



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE LA PORINA OMPD DE
SALMONELLA TYPHIMURIUM**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

PAOLA ALICIA MARTÍNEZ AMADOR



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS
VOCAL: Profesor: MARÍA DEL PILAR GRANADA MACÍAS
SECRETARIO: Profesor: CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS
1er. SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
2º SUPLENTE: Profesor: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. MIREILLE GUTIÉRREZ MENDOZA

(NOMBRE Y FIRMA)

SUSTENTANTE: PAOLA ALICIA MARTÍNEZ AMADOR

(NOMBRE Y FIRMA)

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 El género <i>Salmonella</i>	5
1.2 La salmonelosis no tifoídica	6
1.3 Epidemiología.....	7
1.4 Infección por <i>Salmonellas</i> no tifoídicas.....	7
1.5 Respuesta inmune innata contra <i>Salmonella</i> no tifoídica.....	9
1.6 Respuesta inmune adaptativa contra <i>Salmonella</i> no tifoídica.....	10
1.6.1 Respuesta de linfocitos T.....	10
1.6.2 Respuesta de linfocitos B.....	10
1.7 Proteínas de membrana externa	11
1.8 Porinas de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	13
1.9 Las porinas de <i>Salmonella</i> como antígenos protectores.....	14
1.10 Candidatos a vacunas contra <i>Salmonellas</i> no tifoídicas.....	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVO GENERAL.....	19
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
6. HIPÓTESIS.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 Cepas bacterianas.....	20
7.2 Antígenos.....	20
7.3 Anticuerpos.....	20
7.4 Animales de laboratorio.....	21

7.5	Sueros de ratón.....	21
7.6	Preparación de medios de cultivo.....	21
7.7	Cultivo y obtención de células bacterianas	22
7.8	Obtención de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i> por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ.....	22
7.9	Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA).....	23
7.10	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	24
7.11	Endotoxina bacteriana por el método de lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> (LAL).....	25
7.12	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).....	25
7.13	Inactivación por calor de <i>S. Typhimurium</i> I ₂	26
7.14	Esquema de inmunización.....	27
8.	RESULTADOS.....	28
8.1	Purificación de OmpD: Crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> y obtención de biomasa	28
8.2	Extracción y purificación por cromatografía de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i>	30
8.3	Caracterización de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i>	31
8.4	Evaluación de la capacidad inmunogénica de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i>	32
8.5	Subclases de IgG presentes en los sueros anti-porina OmpD.....	35
8.6	Dosis óptima de inmunización de la porina OmpD.....	35
8.7	Importancia biológica de los anticuerpos anti-OmpD: Capacidad de unión a la bacteria <i>S. Typhimurium</i> inactivada.....	37
9.	DISCUSIÓN.....	39
10.	CONCLUSIONES	46
11.	BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Controles de Calidad del lote purificado L-18103	Pág. 29
----------------	--	----------------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación del género <i>Salmonella</i>	Pág. 5
Figura 2	Estructura de la porina OmpF de <i>E. coli</i> . (A) Vista del trímero de la parte superior, es decir, en una dirección perpendicular al plano de la membrana. (B) Vista de la unidad monomérica de lado, en la dirección de la flecha en el panel A.	Pág. 11
Figura 3	Purificación de la porina OmpD. A) Cinética de crecimiento de OmpD cepa <i>S. Typhimurium</i> I ₂ B) cromatograma de OmpD.	Pág 29
Figura 4	Análisis electroforético de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i> purificada por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ. SDS-PAGE A) Tinción de Coomassie para presencia de proteínas, B) Tinción de Plata para presencia de Carbohidratos.	Pág 32
Figura 5	Diferentes dosis de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i> induce una respuesta de anticuerpos IgG _T e IgM en ratones. (a) Títulos de anticuerpos anti- OmpD de clase IgG _T b) Títulos de anticuerpos anti- OmpD de clase IgM.	Pág 34
Figura 6	Diferentes dosis de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i> induce varias subclases de IgG en ratones. a) Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG ₁ , b) Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG _{2a} , c) Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG _{2b} , d) Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG ₃ .	Pág 36
Figura 7	Diferentes dosis de la porina OmpD de <i>S. Typhimurium</i> induce anticuerpos capaces de reconocer y unirse a la superficie de la bacteria <i>S. Typhimurium</i> .	Pág 38

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Albúmina sérica bovina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
DL ₅₀	Dosis letal 50%
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inunoenzimático en fase sólida
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
ip	Intraperitoneal
kDa	Kilodaltons
LAL	<i>Limulus</i> amoebocyte lysate assay
LPS	Lipopolisacárido
μ g	Microgramos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
nm	Nanómetros
NTS	<i>Salmonellas</i> no tifoídicas
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer de fosfatos salino
PBS-L	PBS + Leche al 5%
PBS-T	PBS + Tween al 0.1 %
PME	Proteínas de membrana externa
PPR	Receptores de reconocimiento de patrones
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella</i> Typhi
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium tipo silvestre ATCC14028
<i>S. Typhimurium</i> I ₂	<i>Salmonella</i> Typhimurium cepa (I ₂)
SCV	Vacuola contenedora de <i>Salmonella</i>
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SSI	Solución salina isotónica
TBS	PBS Tris-Cloro
T _h	Linfocito T helper
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias
UIMIQ	Unidad de investigación médica en inmuoquímica
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

En el presente trabajo, se purificó por primera vez la proteína OmpD de *Salmonella* Typhimurium cepa I₂ (*S. Typhimurium* I₂) por el método de Nikaido modificado. Se evaluó su integridad, rendimiento y pureza; finalmente, se estudió la capacidad de la porina OmpD de inducir inmunidad humoral de larga duración en un modelo de ratón. Se observó que OmpD indujo altos títulos de anticuerpos de memoria, medidos por Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA), prevaleciendo los isotipos IgM e IgG, los cuales se mantuvieron hasta por 260 días (último día analizado) después de la inmunización con la porina OmpD en ratones BALB/c, sin empleo de adyuvante.

La caracterización de las subclases de IgG observadas durante la respuesta primaria y secundaria, mostró la presencia de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃, que son capaces de reconocer y unirse a la superficie de la bacteria completa *S. Typhimurium* I₂. Se inmunizaron tres grupos de ratones con dosis de 1µg, 10µg y 30µg de porina OmpD con el objetivo de establecer la dosis óptima de inmunización en ratones, los resultados mostraron que con 30µg de porina OmpD se genera la mayor cantidad de anticuerpos anti- OmpD de larga duración.

En conclusión, los resultados demuestran la gran capacidad inmunogénica de la porina OmpD para inducir títulos de anticuerpos específicos de larga duración que podrían contribuir al estado de inmunidad contra *Salmonella*; por lo que se podría considerar a la porina OmpD como un componente para formular una vacuna experimental contra la salmonelosis no tifoídica.

ABSTRACT

Here is reported for the first time the purification of OmpD porin from *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) using the method of Nikaido with modifications made by us. Integrity, yield and purity were assessed, and finally the ability of OmpD porin to induce long lasting antibody responses in mice was examined. OmpD immunization without adjuvants induced high titers of long lasting antibody responses, characterized by the presence of IgM and IgG isotypes. The antibody response was observed for 260 days (last day analyzed).

Characterization of the IgG subclasses observed during primary and secondary response, showed the presence of IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgG₃ antibody titres. Furthermore, these antibodies were able to recognize and bind to the surface *S. Typhimurium*. Groups of mice were immunized with 1 µg, 10 µg and 30 µg of OmpD to determine the optimal dose immunization, the results showed that 30 µg dose was the most efficient inducer of long lasting antibody responses.

In conclusion, the results show that purified OmpD porin is highly immunogenic able to induce specific long-lasting antibody titers suggesting that OmpD could contribute to generate immunity against *Salmonella* and therefore could be considered as one of the components for the development of a vaccine against Non-typhoidal Salmonellosis.

1. INTRODUCCION

1.1 El género *Salmonella*

El género *Salmonella* está constituido por bacilos Gram-negativos entéricos, anaerobios facultativos. En la clasificación actual, el género *Salmonella* se divide en dos especies, denominadas *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* se subdivide en seis subespecies, indicadas por nombre o por número romano: *S. enterica* subsp. *enterica* (*S. enterica* subsp. I); *S. enterica* subsp. *salamae* (*S. enterica* subsp. II); *S. enterica* subsp. *arizonae* (*S. enterica* subsp. IIIa); *S. enterica* subsp. *diarizonae* (*S. enterica* subsp. IIIb); *S. enterica* subsp. *houtenae* (*S. enterica* subsp. IV); y *S. enterica* subsp. *indica* (*S. enterica* subsp. VI) (Figura 1).

Cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovares, que son alrededor de 2500, de acuerdo al tipo de antígeno flagelar (H) o somático (O) del LPS [1-3].

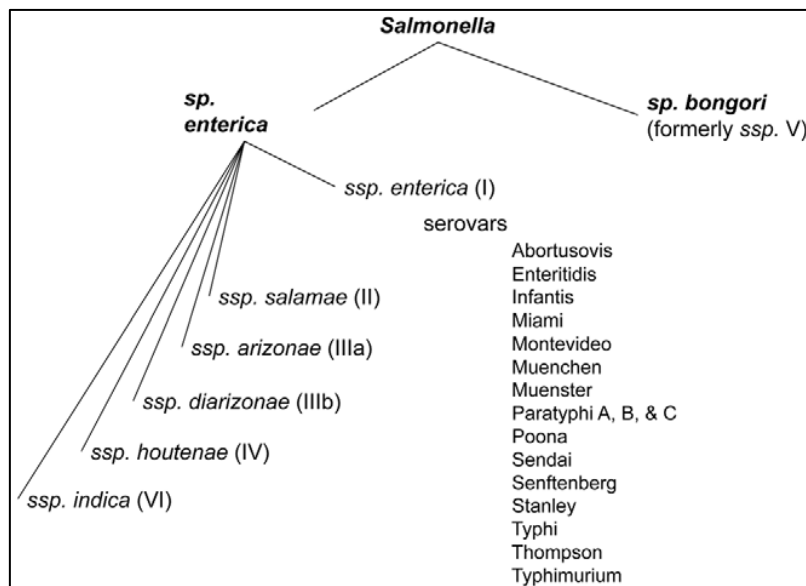


Figura 1. Clasificación del género *Salmonella* (Swearingen, 2012).

1.2 La salmonelosis no tifoídica

Las *salmonellas* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y causan un espectro de enfermedades en el hombre y los animales. En los seres humanos, la salmonelosis incluye varios síndromes tales como fiebre entérica, la gastroenteritis, la septicemia e infecciones focales. El 99% de éstas infecciones son causadas por integrantes de *S. enterica* subsp. I, generando de un alto índice de morbilidad a nivel mundial [1, 2].

Las gastroenteritis son causadas por muchos serotipos considerados *Salmonellas* no tifoídicas (NTS). Los serotipos más comunes de NTS son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* [3]. Este tipo de cepas no generan una infección sistémica, como *Salmonella Typhi* (*S. Typhi*) y *Salmonella Paratyphi A* o *B* causantes de las fiebres entéricas [3]. Sin embargo, recientemente y cada vez con mayor frecuencia se describen brotes de infecciones sistémicas o invasoras causadas por algunos de estos serovares NTS, especialmente en países en vías de desarrollo [4, 5].

