentes vías de inmunización como la intravenosa, subcutánea u oral, debido a que cada antígeno puede ser más eficiente en inducir una respuesta inmune dependiendo de su vía de inmunización.

## X. APÉNDICE

### Medios de cultivo

<b>LB (ajustar a pH 7.5) *</b>	
Bacto triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g

	<b>MN *</b>	<b>MNN (0.3 mM) *</b>
Bacto caldo nutritivo	7.0 g	7.0 g
Extracto de levadura	1.0 g	1.0 g
Glicerol	2.0 ml	2.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.7 g	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 g	1.3 g
NaCl		10.0 g

	<b>Medio SOB *</b> <b>(ajustar a pH 7)</b>	<b>Medio SOC *</b>
Bacto triptona	20.0 g	2.0 g
Extracto de levadura	5.0 g	0.5 g
Cloruro de sodio (NaCl 5M)	2.0 ml	0.2 ml
Cloruro de potasio (KCl 1M)	2.5 ml	0.25 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	-	1.0 ml
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	-	1.0 ml
Glucosa	-	0.36 g

\*(Cantidades para un litro de agua destilada)

### Enzimas - Endonucleasas de restricción

<i>Bam</i> HI	Invitrogen 20 U/μl
<i>Nco</i> I	Invitrogen 10 U/μl

### Otras Enzimas

Taq polimerasa	Altaenzymes
T4-DNA ligasa	Promega

<b>Antibióticos</b>	<b>Concentración (stock)</b>
Ampicilina (Amp)	200 mg/ml
Cloranfenicol (Cm)	34 mg/ml
Kanamicina (Km)	30 mg/ml
Tetraciclina (Tc)	12 mg/ml

### Amortiguadores

	<b>Tris HCl pH 7.7 *</b>	<b>Tris HCl pH 7.7 SDS 2% *</b>	<b>Amortiguador de Nikaido *</b>	<b>Amortiguador de Nikaido para purificación de porinas (preparación de 4 L)</b>
Trisma Base	6.0 g	6.0 g	6.0 g	12.0 g
SDS	-	20.0 g	10.0 g	20.0 g
NaCl	-	-	23.4 g	46.8 g
EDTA	-	-	1.9 g	3.8 g
β-Mercaptoetanol	-	-	0.5 ml	-

<b>Buffer SET</b>	
Sacarosa	9.0 g
EDTA (0.5 M pH 8)	20.0 ml
Tris-Base (1 M pH 8)	25.0 ml

<b>PBS 10 X *</b>	
Cloruro de Sodio (NaCl)	80.0 g
Fosfato de Sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	6.1 g
Fosfato de Potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.0 g
Acido clorhídrico (HCl)	2.0 g

\*(Cantidades para un litro de agua destilada)

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Ades, S. E. (2004). Control of alternative sigma factor  $\sigma^E$  in *Escherichia coli*. *Cur. Opin. Microbiol.* 7: 157-162.
- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swason, J. A., Miller, S. I. (1994). Salmonellae stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* 179: 601-608.
- Baslé, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J. P., Schirmer, T. (2006). Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J. Mol. Biol.* 362: 933-942.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S., Heffron, F. (1996 a). The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* 64: 61-68.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Heffron, F. (1996 b). The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 93: 279-283.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Heffron, F. (1996 c). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 64: 1862-1865.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J. M. (1997). Acid stress response in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 173-180.
- Benjamín, W. H. Jr., Hall, P., Roberts, S. J. Briles, D. E. (1990). The primary effect of the *Ity* locus is on the rate of growth of *Salmonella typhimurium* is relatively protected from killing. *J. Immunol.* 144: 3143-3151.
- Benner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2465-2467.
- Brown, A. y Hormaeche, C. E. (1989). The antibody response to *Salmonella* in mice and humans studied by immunoblots and ELISA. *Microb. Pathog.* 6: 445-454.
- Buechner, M., Delcour, A. H., Martinac, B., Adler, J., Kung, C. (1990). Ion channel activities in the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1024: 111-121.
- Calderón, I., Lobos, S. R., Rojas, H. A., Palomino, C., Rodríguez, L. H. Mora, G. C. (1986). Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* 52: 209-212.
- Calva, E., Puente, J. L. and Calva, J. J. (1988). Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *Bio Essays.* 9: 173-177.
- Chatfield, S., Dorman, C. J., Hayward, C., Dougan, G. (1991). Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium*: virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* 59: 449-452.
- Chen, C. C., Fang, M., Majumder, A., Wu, H. Y. (2001). A 72-base pair AT-rich DNA sequence element functions as a bacterial gene silencer. *J. Bacteriol.* 276: 9478-9485.