NTS invasora es endémica en África Subsahariana, donde es la principal causa de infección del torrente sanguíneo en adultos y niños. El cuadro clínico de la enfermedad por NTS invasiva es: fiebre, hepatoesplenomegalia y neumonía, generalmente con ausencia de enterocolitis. Los factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad son la infección por VIH, malaria y desnutrición. El desarrollo de vacunas dirigida a los principales serotipos de NTS invasoras es prometedora, además de nuevas estrategias de salud pública para prevenir infecciones e interrumpir la transmisión [5, 6].

En México se han presentado cepas de *S. Typhimurium* multirresistentes a antibióticos en pollos, cerdos y bovinos, que son los reservorios más frecuentes de diferentes serovares de *Salmonella*. No se cuenta con vacunas disponibles para estas patologías ya que el uso de antibióticos es la medida más frecuente para controlar a este patógeno, sin embargo, los casos de salmonelosis se han incrementado de manera alarmante ocasionando enfermedades graves y muerte en pacientes lactantes menores de 6 meses [7].

1.3 Epidemiología

El impacto global de *Salmonellas* no tifoídicas en la salud humana es alto, con un estimado de 93,8 millones de infectados, de los cuales 80,3 millones de los casos son cepas NTS transmitidas por los alimentos, y son responsables de 155 000 muertes cada año [8-10].

Se estima que el 1% de las infecciones entéricas producidas por NTS se convierten en bacteremia; no obstante, las estadísticas están muy por debajo de la realidad ya que la mayoría de las infecciones intestinales no se diagnostican adecuadamente [11]. En África la situación es alarmante ya que factores de la población como la alta incidencia de VIH, malaria y desnutrición provocan que alrededor del 25% de los infectados con NTS desarrollen un cuadro mortal [6, 12].

1.4 Infección por *Salmonellas* no tifoídicas

La salmonelosis no tifoídica se adquiere principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados con *Salmonella*. La transmisión zoonótica de *Salmonella* spp. también puede ocurrir a través de la exposición directa a las heces de los reptiles, animales de granja, mascotas, golosinas para mascotas y otros animales [13].

En pacientes inmunocompetentes, la gastroenteritis causada por NTS es una infección que se mantiene localizada en el intestino y ganglios linfáticos mesentéricos, no coloniza el hígado, el bazo ni la médula ósea. El inicio de la gastroenteritis es de 12-72 h con una duración menor a 10 días, y se manifiesta con fiebre, dolor abdominal, náuseas, diarrea y vómitos; el breve curso clínico sugiere el inicio de una respuesta inmune adaptativa resultando en el aclaramiento de la infección [14]. La infección por NTS se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos [15] en el íleon terminal y colon con inflamación que sirve para prevenir la propagación de la infección y promover la liquidación de los patógenos; se propone que las células fagocíticas son las que transportan a la bacteria a los ganglios

linfáticos mesentéricos induciendo una inflamación local por la producción de TNF- α , IL-1 e IL-18 [16]. La combinación de estas citocinas induce un ambiente inflamatorio fuerte en el intestino, que se caracteriza por un aumento de la producción de péptidos antimicrobianos y un reclutamiento de neutrófilos que conduce a la diarrea y la privación de nutrientes, lo que afecta tanto a bacterias comensales como al patógeno [17].

Por el contrario, las cepas causantes de las fiebres entéricas pueden evadir la respuesta inmune de la mucosa intestinal y causar una enfermedad sistémica, posiblemente análoga al cuadro clínico observado en África por la infección de NTS invasiva [6]. Algunos factores de riesgo asociados al huésped que predisponen a la bacteriemia por NTS son: el estado nutricional, edad, enfermedades crónicas, tratamientos con inmunosupresores, cáncer, enfermedades reumatológicas, infección por VIH y defectos congénitos inmunes [3, 18].

NTS invasiva es capaz de evitar el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal. El primer paso para el desarrollo de la enfermedad requiere de la salida de la bacteria del lumen intestinal para llegar a la lámina propia; esto se lleva a cabo por dos mecanismos principales 1) a través de las células M que transportan a la bacteria hacia el lado basolateral por transcitosis; 2) y a través de los enterocitos que cubren las placas de Peyer, donde la bacteria invade formando una vacuola endocítica que pasa a través del enterocito para liberarse en la lámina propia. En este lugar se encuentra con la siguiente capa de defensas inmunes innatas, las células fagocíticas: macrófagos y células dendríticas, cuya función principal es eliminar a las bacterias invasoras por fagocitosis y alertar a otras células del sistema inmune de la infección, ya sea directamente o mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Después de la fagocitosis, *Salmonella* puede establecerse en un compartimento intracelular llamado vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV). En este compartimento, la bacteria es capaz de replicarse a altos números antes de salir de la célula por pyroptosis y liberarse al sistema reticuloendotelial, que es la vía principal por la cual la bacteria llega al torrente sanguíneo (bacteriemia primaria). Posteriormente, los bacilos pueden llegar al hígado

y al bazo, donde se multiplican y se liberan nuevamente al torrente sanguíneo (bacteriemia secundaria) [6, 17, 19-22].

1.5 Respuesta inmune innata contra *Salmonella* no tifoídica

Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago para posteriormente colonizar el intestino delgado donde puede evadir enzimas digestivas, bilis, IgA secretora y péptidos antimicrobianos. La respuesta inmune innata inicia desde el momento en que la bacteria ingresa al tejido epitelial del intestino, redistribuyendo diferentes tipos de células hacia el sitio de la infección en respuesta a quimiocinas y citocinas (TNF- α , IL-2, IL-6) liberadas por las células epiteliales del intestino [22, 23].

Las células fagocíticas son cruciales para la defensa contra *Salmonella*, especialmente los macrófagos/monocitos, neutrófilos, las células dendríticas residentes y las que se reclutan al sitio de la infección [24]. Las señales quimiotácticas liberadas tras la infección provocan el reclutamiento de monocitos y neutrófilos de la médula ósea a la sangre, resultado de la estimulación de TLR-5 por flagelina, que induce la producción de Interleucina IL-8 [25]; posteriormente, estas células se dirigen al sitio de infección [26], las placas de Peyer se agrandan por el infiltrado inflamatorio en cuestión de días, y su arquitectura sufre cambios radicales en la distribución de las células [27].

Las células reclutadas al sitio muestran gran actividad, entre 1-2% de los monocitos y los neutrófilos se asocian con bacterias y juntas estas células fagocitan alrededor del 80% de las bacterias [28]. Se ha observado que monocitos inflamatorios y neutrófilos son eficaces para combatir a *Salmonella* y son los principales productores de TNF- α y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [23] que son moléculas que favorecen la reacción inflamatoria y el control de la bacteria. Sin embargo, existen datos que sugieren que para el control de la infección se requiere la participación orquestada de la inmunidad innata y adquirida [28].

1.6 Respuesta inmune adaptativa contra *Salmonella* no tifoídica

1.6.1 Respuesta de linfocitos T

La infección con *Salmonella* induce una fuerte respuesta de linfocitos T CD4 y CD8, así como de células B que en conjunto contribuyen para establecer inmunidad contra la bacteria [29-31], los ratones deficientes de linfocitos T CD4 son incapaces de controlar la infección [32] mientras que aquellos deficientes de CD8 y linfocitos B logran controlarla, no obstante la transferencia de linfocitos T CD4 de memoria a ratones naïve no logra inducir protección a menos que sea transferida con el suero de ratones inmunes [33].

Se ha observado que en las placas de Peyer, los linfocitos T CD4 específicos para flagelina se activan 3 h posteriores a la infección oral incrementando la expresión de CD69 y la producción máxima de IL-2 ocurre a las 12 h [34]. Esta rápida activación indica que el procesamiento y presentación de antígeno ocurre de manera vertiginosa. Recientemente se ha reportado la importancia de IL-17/IL-23 para el desarrollo de inmunidad contra *S. Typhimurium* y otras bacterias intracelulares en el sentido de que células T CD4 productoras de IL-17 orquestan la respuesta de células de inmunidad innata en mucosas durante la fase inicial de la infección [35]. Se han buscado epítomos restringidos a las moléculas del MHC de clase I [30] y MHC de clase II como el péptido 339-350 de flagelina [36], sin embargo, no se han encontrado epítomos relacionados con protección.

1.6.2 Respuesta de linfocitos B

El papel de los anticuerpos en la protección contra *Salmonella* ha sido un debate constante ya que esta bacteria pasa la mayor parte del tiempo dentro de las vacuolas de células fagocíticas, sin embargo, se ha demostrado que la opsonización de la bacteria impide la colonización de la bacteria *in vivo* [37] y la presentación de antígenos a células T [38, 39].

Se sabe que la respuesta de anticuerpos es muy importante para el control de la bacteria. Análisis del suero de pacientes pediátricos con VIH, en donde la infección tiene una letalidad alta, se demostró la existencia de anticuerpos contra la bacteria, sin embargo, estos no son capaces de provocar la lisis *in vitro* de las bacterias; cuando a los sueros se les adsorbe con LPS, estos son capaces de lograr la lisis de la bacteria y al analizar el antígeno contra el que reaccionan, se determinó que los anticuerpos que provocan lisis bacteriana van dirigidos contra proteínas de membrana externa, lo cual sugiere fuertemente que estas proteínas pueden ser un blanco importante de anticuerpos contra la infección por NTS [40].

1.7 Proteínas de membrana externa

Las porinas son una familia de proteínas formadoras de canales presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas [41], mitocondrias y cloroplastos [4]. Actualmente se conoce que el número de proteínas de membrana externa (PME) es variable y depende de la información genética de la bacteria.

La estructura tridimensional de las porinas es de gran importancia ya que explica muchas de sus propiedades funcionales. Estudios cristalográficos han demostrado que éstas se ensamblan como trímeros (estructura nativa) y cada monómero forma una estructura de barril con 16 ó 18 cadenas que atraviesan la membrana (Figura 2).

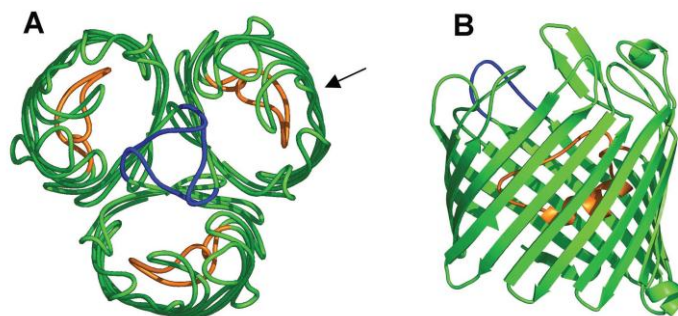


Figura 2. Estructura de la porina OmpF de *E. coli*. (A) Vista del trímero de la parte superior, es decir, en una dirección perpendicular al plano de la membrana. (B) Vista de la unidad monomérica de lado, en la dirección de la flecha en el panel A (Hiroshi Nikaido, 2003).

Las estructuras de las porinas presentan una gran estabilidad ya que tienen una asociación muy estrecha entre trímeros, que genera resistencia a su despliegue en condiciones extremas [42], es por eso que son muy estables al efecto de sales biliares y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas, altas temperaturas y a los reactivos desnaturizantes como el Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS) y urea [42-44]. Secundino y cols. mostraron que la organización estructural de las porinas es importante, inmunizaron ratones con porinas en su forma de trímero y de monómero, y observaron que ambas inducen la producción de anticuerpos, siendo más inmunogénica la estructura de trímero [43].

La expresión de las porinas puede verse afectada por diferentes factores como son las condiciones de cultivo, temperatura, osmolaridad, pH, etc [45, 46]. El perfil de PME se altera cuando las enterobacterias encuentran condiciones adversas durante la infección y supervivencia en el hospedero.

La función de las porinas es la de ser uno de los principales componentes activos de la membrana externa porque funcionan como poros [41] o filtro molecular que permite el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas (nutrientes) al interior de la bacteria como azúcares, aminoácidos, vitaminas y cofactores metálicos [47]. También han demostrado ser una barrera hacia antibióticos, sales biliares, defensinas, etc; así como, receptores de fagos y células B [44, 45, 48].

En 1978 Di Rienzo, Nakamura e Inouye, junto con Osborn y Wu en 1980, efectuaron una clasificación de las PME en principales y minoritarias.

1. Proteínas mayoritarias: a) Proteínas matrices o porinas. Poseen un peso molecular entre 36,000-42,000 Da. Su función es la de participar en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana externa. Como ejemplo de estas proteínas se encuentran OmpC, OmpF, OmpD y PhoE [43, 44]. b) OmpA, esta proteína presenta una estructura nativa en forma monomérica (35,000 Da), es modificable

conformacionalmente al calor; y su función es la de participar en los procesos de conjugación y mantener la integridad estructural de la membrana externa, además puede ser empleada como receptor de bacteriofagos y colicinas [49, 50].

- 2) Proteínas minoritarias. Con respecto a este grupo de proteínas se ha demostrado su función como acarreadores durante el transporte de sustancias de alto peso molecular. Como ejemplo de este grupo de proteínas se encuentran la proteína OMPLA y otras que también poseen actividad de fosfolipasa A.

1.8 Porinas de *Salmonella Typhimurium*

S. Typhimurium expresa tres porinas mayoritarias cuando se cultiva bajo condiciones normales (caldo Lennox o LB a 37 °C): OmpD (34, 40 kDa), OmpF (35 kDa), y OmpC (36 kDa) [51-53]. En conjunto, suman alrededor de 1×10^5 a 2×10^5 moléculas por célula; siendo OmpD la proteína de membrana externa más abundante; representante, aproximadamente, de la mitad de las porinas y del 1% de la proteína celular total [54]. Existen otras porinas como OmpA, TsX, Omp 28 kDa, Vac J, OmpX, OmpW, OmpS1 y la lipoproteína asociada al peptidoglicano, las cuales se expresan en bajas cantidades [55].

A diferencia de las porinas OmpC y OmpF, la expresión de OmpD en la membrana externa no cambia en respuesta a los cambios de osmolaridad (10% de sacarosa o 0,3 M de NaCl) y curiosamente, OmpR que regula la expresión de los genes que codifican para las porinas OmpC y OmpF; no parece regular la expresión de OmpD [56]. La abundancia de OmpD aumenta en respuesta a la anaerobiosis, disminuye en respuesta a un pH bajo y está sujeta a la represión catabólica (adenilato ciclasa y la proteína reguladora de AMP c-íclico), estas condiciones son encontradas durante la infección de su huésped [52-54].

OmpD está presente en todos los serotipos de *S. enterica* con la excepción de *S. Typhi*. Otras bacterias Gram-negativas como *Enterobacter cloacae* [57], *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* [58] también expresan OmpD en su membrana externa. En el caso de *Escherichia coli* (*E. coli*), se han encontrado proteínas homólogas a OmpD como las porinas NmpC (identidad 75%), Lc (75%) y OmpC (70%). En *S. Typhimurium* OmpD tiene un 68% de similitud con la propia porina OmpC [53, 54, 59, 60]. Poco se sabe acerca de la estructura tridimensional de OmpD, salvo que cuenta con dominios que son muy similares a los de la porina OmpF de *E. coli* [61].

Dentro de las funciones fisiológicas de OmpD, están la resistencia al compuesto tóxico metil viológeno, un agente de generación de superóxido y radicales libres de oxígeno; y a la ceftriaxona, ya que un aumento de la porina OmpD genera una reducción en la resistencia a este antibiótico, por lo que puede estar implicado en el flujo de compuestos tóxicos [62]. Además, es probable que OmpD participe en la adhesión de *S. Typhimurium* a los macrófagos [54, 59, 63].

¿Cuál es el papel de OmpD en la infección por *Salmonella*? La porina OmpD no parece jugar un papel importante en la virulencia de *Salmonella*, debido a que los efectos de las mutaciones en éste gen, en la virulencia de *S. Typhimurium*, son sutiles [53, 54, 59]. No obstante, recientemente se ha identificado en ratones que las porinas de *S. Typhimurium*, son el blanco de la respuesta de anticuerpos bactericidas en pacientes infectados con *S. Typhimurium* [56].

1.9 Las porinas de *Salmonella* como antígenos protectores

Los estudios en ratones han demostrado que la inmunización con PME de *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella flexneri* y *Pseudomonas aeruginosa* genera protección contra las infecciones causadas por estas bacterias [64].

Dado que la producción de anticuerpos contra las proteínas es una respuesta inmune de células T-dependiente, las porinas deben activar las células T (CD4+) que liberan

citocinas específicas para células B (IL-4, IL-5 e IL-6), células T (IL-2), y macrófagos (INF- γ). Las interacciones de todas estas células, citocinas, y anticuerpos debe generar un estado de inmunidad protector [65, 66]. Singh y cols. encontraron que la inmunización con porinas provoca ambas respuestas de tipo Th1 y Th2, pero predominantemente el tipo Th1, que se caracteriza por la inducción de la proliferación de linfocitos y la predominancia de IL-2 y de IFN- γ [65].

En el caso de *Salmonella Typhi*, durante el proceso de infección se ha descrito que se generan anticuerpos en el suero de pacientes con fiebre tifoidea dirigidos contra los antígenos O, H, Vi [43, 67]. La ventaja sobre los antígenos polisacáridos es que los antígenos de proteína tienen la capacidad de inducir anticuerpos de mayor afinidad y también provocar la inmunidad celular, lo que podría dar lugar a una protección más larga contra las bacterias [64].

En *S. Typhi*, se ha comprobado que ésta expresa en su superficie dos porinas mayoritarias OmpC y OmpF; y las porinas OmpS1 y OmpS2 las cuales se producen en bajas concentraciones. La porina OmpC de *S. Typhi*, es un homotrímero con 357 aminoácidos y peso molecular de 36 kDa por monómero; que ha demostrado ser un potente inmunógeno que podría emplearse para el diseño de vacunas [41, 42, 45]. Se ha informado que la inmunización de ratones con porinas de *S. Typhi* induce una respuesta de anticuerpos bactericidas para toda la vida [41]. En humanos se encontraron anticuerpos de larga duración de clase IgG (60%), IgM (20%) e IgA (12%) que reconocen de forma específica a las PME de *S. typhi* [4, 43, 65, 66, 68].

Varios investigadores han observado un efecto protector en ratones inyectados pasivamente con suero de conejo hiperinmune anti-PME [64]. En México el grupo del Dr. Isibasi ha demostrado que las porinas son blancos importantes durante la respuesta inmune en pacientes con fiebre tifoidea y en humanos vacunados, y también que las porinas de *S. Typhi* son antígenos que inducen 90% protección al reto con 500 DL₅₀ en ratones [43, 64]. A partir de estos estudios, los doctores Isibasi y López Macías han desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en

Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS una preparación vacunal para uso en humanos con porinas mayoritarias (OmpC y OmpF) de *S. Typhi* a la que se le denominó Isipor [4]. La vacuna es estable a temperatura ambiente y no indujo fiebre ni efectos tóxicos en estudios preclínicos en modelos animales. Salazar-González y cols. evaluaron la respuesta inmune celular y humoral inducidas por estas porinas en humanos (Fase I), quienes recibieron la administración subcutánea de 10 µg de porinas. La vacuna de porinas no induce efectos secundarios adversos y generó la producción de anticuerpos específicos caracterizados por IgM, IgG₁ e IgG₂ con capacidad bactericida, al igual que una respuesta inmune celular caracterizada por la producción de IFN-γ, es decir, una respuesta de tipo Th1 [7, 41]. Además, estos anticuerpos anti-porinas no presentaron reactividad cruzada hacia las porinas de *E. coli* [43, 69], lo que sugiere que existen epítomos especie- específicos de gran importancia en el área de diagnóstico [16, 68, 70].

Todas estas evidencias indican que las porinas principales de *S. Typhi* inducen una respuesta inmune celular y humoral en ambos niveles sistémicos y de la mucosa [43, 65, 66]. Y son un modelo adecuado para estudiar la inducción de memoria inmunológica, para el desarrollo de nuevas formas de diagnóstico [45, 67, 70, 71] y vacunas [41, 43].

1.10 Candidatos a vacunas contra *Salmonellas* no tifoídicas

Hoy en día no existe una vacuna eficiente disponible contra la NTS, ya que el uso de antibióticos es la medida más frecuente para controlar a este tipo de patógenos [7]; sin embargo, se han realizado estudios en ratones utilizando flagelina [65, 72-74], el antígeno O del LPS [75] y PME de *S. Typhimurium* para evaluar el potencial de estas moléculas como vacunas.

Grupos de investigadores han empleado tanto bacterias muertas como bacterias vivas atenuadas para el desarrollo de vacunas, sin embargo sus resultados indican

que no producen una protección adecuada contra la infección [76]. Recientemente un estudio de proteómica de *S. Typhimurium* reportó una molécula prometedora, la proteína sseB, que parece conferir protección contra la infección, sin embargo esta molécula solo se expresa cuando la bacteria se encuentra en forma intracelular por lo que probablemente proteja solo cuando la bacteria logra salir de los macrófagos [77]. Gil-Cruz y cols. han identificado que la porina OmpD de *S. Typhimurium* es un blanco importante de la respuesta inmune humoral mediada por linfocitos B1b. Demostraron que una sola inmunización con porinas de *S. Typhimurium*, pero no *S. Typhi*, puede contrarrestar la bacteriemia y proporcionar una protección equivalente contra *S. Typhimurium* virulenta y atenuada [56]. Recientemente, identificaron que las porinas son el blanco de la respuesta de anticuerpos bactericidas en pacientes infectados con *Salmonella* con y sin co-infección con VIH [78].