- Collins, F. M. (1974). Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacterial. Rev.* 38: 371-402.
- Cooper, G. L. y Thorns, C. J. (1996). Evaluation of SEF14 fimbrial dot blot and flagellar western blot tests as indicators of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Vet. Rec.* 138: 149-153.
- Cotter, P. A. y DiRita, V. J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: An evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 519-565.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N., Rosenbush, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. Coli* porins. *Nature.* 358: 727-733.
- Cryz, J. S. , Furer, E. , Baron, S., Noon, K. F., Rubin, F. A. y Kopecko, D. J. (1989). Construction and characterization of a Vi-positive variant of the *Salmonella typhi* live oral Pst system. *J. Bacterol.* 171 1531-1534).
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000). One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6640-6645.
- Datta, D. B., Arden , B., Hening, U. (1977). Major proteins of *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J. Bacteriol.* 131: 821-829.
- Datta, S. K., Okamoto, S., Hayashi, T., Shin, S. S., Mihajlov, I., Fermin, A., Guiney, D. G., Fierer, J., Raz, E. (2006). Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immun.* 25: 143-152.
- Delgado, J., Forst, S., Harlocker, S., Inouye, M. (1993). Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for *ompF* and *ompC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 10: 1037-1047.
- Dorman, C. J., Chatfield, S., Higgins, C. F., Hayward, C., Dougan, G. (1989). Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 57: 2136-2140.
- Dunlap, N.E., Benjamin W. H. Jr., McCall R. D. Jr., Tilden, A. B., Briles, D.E. (1991). A 'safe-site' for *Salmonella typhimurium* is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microb Pathog.* 10: 297-310.
- Eckmann, L., Fierer, J., Kagnoff, M. (1996). Genetically resistant (Ityr) and susceptible (Itys) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with *Salmonella dublin*. *J. Immunol.* 156: 2894-2900.
- Edelman, R. y Levine M.M. (1986) Summary of an international workshop on Typhoid Fever. *Rev. Infect. Dis.* 8: 329-349.
- Eisenstein, T. K. (1999). Mucosal immune defense: the *Salmonella typhimurium* model. *Intracellular vaccine vector* (Y. Paterson, ed.) New York: Wiley-Liss. 51-166.
- Fernandez-Mora, M., Oropeza R., Puente J. L., Calva, E. (1995). Isolation and characterization of ompS1, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene.* 158: 67-72.
- Fernández-Mora M. Puente, J. L., Calva, E. (2004). OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* Serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J. Bacteriol.* 186: 2090- 2920.

- Flores-Valdez, M., Puente, J. L., Calva, E. (2003). Negative Osmoregulation of *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacterol.* 185: 6497-6506.
- Fu, Y., Galan, J. E. (1998). A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature.* 401: 293-297.
- Galdiero, G., Cipollaro de L'ero, G., Benedetto, N., Galdiero M., Tufano M. A. (1993). Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 61: 155-161.
- Galdiero, M., De Martino, L., Marcatili, A., Nuzzo, I., Vitiello, M., I'ero, G. C. (1998). Th1 y Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella typhimurium* porins. *Immunol.* 94: 5-13.
- Hancock, R. E. W. (1991). Bacterial outer membranes: evolving concepts. *Features.* 57: 175-182.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Galan, J. E. (1998). *Salmonella typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear response in host cells. *Cell.* 93: 815-826.
- Harrison, J. A., Villarreal-Ramos, B., Harrison, Mastroeni, P., J. A., Demarco de Hormaeche, R., Hormaeche, C. E. (1997). Correlates of protection induced by live Aro- *Salmonella typhimurium* vaccines in the murine typhoid model. *Immunol.* 90: 618-625.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. y Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6602-6606.
- Hess, J., Ladel, C., Miko, D., Kauffmann S. H. (1996). *Salmonella typhimurium* aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J. Immunol.* 156: 3321-3326.
- Hormaeche, C.E., Mastroeni, P., Arena, A., Uddin, J., Joysey, H.S. (1990). T cells do not mediate the initial suppression of a *Salmonella* infection in the RES. *Immunol.* 70: 247-250.
- Hughes, E. A., Galán, J. E. (2002). Immune response to *Salmonella*: Location, location, location? *Immun.* 16: 325-328.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniaga, J., González, C., Moreno, J., Kumate, J. (1988). Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9. 12, d, Vi. *Infect. Immun.* 56: 2953-2959.
- Isibasi, A., Ortiz, V., Paniaga, J., Pelayo, R., González, C. R., Garcia, J. A., Kumate, J. (1992). Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine.* 10: 811-813.
- Isibasi, A., Paniaga, J., Rojo, M. P., Ramirez, M. G., González, C. R., González, C., Lopez-Macias, J., Sanchez, J., Kumate, J., Ortiz-Navarrete, V. (1994). Role of porins from *Salmonella typhi* in induction of protective immunity. *Ann. N. Acad. Sci.* 730: 350-352.
- Jones, B. D. Ghoris, N., Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cell of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180: 15-23.