Esto indica que OmpD es un objetivo importante de anticuerpos contra *S. Typhimurium*; estos anticuerpos anti- OmpD por sí solos son suficientes para disminuir la infección por *S. Typhimurium*. Por lo tanto, ésta proteína puede ser un candidato para una vacuna de subunidad contra la infección sistémica por NTS [56].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que *S. Typhimurium* expresa tres porinas principales OmpD, OmpC, y OmpF [52, 53]; se ha demostrado que éstas proteínas inducen anticuerpos específicos y que una sola inmunización con estas proteínas puede contrarrestar la bacteremia y proporcionar una protección contra *S. Typhimurium* virulenta, también se ha identificado que la porina OmpD es el blanco de la respuesta protectora mediada por linfocitos B1b en ratones y que en humanos los anticuerpos anti-porinas son capaces de matar a *S. Typhimurium* [56].

Estos resultados señalan que OmpD es un objetivo importante de la respuesta inmune contra *S. Typhimurium*. Sin embargo, no se conoce la capacidad inmunogénica inducida por la porina OmpD de *S. Typhimurium* purificada. Con base en lo descrito anteriormente, se decidió purificar por primera vez a la porina OmpD y evaluar su inmunogenicidad en ratones.

3. JUSTIFICACIÓN

Un porcentaje importante de las personas afectadas por NTS no cuentan con acceso a la atención médica apropiada, especialmente en los países en vías de desarrollo, lo cual impacta severamente en el desarrollo social y en la economía de dichas regiones. Las infecciones por NTS en los países desarrollados no son por lo general letales; Sin embargo, la aparición de cepas que generan cuadros severos y algunas muertes, los constantes brotes por alimentos importados y el riesgo al contagio durante los viajes, han modificado la percepción en estas sociedades sobre la necesidad de nuevas alternativas para esta enfermedad. Un grupo importante afectado por NTS son niños desnutridos y personas inmunodeficientes como las afectadas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, para las cuales esta infección llega a ser letal.

Desafortunadamente no se cuenta con una vacuna para prevenir la NTS que sería de gran ayuda en particular para los grupos más susceptibles a la enfermedad, por lo que la búsqueda de candidatos para desarrollar dichas vacunas es de gran relevancia para enfrentar este problema de salud.

4. OBJETIVO GENERAL.

Purificar a la porina OmpD de *S. Typhimurium* I₂, caracterizar su integridad estructural y estudiar sus propiedades inmunogénicas en ratones.

5. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Purificación de la porina OmpD de *S. Typhimurium*, utilizando una cepa modificada genéticamente que no expresa las porinas OmpC ni OmpF (cepa I₂)
2. Evaluar la pureza, integridad y calidad de la porina OmpD de *S. Typhimurium* I₂.
3. Caracterizar la respuesta de anticuerpos anti-OmpD en suero de ratones previamente inmunizados con la porina de interés.
4. Determinar la dosis óptima de inmunización de la porina OmpD.
5. Evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-OmpD de reconocer a la bacteria *S. Typhimurium* I₂.

6. HIPÓTESIS.

La porina OmpD de *S. Typhimurium* I₂ será altamente inmunogénica, capaz de inducir una respuesta inmune humoral de larga duración en un modelo experimental de ratones.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas

- *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 (OmpC, OmpF y OmpD)
- *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa (I₂) fenotipo SL3261 aroA Δ OmpC::aph Kanamicina (25μg/ml) Δ OmpF::cat Cloranfenicol (25μg/ml). Esta cepa fue modificada genéticamente en el laboratorio del Dr. Adam Cunningham en Birminham, Reino Unido, de tal manera que solo expresa la porina OmpD.

7.2 Antígenos

- Porinas de *S. Typhimurium* (OmpC, OmpF y OmpD) purificadas por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ a partir de *S. Typhimurium* ATCC14028. Lotes:1705 y 1706.
- Porina OmpD purificada por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ a partir de *S. Typhimurium* I₂. Lotes: 18103 y 18117

7.3 Anticuerpos

- Anti IgM de ratón con peroxidasa (HRP): Lote: 871926B. No. M31507. Marca: Invitrogen
- Anti IgG total de ratón con peroxidasa (HRP). Lote: 1022208A. No. 626520. Marca: Invitrogen
- Anti IgG₁ de ratón con peroxidasa (HRP). Lote: 941905A. No. 046120. Marca: Invitrogen
- Anti IgG_{2a} de ratón con peroxidasa (HRP). Lote: 711174A. No. 04-6220. Marca: Invitrogen
- Anti IgG_{2b} de ratón con peroxidasa (HRP). Lote: 671301A. No. 61-0320. Marca: Invitrogen

- Anti IgG₃ de ratón con peroxidasa (HRP). Lote: 13100. No. 610-4343.
Marca: ROCKLAND

7.4 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 7 a 8 semanas de edad de peso que oscila entre 16-19 g adquiridos en Harlan México, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.5 Sueros de ratón

Los ratones fueron sangrados por la vena facial colectando la sangre en tubos microtainer con gel separador (Becton Dickinson). La sangre se centrifugo a 5000 rpm durante 10 minutos para separar el suero del paquete celular. Los sueros fueron almacenados a -20°C (Congelador American) hasta el momento de su análisis.

7.6 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon en matraces de vidrio previamente esterilizados en horno (GallenKamp) a 300 °C durante 3 h. Se pesaron los reactivos en balanza analítica (Mettler AE160), se diluyeron en agua inyectable (PiSA) y se esterilizaron en autoclave (Fehlme Azteca plus) a 15 lb de presión, 121 °C durante 15 min. Finalmente se suplementó el medio mínimo A con glucosa, MgSO₄ y extracto de levadura en campana de flujo laminar (Forma Scientific) y se dejaron en prueba de esterilidad al menos 12 h a 37 °C y 200 rpm (Shaker innova 4300 New Brunswick Scientific).

Los medios de cultivo utilizados para cada cepa fueron los siguientes:

Cepa *S. Typhimurium* I₂.- medio Luria Broth [1% Peptona, 0.09M NaCl y 0.5% extracto de levadura]

Cepa *S. Typhimurium* ATCC14028.- Medio Mínimo A [0.002M $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ($2\text{H}_2\text{O}$), 0.05M Na_2HPO_4 , 0.03M NaH_2PO_4 , 0.008M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura al 5 %, MgSO_4 al 25 % y $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ al 0.5 %].

7.7 Cultivo y obtención de células bacterianas

Se inocularon 80 μL de la cepa [5.2×10^{12} UFC/mL] en 10 L de los respectivos medios Luria Broth y Medio Mínimo A en zona estéril. Posteriormente se incubó durante 3.5–5.0 h a 37°C en un agitador rotatorio. Cuando la bacteria alcanzó la fase final de crecimiento logarítmico (DO de 1.0 a 540 nm) se cosechó por centrifugación a 14,500 g durante 15 min a 4 °C y se almacenó a -70 °C.

7.8 Obtención de la porina OmpD de *S. Typhimurium* por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ

Las células se descongelaron y se les adicionó Tris-HCl 0.05 M pH 7.7 hasta obtener 50 mL de suspensión bacteriana. Las células bacterianas se rompieron por presión en un homogenizador APV1000 y la suspensión de bacteria rota se centrifugó a 16,000 g por 20 minutos a 4 °C para eliminar la envoltura celular y las bacterias enteras de la suspensión.

El sobrenadante se retiró y se trató con 50 μL de DNasa 10 000 U/mL, 50 μL de RNasa 10 000 U/mL y 5.6 mL de solución de MgCl_2 1 M para eliminar el ADN y ARN, y se incubó por 30 minutos a 37 °C.

En tubos de ultracentrífuga estériles (Beckman Coulter) y sin burbujas de aire, se ultracentrifugó a 15,000 g durante 45 minutos a 4 °C, eliminando así ADN, ARN y proteínas del citoplasma. El botón (membrana celular) se resuspendió en 100 mL de solución de Tris HCl-SDS 2% y se trasladó a un homogenizador, se introdujo el pistilo hasta el fondo evitando hacer espuma, repitiendo por 40 veces hasta que no queden sólidos. En un matraz se incubó el homogeneizado durante 30 minutos a 32°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se ultracentrifugó la suspensión a 29,000 g por 40 minutos a 20 °C. El botón resultante (membrana externa y peptidoglicana) se resuspendió en 100 mL de solución de Tris HCl-SDS 2%, se homogeneizó e

incubó nuevamente por 30 minutos a 32 °C, y se ultracentrifugó a 29,000 g por 40 minutos a 20 °C. Para lograr la extracción de las porinas, el botón se resuspendió en 20 mL de amortiguador de Nikaido desnaturizante SDS 1% (Tris 0.05M, NaCl 0.4M, EDTA 0.005 M + β - mercaptoetanol) pH 7.7; se homogeneizó nuevamente y se incubó 2 horas a 37 °C, 120 \pm 20 rpm. Terminado el tiempo de incubación, se ultracentrifugó a 45 000 \pm 2000 rpm, 45 minutos a 20 °C. Finalmente, las porinas se recuperaron en el sobrenadante y se colectaron en un tubo Corning de 50 mL estéril, se filtró en otro tubo Corning y se almacenó a 4 °C hasta su purificación.

Posteriormente, se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200 (XK100 Pharmacia) exclusiva para un solo tipo de porina, a un flujo de 5 mL/min con 4 L de amortiguador de Cromatografía pH 7.7. Se colectaron las fracciones correspondientes a las porinas (primer pico de elusión) y se dializó con solución de PBS cambiándolo cada 12 h durante 3 días, para eliminar el SDS.

7.9 Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico (BCA)

La proteína obtenida en la purificación de las porinas (OmpD) de *S. Typhimurium* se cuantificó por método del Ácido Bicinonínico (“Kit” para la determinación de proteína por BCA, Pierce®, EU); para ello, se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) de 0.0– 1 500 μ g/mL. Se tomó 0.05 mL de la solución de proteína y se adicionó 1 mL de reactivo de trabajo (reactivo A: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinonínico, tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M; y reactivo B: sulfato cúprico al 4%) y se colocaron en baño de agua protegidos de la luz a 37 °C durante 30 min. La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó a 562 nm. La concentración de proteína se calculó interpolando la DO de cada una de las muestras en la curva patrón.

7.10 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se realizó en geles (Bio-Rad, US) al 12% de poliacrilamida; como amortiguador de muestra se utilizó Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, que contiene SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005% para las proteínas analizadas en su forma reducida y nativa. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 200 V, el amortiguador de corrimiento contiene Tris 0.025 M, glicina 0.0192 M, SDS al 0.1 %, pH 8.3.

Una vez terminado el corrimiento electroforético, se realizó la tinción de plata, colocando el gel en una solución fijadora (5 mL de ácido acético al 10% y 25 mL de metanol al 50%) durante 12 h, se adicionó la solución de lavado (metanol:agua 1:2) durante 15 min, posteriormente se lavó con agua destilada y se adicionó la solución de oxidación (tiosulfato de sodio 0.05 M) durante 1 min, se realizó un lavado con agua destilada y se adicionó la solución de impregnación (nitrato de plata 0.01 M y 37.7 μ L de formaldehído al 37%) durante 15 min, finalmente se lavó nuevamente con agua destilada y se adicionó la solución reveladora (tiosulfato de sodio 0.01 M, carbonato de sodio 0.15 M y 125 μ L de formaldehído al 37%) hasta observar las bandas de proteínas; la reacción alcalina se detuvo con ácido acético al 5%.

La tinción de Coomasie se realizó colocando el gel en una solución fijadora (azul brillante G-250 0.02 M, 10 mL de metanol y 2 mL de ácido acético) durante 1 h, posteriormente se destiñó con una solución desteñidora (10 mL de ácido acético glacial y 10 mL de metanol) hasta que las bandas se observaron claramente.

7.11 Endotoxina bacteriana por el método de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL)

La contaminación con carbohidratos como el Lipopolisacárido (LPS) fue determinada mediante la prueba de LAL (Pyrogent-5000, LONZA, Endosafe®, Charleston SC. EU). Es un ensayo cinético cuantitativo para la detección de endotoxinas bacterianas. La prueba se realizó utilizando una placa de 96 pozos de fondo plano y libre de pirógenos, donde se colocaron 10 µg de porina por triplicado, posteriormente se preparó la curva estándar de endotoxina en tubos libres de pirógenos empleando diluciones seriadas con base 10 (0.01, 0.1, 1.0, 10 y 100 EU/mL) del reactivo estándar de endotoxina en agua libre de pirógenos.

Finalmente la placa fue colocada en el lector de placa (BIOTEC Instruments, USA) para su incubación a 37 °C por 10 min y posterior adición de reactivo LAL reconstituido previamente siguiendo las instrucciones del fabricante (100 µL en cada uno de los pozos), el software utilizado para este análisis es WinKQCL®4, Lonza.

7.12 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Corning, NY, EU) con una solución de 10 µg/mL de los diferentes antígenos: porina OmpD de *S. Typhimurium* y porinas de *S. Typhimurium* (OmpC, OmpF, OmpD) en solución amortiguadora de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio, pH 9.6), se dejó fijando el antígeno durante 1 h a 37 °C y a 4 °C toda la noche. Posteriormente se lavó 4 veces con Tween al 0.1% en PBS (PBS-T). Las placas se bloquearon adicionando a cada pozo 200 µL de solución de bloqueo leche descremada Svelty al 5% en PBS (PBS-L), se incubó 1 h a 37 °C y se lavó 4 veces con PBS-T.

Los sueros analizados se diluyeron 1:40 en solución de bloqueo. Se adicionaron 195µL de solución de bloqueo y 5 µl de suero a los primeros pozos de las placas de dilución, se hicieron diluciones seriadas 1:2 con solución de bloqueo. Los sueros se transfirieron en el orden correspondiente a la placa de ELISA. Se incubaron a 37°C durante 1 h y al término de ese tiempo se lavaron cuatro veces con PBS-T.

Se agregó el anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón: IgM, IgG_T, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ conjugados a peroxidasa en una dilución de 1:3000, 1:4000, 1:2000, 1:2000, 1:2000 y 1:3000 respectivamente, disueltos en solución de bloqueo; se incubó durante 1 h a 37 °C y se lavó 4 veces con PBS-T y 2 veces más solo con PBS. Para revelar, se agregaron 100 µL de la solución reveladora (10 mL solución reguladora de citratos pH=5.6, 0.006 g de orto-fenilendiamina (OPD) y 10 µL de peróxido de hidrógeno, por placa) a cada pozo. Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente 10 min y la reacción se detuvo con 10 µL de H₂SO₄ 2.5 N por pozo.

Se tomaron las lecturas a 490 nm mediante un lector de microplacas (Thermo Electron Corporation, Multiskan ascent, USA). Los títulos de anticuerpos se expresaron como $(-\log_2 \times 40)$ y se definieron como el número de diluciones seriadas antes de perder la señal de lectura, considerando el triple del valor promedio del control preinmune. Los datos fueron tratados con el programa de elaboración de gráficas GraphPad Prism versión 5.

7.13 Inactivación por calor de *S. Typhimurium* I₂

Adicionalmente se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Corning, NY, EU) con una suspensión de bacteria *S. Typhimurium* I₂ 1X10⁷ UFC/pozo. Para ello se descongeló del banco de trabajo una alícuota de la bacteria *S. Typhimurium* y se inoculó (100 µL) en un tubo Corning de 15 mL con 5 mL de medio LB. Se dejó en incubación durante 24 h a 37 °C con agitación constante. Después de la incubación se tomaron 300 µL del cultivo y colocaron en un tubo Corning de 50 mL con 15 mL de medio LB. Se incubó nuevamente a 37 °C con agitación constante (200 rpm). Se tomó una muestra del cultivo y se midió la absorbancia a 540 nm cada hora durante las primeras 4 horas y cada media hora a partir de la cuarta hora hasta alcanzar una DO de 1.0. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, se decantó y se resuspendió en 15 mL de PBS estéril. Se tomó una alícuota de 100 µL para las diluciones seriadas; y el resto se colocó en baño maría a 70 °C durante

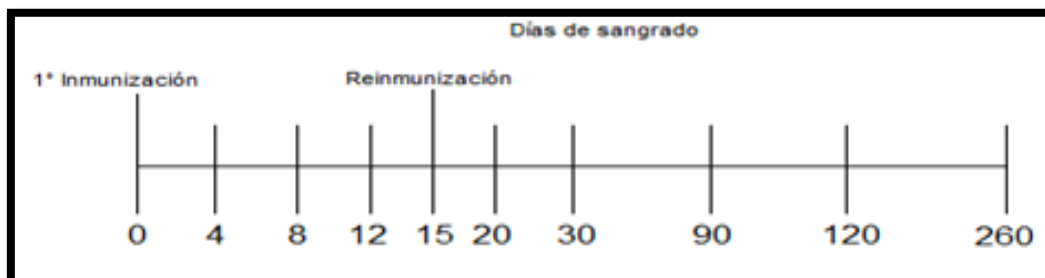
1:30h para la inactivación de la bacteria; finalmente, se guardó en refrigeración a 4°C.

Por triplicado, se realizaron 6 diluciones seriadas 1:10 tomando 100 µL de la muestra y colocándolo en 900 µL de PBS estéril, se homogenizó cada dilución en Vórtex durante 30 segundos. De la última dilución de las tres series, se tomaron 100 µL para cultivarlos por separado en cajas Petri, a las cuales se les adicionó 15 mL de medio Agar Soya Trypticaseína (TSA). Se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas, se contaron las colonias de cada una de las placas y se determinaron las UFCs del cultivo inicial.

Finalmente, por el método de ELISA se determinaron los títulos de anticuerpos IgG_T anti-bacteria, se utilizó como antígeno a la bacteria inactivada, y se analizaron los sueros de la respuesta primaria (día 12), respuesta secundaria (día 30) y respuesta a largo plazo (día 260) de las tres dosis a prueba.

7.14 Esquema de inmunización.

Grupos de 5 ratones BALB/c de 7-8 semanas de edad fueron inmunizados dos veces con 1µg, 10µg y 30 µg de OmpD en su forma nativa (trímeros), con intervalos de 15 días vía ip. El antígeno fue disuelto en solución salina isotónica (SSI) sin adyuvante en zona estéril (Campana Forma Scientific). Como grupo control, se inmunizaron 5 ratones con SSI; y como grupo control positivo, se inmunizaron 5 ratones con porinas de *S. Typhimurium* (OmpC, OmpD y OmpF). Los sueros de los ratones se colectaron por punción en la vena facial los días 0, 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 260. Posteriormente se mantuvieron almacenados a -20 °C (Congelador American) hasta el momento de su análisis.



8.- RESULTADOS

8.1 Purificación de OmpD: Crecimiento de *S. Typhimurium* y obtención de biomasa

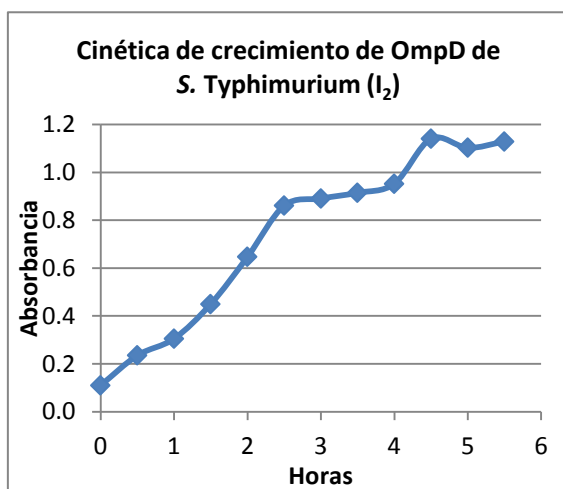
Una vez que la prueba de esterilidad de los medios fue negativa a crecimiento bacteriano, se llevó a cabo la producción de biomasa de *S. Typhimurium* I₂ en matraces de vidrio bajo condiciones controladas (37 °C, 200 rpm y pH 7.0).

En la Figura 3A se observa que la bacteria alcanzó la fase final de crecimiento logarítmico dado que se registró una DO mayor a 1.0; esto indica, que las condiciones controladas y el medio Luria Broth para la Cepa *S. Typhimurium* I₂ fueron las adecuadas. Para la cepa *S. Typhimurium* tipo silvestre, el medio mínimo A fue suficiente para un óptimo crecimiento (datos no mostrados).

Entre las 4 y 6 horas del cultivo de *S. Typhimurium* (Figura 3A) empieza la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, antes de que la falta de disponibilidad de nutrientes lleve al descenso de la bacteria. Esta fase estacionaria es la óptima para llevar a cabo la cosecha de la bacteria, ya que se encuentra en su máximo crecimiento, y se puede obtener la mayor cantidad de biomasa.

En la Tabla 1 se reporta el rendimiento obtenido y controles de calidad donde se observa que el lote fue elaborado con éxito y bajo buenas prácticas, ya que no presenta contaminación de bacterias, y la concentración de LPS cumple con no sobrepasar el límite 2 ng/10 µg porina.

A)



B)

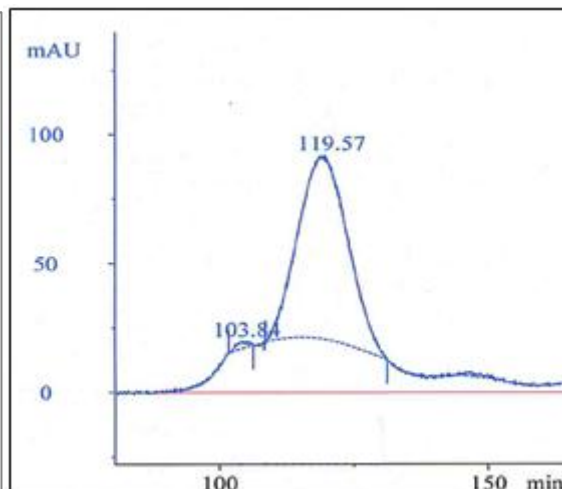


Figura 3.- Purificación de la porina OmpD. **A)** Cinética de crecimiento de la cepa *S. Typhimurium* I₂ fenotipo SL3261 aroA Δ OmpC::aph Kanamicina (25 μ g/ml) Δ OmpF::cat Cloranfenicol (25 μ g/ml) que solo expresa OmpD, en medio sintético LB. La cinética se siguió a λ 540 nm cada 30min, utilizando como blanco medio de cultivo estéril. **B)** Se llevó a cabo la extracción de la porina OmpD por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ, el producto de la extracción fue purificado por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna empacada con Sephacryl S-200. El cromatograma muestra un pico principal a 119.57 mAU (Unidades de Absorbancia), OmpD se colectó a partir del min 110 al min 130.