- Jovanovich, S. B., Martinell, M., Burgess, R. R. (1988). Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170: 534-539.
- Klauck, E., Bohringer, J. (1997). The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol. Microbiol.* 23:559-569.
- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H., Valtonen, M., Makela, P. H. (1979). Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect Immun.* 25: 857-862.
- Levine, M. M. (1999). Typhoid fever vaccines. Vaccines (Plotkin, S. A. y Orenstein, W. A., Ed.). 781- 814. W. B. Saunders, Londres.
- Liang-Takasaki, C. J., Saxen, H., Makela, P. H., Leive, L. (1983). Complement activation by polysaccharide of lipopolysaccharide: an important virulence determinant of *Salmonella*. *Infect Immun.* 41: 563-569.
- Liu, X. y Ferenci, T. (2001). An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and OmpC porin expression under nutrient limitation. *Microbiol.* 147: 2981-2989.
- Makela, P. H. y Hormaeche, C. E. (1997). Immunity to *Salmonella*. Host Response to intracellular pathogens (S. H. E. Kauffmann. ed) Austin, TX: R. G. Landes 143-166.
- Mastroeni, P., Simmons, C., Fowler, R., Hormaeche, C. E., Dougan, G. (2000). Igh-6 *-/-* (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and show impaired Th1 T-Cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect. Immun.* 68: 46-53.
- Mastroeni, P. (2002). Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Curr. Mol. Med.* 2: 393-406.
- McSorley, S. J., Jenkins, M. K. (2000). Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 68: 3344-3348.
- McSorley, S. J., Cookson, B. T., Jenkins, M. K. (2000). Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* 164: 986-993.
- Martínez-Flores, I., R. Cano, V. H. Bustamante, E. Calva., J. L. Puente. (1999). The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 556-562.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresse, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 607-625.
- Meyer, P. N., Wilmes-Reisenberg, M. R., Stathopoulos, C., Curtiss III, R. (1998). Virulence of a *Salmonella typhimurium* ompD mutant. *Infect. Immun.* 66: 387-390.
- Miller, S. I., Kukral, A. M., Mekalanos, J. J. (1990). Constitutive expression of the PhoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J. Bacteriol.* 172: 2488-2490.
- Mittucker, H. W., Kohler, A., Mak, T. W., Kaufmann, S. H. E. (1999). Critical role of CD28 in protective immunity against *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Immunol.* 163: 6769-6776.

- Mittucker, H. W. y Kaufmann, S. H. E. (2000). Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* 67: 457-463.
- Mittucker, H. W., Kohler, A., Kaufmann, S. H. E. (2002). Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 70: 199-203.
- Monack, D.M., Bouley, D. M., Falkow, S. (2004). *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1<sup>+/+</sup> mice and can be reactivated by IFN  $\gamma$  neutralization. *J. Exp. Med.* 199: 231-241.
- Muthukkumar, S. y Muthukkaruppan, V. P. (1993). Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 61: 3017- 3025.
- Nikaido, H. y Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Nikaido, H. (1996). Outer membrane in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Celular and molecular biology. ASM Press, Washinton, D. C. 29-47.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 593-656.
- O'Brien, A. D. y Metcalf, E. S. (1982). Control of early *Salmonella typhimurium* growth in innately *Salmonella*-resistant mice does not require functional T lymphocytes. *J. Immunol.* 129: 1349-1351.
- Ohl, M. E., Miller S. M. (2001). *Salmonella*: A model for Bacterial Pathogenesis. *Ann. Rev. Med.* 52: 259-274.
- Oropeza, R., Sampieri, C. L., Puente, J. L., Calva, E. (1999). Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* 32: 243-252.
- Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A., Garcia-Ortigoza, E., Kumate, J. (1989). Immunoblot detection of clas-specific humoral immune response to outer membrana proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1640-1645.
- Pang, T., Levine, M. M., Ivanoff, B., Wain, J., Finlay, B. B. (1998). Typhoid fever- important issues still remain. *Trends. Microbiol.* 6:131-133.
- Paniagua-Solís, J., Martín-Orozco, N., Ortiz-Navarrete, V., Ramírez, G., González-Bonilla, C., Isibasi, A. (1995). Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Immun. Infect. Dis.*5: 244-249.
- Popoff, M. Y. y Le Minor L. (1997). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovares, 7<sup>th</sup> revision. World Health Organization Collaborating Centre for reference and research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Puente, J. L., Verdugo-Rodríguez, A., Calva, E. (1991). Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity: dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5: 1205-1210.

Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Tukel, C., Akcelik, M., Baumlet, A. J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect. Immun.* 74: 19-27.

Rodríguez-Morales, O., Fernandez-Mora, M., Hernández-Lucas, I., Vázquez, A., Puente, J. L., Calva, E. (2006). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect. Immun* 74: 1398-1402.

Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., Ramírez-Aguilar, Ma. L., Castro-Eguiluz, A. D., Ortiz-Navarrete, V. (2005). Survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within late endosomal-lisosomal compartments of lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infect. Immun.* 73: 3937-3944.

Salazar-González, R. M., Maldonado-Bernal, C., Ramírez-Cruz, N. E., Rios-Saraboia, N., Beltrán-Nava, J., Castañón-González, J., Castillo-Torres, N., Palma-Aguirre, J. A., Carrara-Camargo, M., López-Macias, C., Isibasi, A. (2004). Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Inmunol. lett.* 93: 115-122.

Salcedo, S. P., Noursadeghi, M., Cohen, J. Holden, D. W. (2001). Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strain in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell. Microbiol.* 3: 587: 597.

Santiviago, C. A., Toro, C. S., Hidalgo, A. A., Youderian, P., Mora, G. C. (2003). Global regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium major porin, OmpD. *J. Bacteriol.* 185: 5901-5905.

Secundino, I., López-Macías, C., Cervantes-Barragán, L., Gil-Cruz, C., Ríos-Sarabia, N., Pastelón-Palacios, R., Villasis-Keever, M. A., Becker, I., Puente, J. L., Calva, E. (2006). *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunol.* 17:59-70.

Sein, J., Cachicas, V., Becker, M. I., De Ioannes, A. E. (1993). Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol. Res.* 26: 371- 379.

Schulz, G. E. 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1565: 308-317.

Shi, X., Bennett, G. (1995). Effect of multicopy LeuO on the expression of the Acid- Inducible Lysine Decarboxylase Gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 810-814.

Singh, S. P., Upshaw, Y., Abdullah, T., Singh, S., Klebba, P. E. (1992). Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *J. Bacteriol.* 174: 1965-1973.

Spaun, J. (1964). Studies on the influence of the route of immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. *Bull. W.H.O.* 31: 793-798.

Sztein, M. B., Wasserman, S. S., Tacket, C. O., Edelman, R., Hone, D., Lingberg, A. A., Levine, M. M. (1994). Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Immun.* 25: 1508-1517.

- Udhayakumar, V. y Muthukkaruppan, V. R. (1987). Protective immunity induced by outer membrana proteins of *S. typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55: 816-821.
- Udhayakumar, V. y Muthukkaruppan, V. R. (1989). Protective immunity by porins against *Salmonella* infection in mice. *Indian. J. Med. Res.* 89: 121-127.
- Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki T. Y Mizuno, T. (1998). The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 190-193.
- Valtonen, M. V., Plosila, M., Valtonen, V. V., Makela, P. H. (1975). Effect of the quality of the lypopolisaccharide on mouse virulence of *Salmonella enteritidis*. *Infect. Immun.* 12: 828-832.
- van Valkinburgh, J. C., Gunn, J. S. (1999). PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* 67: 1614-1622.
- Verdugo-Rodríguez, A., López-Vidal, Y., Puente, J. L., Palacios, G. M., Calva, E. (1993). Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 248-254.
- Verhoef, C., Lugtenber, B. , Van-Boxtel, R., De Graaff, P. y Verhei, H. (1979). Genetics and biochemistry of the peptidoglican-associated proteins b and c of *Escherichia coli* k-12. *Mol. Gen. Genet.* 169: 137-146.
- Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., Gros, P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* 73: 469- 485.
- Warren, J., Maestroeni, P., Dougan, G., Noursadeghi, M., Cohen, J., Walport, M. J., Botto, M. (2002). Increased susceptibility of C1q-deficient mice to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 70: 551-557.
- Yrild, U., Svensson, M., Hakansson, A., Chambers, B. J., Ljunggren, H. G., Wick, M. J. (2001). In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 69: 5726-5735.
- Zhou, D., Mooseker, M. S., Galan, J. E. (1999). Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science.* 283: 2092-2095.