Tabla 1- Controles de calidad del lote purificado L-18103

PORINA	OmpD
LOTE	18103
BIOMASA	20.3g
CONCENTRACION DE PROTEÍNA	397.50 μ g/MI
RENDIMIENTO	23.85mgde proteína
LPS	1.6ng LPS/10 μ g porina
ESTERILIDAD	Negativo

8.2 Extracción y purificación por cromatografía de la porina OmpD de *S. Typhimurium*

El metabolito bacteriano de interés es una proteína que se encuentra en la membrana de la bacteria, por lo que la ruptura celular es el primer paso del proceso de recuperación de las porinas. Ésta se llevó a cabo por un método mecánico de corte utilizando una prensa francesa, la ventaja de este método es la rapidez en que se logra la ruptura de las células.

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de la porina OmpD por el método de Nikaido modificado [79], ésta técnica se fundamenta en el hecho de que estas proteínas se encuentran unidas por enlaces iónicos al peptidoglucano, por lo tanto se pueden separar de ésta mediante su solubilización en un amortiguador desnaturizante que contenga SDS.

Las proteínas así obtenidas se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200, la cual descarta a las otras proteínas de la membrana externa y la mayor parte del LPS (el gel permite la discriminación entre proteínas y demás contaminantes según su tamaño y forma, de tal manera, que eluyen más rápido las moléculas de mayor peso molecular). Las proteínas que se obtienen después del paso por la columna corresponden a la porina OmpD, la cual se obtiene en su forma nativa o trimérica. Como se observa en la figura 3B, se obtuvo un pico principal en el cromatograma que abarca de 110 a 130 min que, teóricamente, representa la porina de interés, el peso molecular determinará si se trata de OmpD.

Una vez concluida la purificación de la porina OmpD, se cuantificó y se obtuvo un rendimiento de 23.85 mg de proteína (Tabla 1). Finalmente el lote fue sometido a las pruebas de control de calidad.

8.3 Caracterización de la porina OmpD de *S. Typhimurium*

Con el objetivo de analizar la eficiencia de la purificación de la porina OmpD obtenida en la cromatografía de exclusión molecular y confirmar su identidad e integridad, se realizó una electroforesis. En la figura 4 se muestra la proteína purificada a partir de la cepa *S. Typhimurium* I₂ que únicamente expresa la porina OmpD. Las porinas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12.0% en condiciones reductoras. Para corroborar la presencia de carbohidratos como LPS se realizó una tinción de plata (figura 4B); y para demostrar la presencia de proteínas se realizó la tinción de Coomassie (figura 4A).

Los trímeros de porinas que se obtuvieron fueron calentados a 96 °C durante 8 min, en presencia de SDS para generar monómeros; está demostrado que este tratamiento no desnatura a estas proteínas, únicamente ocasiona la desorganización de los trímeros en monómeros. En el carril 2, se observa una única banda a 34 kDa que corresponde a la porina OmpD en su forma desnaturada o de monómero. En el carril 3 se muestra la proteína nativa o en su forma de trímero (condiciones no desnaturantes) aproximadamente a la altura de 75 kDa; éstos datos de peso molecular coinciden con los reportados anteriormente [53, 60, 80]. No se observa presencia de degradación de las porinas, ni de otras bandas contaminantes que correspondan a otras proteínas; tampoco se observa contaminación por LPS. De estos datos, se concluye que tanto el tratamiento de la bacteria, desde su modificación genética, como la purificación de la porina OmpD fue exitosa, ya que la única banda obtenida descarta la presencia de proteínas como OmpC (36 KDa), OmpF (34 KDa) u otras porinas minoritarias; obteniendo así, por vez primera, un lote puro de OmpD. Sin embargo, cabe destacar que es posible la existencia de otras proteínas que no se observen en el gel debido a que su concentración en el lote es demasiado baja para su reconocimiento por este tipo de tinciones.

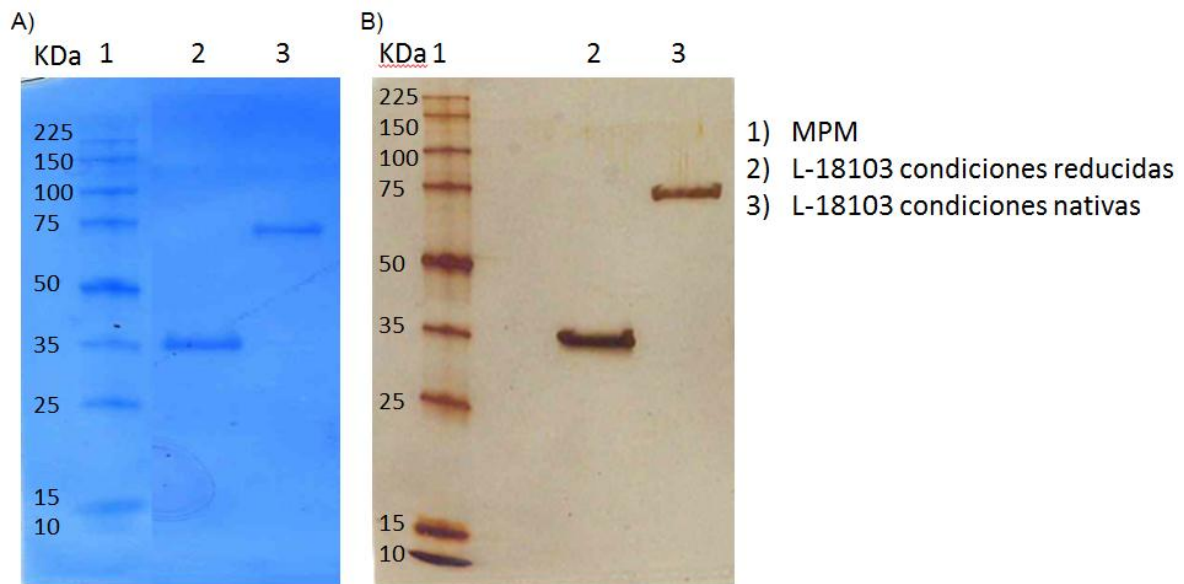


Figura 4.- Análisis electroforético de la porina OmpD de *S. Typhimurium* purificada por el método de Nikaido modificado en la UIMIQ. SDS-PAGE: En cada carril se adicionó lo equivalente a 3 μ g de porina OmpD y se llevó a 15 μ L con buffer de carga. Carril 1 marcadores de peso molecular (US Promega); Carril 2 porina OmpD purificada a partir de *S. Typhimurium* I₂ en su forma monomérica; Carril 3 porina OmpD en su forma nativa o de trímero. **A)** Tinción de Coomasie para presencia de proteínas, **B)** Tinción de plata para presencia de carbohidratos.

8.4 Evaluación de la capacidad inmunogénica de la porina OmpD de *S. Typhimurium*

Se ha observado que las porinas mayoritarias de *S. Typhi* son antígenos que inducen altos títulos de anticuerpos de larga duración con actividad bactericida. La porina mayoritaria OmpD de *S. Typhimurium*, es una porina que se requiere comenzar a caracterizar, empezando por conocer la capacidad inmunogénica que posee y la dosis a la cual se genera una alta respuesta inmune humoral.

Para ello, se inmunizaron grupos de 5 ratones BALB/c con 1, 10 y 30 μ g de la porina OmpD en su forma nativa, sin adyuvante y por vía ip. Como grupo control positivo se administró 10 μ g de porinas de *S. Typhimurium* y como control negativo se inmunizó únicamente SSI. Se tomaron muestras de sangre a los días 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 260. Los sueros de los ratones inmunizados se titularon mediante un ensayo de ELISA, empleando como antígeno a la porina OmpD de la cepa *S. Typhimurium* I₂. Los resultados se muestran en la Figura 5, donde se observan los títulos de anticuerpos analizados durante 9 meses (260 días).

Se encontró que durante la respuesta primaria, la porina OmpD induce anticuerpos de tipo IgG_T e IgM a los 4 días después de la inmunización en las tres dosis probadas, siendo mayores los títulos de IgM al día 4. Posteriormente, durante la respuesta secundaria (refuerzo al día 15), los niveles de IgG_T alcanzaron su máximo en el lapso de los días 30 y 90 (figura 5a); mientras que los títulos de IgM presentaron el máximo incremento al día 4 (figura 5b).

En la respuesta de anticuerpos de larga duración, se evaluó la producción de anticuerpos específicos durante 260 días posteriores a la inmunización; se observó que los títulos de IgG_T se mantienen constantes desde el día 90 al 260, por otro lado los títulos de IgM decrecen paulatinamente.

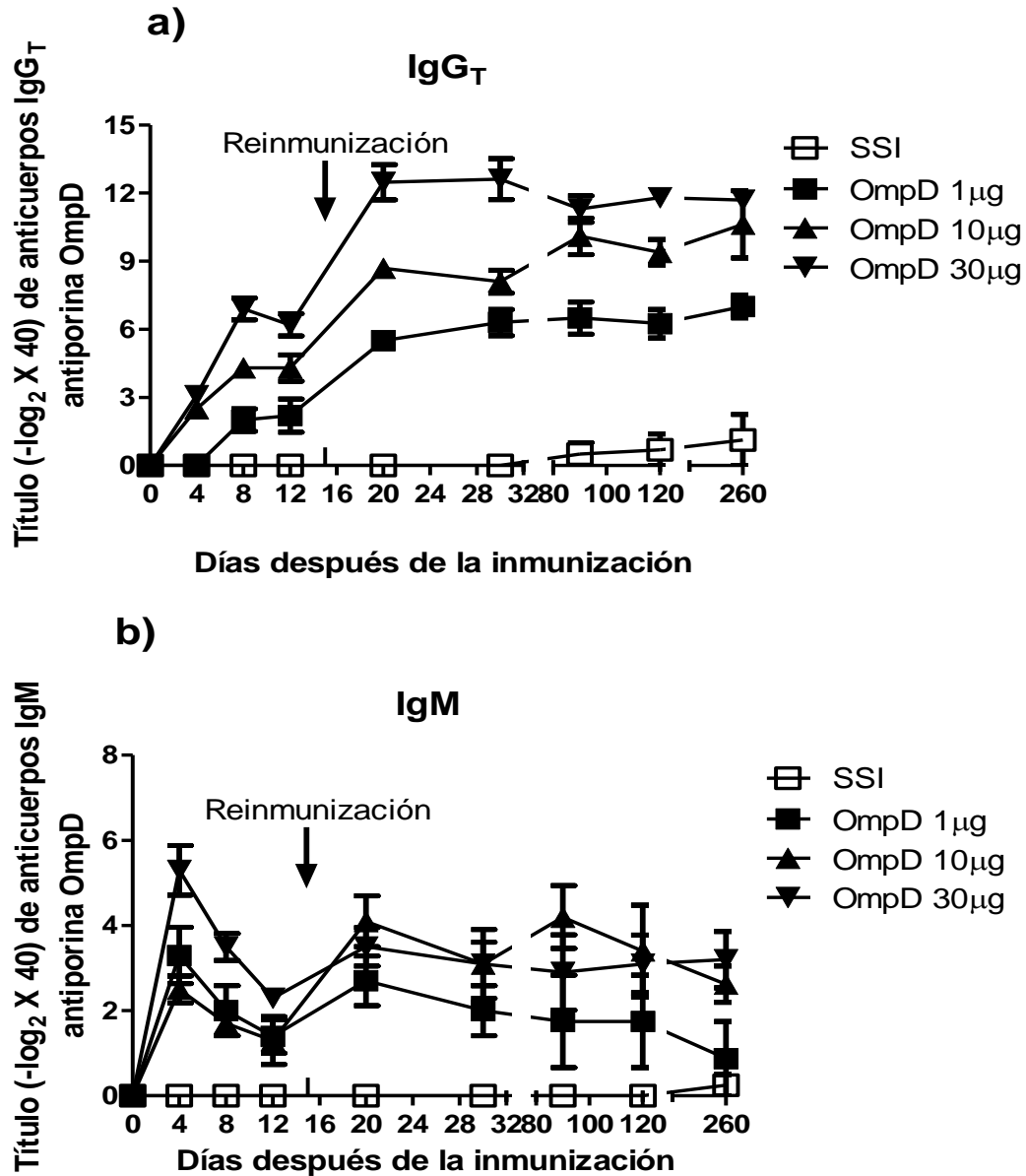


Figura 5. Diferentes dosis de la porina OmpD de *S. Typhimurium* induce una respuesta de anticuerpos IgG_T e IgM en ratones. Ratones BALB/c de 7 a 8 semanas se inmunizaron ip con 1µg (■), 10 µg (▲), 30µg (▼) y SSI (●) de la porina OmpD de *S. Typhimurium* con una reimunización al día 15 (marcado con una flecha). El título de anticuerpos anti-OmpD se evaluó mediante ELISA los días 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 260 después de su inmunización. **(a)** Títulos de anticuerpos anti- OmpD de clase IgG_T utilizando tres dosis diferentes de inmunización. **(b)** Títulos de anticuerpos anti- OmpD de clase IgM utilizando tres dosis diferentes de inmunización. Los resultados se expresan como la media ± SD, de cinco ratones por grupo (a y b). Los datos corresponden al resultado representativo de un experimento.

8.5 Subclases de IgG presentes en los sueros anti-porina OmpD.

Para estudiar las características de los anticuerpos inducidos por las porinas, se analizaron las subclases de IgG presentes en los sueros anti-porina OmpD. Se observó una respuesta rápida, principalmente de IgG_{2b} e IgG₃ (figura 6c y 6d), con títulos que mostraron un incremento al día 4 después de la primera inmunización; la presencia de IgG₁ se detectó a partir del día 8 (figura 6a), en el caso de IgG_{2a} no hubo mayor respuesta hasta la reinmunización al día 15 (figura 6b). La respuesta secundaria se caracterizó por la presencia de todas las subclases de IgG en el siguiente orden IgG_{2b}>IgG₁> IgG₃> IgG_{2a}.

Durante la respuesta de larga duración (día 260) se observaron títulos elevados de las subclases IgG₁>IgG_{2b}>IgG₃>IgG_{2a} (anti-OmpD), que no desaparecen, manteniéndose constantes del día 90 al 260; únicamente en el caso de IgG₃, sí se observa un decremento al día 260.

8.6 Dosis óptima de inmunización de la porina OmpD

Se inmunizaron tres grupos ratones con las dosis 1, 10 y 30 µg de OmpD, se puede observar en las Figuras 5 y 6 un efecto dosis dependiente, a mayor cantidad de antígeno inmunizado mayor título de anticuerpos. Las dosis de 10 y 30 µg de porina indujeron los títulos más altos; y se puede observar en todas las subclases de IgG una gran diferencia entre los títulos de estas dos dosis, con excepción de la gráfica de IgM donde no se observa dicho efecto.

En base a lo anterior, se considera la dosis de 30 µg de porina OmpD como la más adecuada porque induce una mayor cantidad de anticuerpos en comparación con las otras dos dosis probadas.

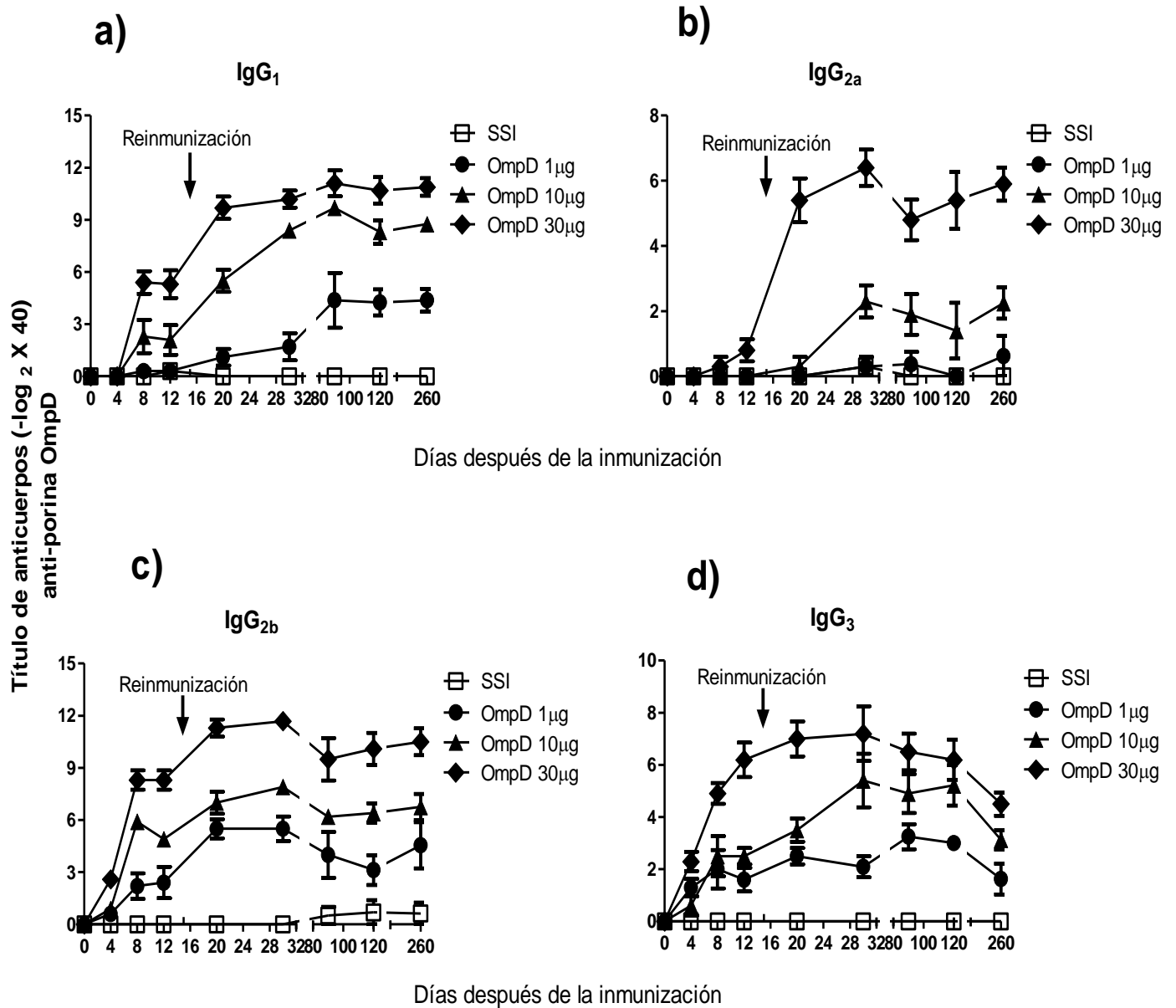


Figura 6. Diferentes dosis de la porina OmpD de *S. Typhimurium* induce varias subclases de IgG en ratones. Ratones BALB/c de 7 a 8 semanas se inmunizaron ip con 1 µg (●), 10 µg (▲), 30 µg (◆) y SSI (□) de la porina OmpD de *S. Typhimurium* I₂ con una reinmunización al día 15 (marcado con una flecha). El título de anticuerpos anti-OmpD se evaluó mediante ELISA los días 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 260 después de su inmunización. **a)** Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG₁, **b)** Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG_{2a}, **c)** Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG_{2b}, **d)** Títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG₃. Los resultados se expresan como la media ± SD, de cinco ratones por grupo (a, b, c y d). Los datos corresponden al resultado representativo de un experimento.

8.7 Importancia biológica de los anticuerpos anti-OmpD: Capacidad de unión a la bacteria *S. Typhimurium* inactivada

Para evaluar la función biológica de los anticuerpos anti-OmpD, se procedió a evaluar la capacidad de unión a la superficie de la bacteria *S. Typhimurium*. Se realizaron ensayos de ELISA para determinar si estos anticuerpos podían reconocer de manera directa a la bacteria completa *S. Typhimurium* I₂; se analizaron los sueros de la respuesta primaria (día 12), respuesta secundaria (día 30) y a largo plazo (día 260). Se encontró que la rápida respuesta de IgG (figura 7) es capaz de reconocer a la bacteria. Esta capacidad se incrementa utilizando el suero de los ratones inmunizados al día 30, donde se observa la máxima unión, siendo el reconocimiento en el siguiente orden: respuesta secundaria > respuesta a largo plazo > respuesta primaria.

Esto demuestra que los anticuerpos IgG contenidos en los sueros anti-OmpD poseen la capacidad de reconocer epítomos accesibles y expuestos en la superficie de la bacteria. Esto es de gran importancia para la actividad biológica de los anticuerpos, ya que la unión de éstos a la superficie de la bacteria es el primer evento que causa la lisis bacteriana mediante la activación de la vía clásica del complemento. En el ratón, las subclases que mejor fijan el complemento son IgG_{2a} e IgG_{2b}; por lo tanto, la alta presencia de estas subclases sugiere que son las responsables del efecto bactericida y de protección prolongada contra *Salmonella*. No obstante, la presencia de las otras subclases: IgG₁ e IgG₃ anti-OmpD, sugiere la existencia de otras funciones biológicas de los anticuerpos presentes en los sueros anti-OmpD como lo son la neutralización de la bacteria y fagocitosis.

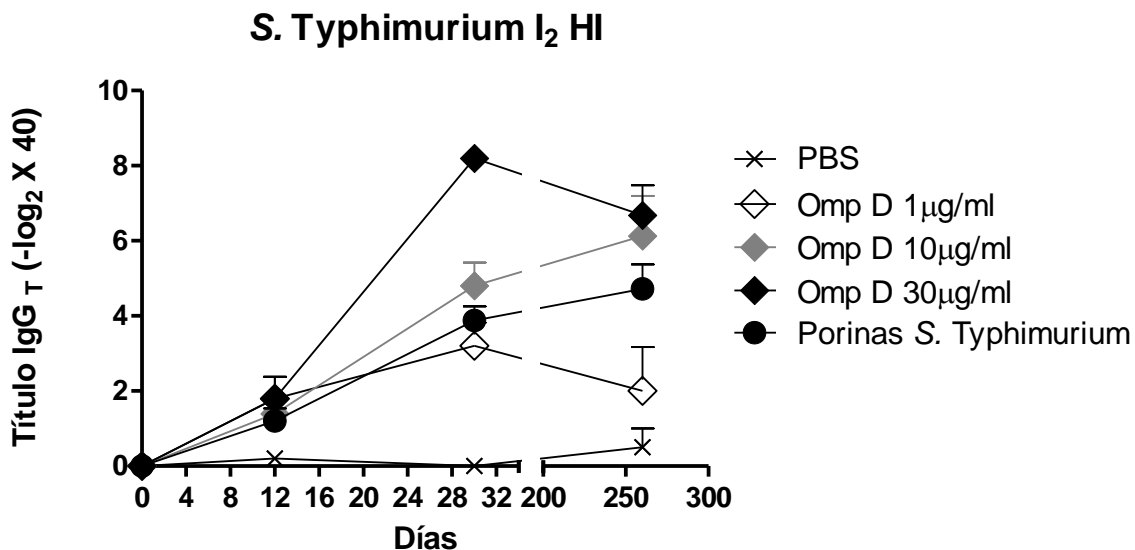


Figura 7. Diferentes dosis de la porina OmpD de *S. Typhimurium* induce anticuerpos capaces de reconocer y unirse a la superficie de la bacteria *S. Typhimurium*. Ratones BALB/c de 7 a 8 semanas se inmunizaron i.p. con 1 µg (◇), 10 µg (◊), 30 µg (◆) de la porina OmpD de *S. Typhimurium*, PBS (x) y 10 µg de porinas de *S. Typhimurium* (●). Con una reimmunización al día 15. Se determinó por ELISA el título de anticuerpos anti-OmpD de clase IgG_T capaces de unirse a la superficie de la bacteria. Fueron evaluados los días 12 (respuesta primaria), 30 (respuesta secundaria) y 260 (respuesta a largo plazo). Los resultados se expresan como la media ± SD de cinco ratones por grupo. Los datos corresponden al resultado representativo de un experimento.

9.- DISCUSIÓN

En este trabajo se describe por primera vez la purificación y caracterización inmunogénica de la PME más abundante de *S. Typhimurium*, la porina OmpD.

Una forma de facilitar la purificación de esta porina es la elección de una cepa modificada genéticamente que no expresa las porinas OmpC y OmpF; estas porinas son mayoritarias en *S. Typhimurium* pero se expresan en menor cantidad que OmpD. *S. Typhimurium* cepa I₂ es una bacteria que no se ha utilizado en investigaciones anteriores para la purificación de PME. En la figura 3A se aprecia una cinética de crecimiento típica de un microorganismo que no presentó limitación de crecimiento por ningún factor. Esto permite afirmar que las condiciones de oxígeno (aerobiosis), temperatura (37°C), agitación (200rpm), control del pH (7.0) y nutrientes son las mejores para el crecimiento de *S. Typhimurium* I₂ en matraz. Santiviago y cols. han observado que, a diferencia de OmpC y OmpF, la expresión de OmpD no varía a los cambios de osmolaridad pero sí a los cambios en la concentración de oxígeno y pH; demostraron que cuando la bacteria se cultiva en anaerobiosis y a pH 7 la expresión de OmpD aumenta considerablemente con respecto a las otras porinas. Estas condiciones son encontradas durante la infección en su hospedero (ratón) donde *S. Typhimurium* sobrevive a un ambiente bajo en oxígeno y cambios bruscos de pH [54].

Para la extracción de las porinas el método de Nikaido modificado en la UIMIQ fue elegido por su relativa facilidad de trabajo en la solubilización de PME en SDS, que puede ser removido fácilmente por diálisis. Este método ha sido usado para la extracción de varias porinas con anterioridad [60, 61], y se han logrado buenos resultados en el laboratorio del Hospital de Especialidades del IMSS Centro Médico Siglo XXI [41].

Después de la purificación mediante exclusión molecular, se obtiene principalmente un complejo formado por moléculas de naturaleza proteica, además de LPS. Varios investigadores han purificado porinas de *S. Typhimurium* y han observado en geles SDS-PAGE cuatro porinas principales OmpC, OmpF, OmpD, y OmpA, siendo OmpD

la más abundante [53, 54, 59, 63]. Sin embargo, hasta ahora no había sido posible la purificación únicamente de OmpD, para evaluar exclusivamente sus propiedades.

En la Figura 3B y 4 se observa por primera vez la purificación de la porina OmpD mediante el método de Nikaido modificado, el peso molecular obtenido es muy similar a los reportados con otros métodos de purificación [53, 60, 80], el rendimiento corresponde al 0.1% de la biomasa total húmeda y, aunque el lote se obtuvo libre de microorganismos, se encontró LPS contaminante (Tabla 1). La presencia del LPS es importante para el ensamblaje de las porinas en el espacio periplásmico para posteriormente incorporarse en forma de trímeros en la membrana externa de la bacteria [51]. Por esta razón, es muy difícil obtener una preparación de porinas totalmente libre de LPS empleando las herramientas bioquímicas que actualmente se disponen. La contaminación total del lote fue de 0.16 ng LPS/ μ g proteína, esto implica que si los ratones se inmunizaron con 1 - 30 μ g de porinas, recibieron alrededor de 0.16 - 4.8 ng de LPS en cada inmunización. Secundino y cols. establecieron un parámetro que ha sido utilizado en el control de calidad de los lotes obtenidos, evaluaron la contribución del LPS contaminante en la respuesta de anticuerpos inmunizando ratones con 2 ng LPS/10 μ g porina y concluyeron que el LPS no funciona ni como adyuvante ni en la generación de anticuerpos de larga duración [41]. Satisfactoriamente, el lote obtenido sí cumple con este parámetro preestablecido. Otro aspecto importante reportado por Secundino, es la contribución de la organización antigénica de las porinas para la inducción de una alta inmunogenicidad. Las porinas que al purificarse se encuentran formando trímeros (estructura nativa) recibieron un ligero calentamiento (sin llegar a desnaturalizarse) para generar monómeros; inmunizando estos monómeros demostraron que la forma nativa de las porinas, a nivel de su organización estructural, es importante para la activación del linfocito B, siendo menos inmunogénica la forma desnaturalizada [43]. Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se inmunizó la porina OmpD en su forma nativa (trímero).

El estudio de la estructura e inmunoquímica de las PME de las bacterias Gram-negativas es inmunológicamente importante debido a que poseen epítomos con amplia accesibilidad al sistema inmune; y son un punto crítico para entender la respuesta inmune frente a la infección por este tipo de bacterias. Sin embargo, la información acerca del potencial para conferir protección de estas PME contra la salmonelosis es limitada.

Se sabe que la respuesta inmune en los sujetos con fiebre tifoidea se encuentra dirigida contra algunas PME entre otros antígenos. Se ha visto que PME de las bacterias Gram-negativas son altamente inmunogénicas y en algunos casos capaces de conferir protección; por ejemplo, la porina PorB de *Chlamydia trachomatis* protege contra la infección genital de esta bacteria, la porina PorB de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* induce altos niveles de anticuerpos bactericidas y es capaz de conferir protección, las porinas de *Pseudomonas aeruginosa* induce títulos de anticuerpos IgA, las proteínas principales de membrana externa de *Campylobacter jejuni* son inmunogénicas y son los blancos de la respuesta inmune en una infección natural, las proteínas de superficie celular de *Brucella melitensis* son inmunogénicas y capaces de proteger, proteínas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* inducen protección en ratón.

Se sabe que las porinas mayoritarias de *S. Typhi* son un blanco específico de la respuesta inmune, induciendo altos títulos de anticuerpos durante toda la vida del ratón con actividad bactericida y opsonofagocítica [41, 64]. Isibasi y cols. inmunizaron en ratones entre 2.5 y 30 μg de porinas OmpC y OmpF, purificadas de *S. Typhi* virulenta. Los ratones inmunizados con 10 μg de porinas se sometieron al reto con dicha bacteria y se obtuvo el 90% de protección a 500 DL₅₀, y 30% de protección en ratones inmunizados con la misma dosis de porinas pero retados con *S. Typhimurium* [81].

Nowsheen y Jain purificaron las PME de *S. Typhimurium* e inmunizaron algunas fracciones en ratones, encontraron una proteína de 49 kDa que confirió el 100% de protección a 100 DL₅₀, otras fracciones confirieron distintos grados de protección a

50 DL₅₀ 37k Da (66.7%), 33 kDa (50%) y 15 kDa (33.3%). Utilizando suero de pacientes con fiebre tifoidea encontraron reactividad cruzada con la proteína 49 kDa, esto indica que podría haber epítomos comunes entre las proteínas de 49 kDa de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* que les permiten provocar una respuesta inmune tanto en seres humanos como en ratones. Estos datos muestran el potencial de PME de *S. Typhimurium* como antígenos protectores que podrían aplicarse para el desarrollo de una vacuna contra la fiebre tifoidea [82].

OmpD está presente en la mayoría de los serovares de *Salmonella* que frecuentemente son asociados a infecciones [59] y se han encontrado anticuerpos anti-OmpD en ratones que demuestran que ésta proteína tiene una importante capacidad inmunogénica [60, 61]; inclusive, se ha demostrado que esta porina es un blanco importante del sistema inmune frente a la infección por *S. Typhimurium* [56]. Selke y cols. identificaron la alta inmunogénicidad de OmpD, y aplicaron esta propiedad en el desarrollo de una vacuna de bacteria viva *S. Typhimurium* Δ OmpD para diferenciar entre el ganado porcino vacunado del infectado, que es de gran importancia ya que la carne de cerdo es de los principales alimentos que transmiten este patógeno [83].

Varios estudios han demostrado el potencial de las porinas OmpC y OmpF de *S. Typhi* como inmunógenos candidatos a vacunas, pero poco se sabe acerca del potencial de OmpD, probablemente por su ausencia en *S. Typhi*. A pesar de esta diferencia, algunos investigadores encontraron que OmpD tiene una gran homología con OmpC de *S. Typhi*, NmpC de *E.coli* (75%), OmpC de *S. Typhimurium* (68%) y la porina Lc del bacteriofago PA-2 (75%); inclusive han encontrado reacción cruzada de anticuerpos anti-OmpD con algunas de las proteínas ya mencionadas debido a que existen epítomos externos que están muy conservados en la familia Enterobacteriaceae [60, 61]. Por lo anterior, el estudio de OmpD como inmunógeno permite evaluar si posee las mismas propiedades que OmpC y OmpF de *S. Typhi*.

Una vez caracterizada la porina OmpD, se inmunizó en ratones BALB/c para conocer su contribución en la inducción de anticuerpos de larga duración. Se encontró que la porina OmpD induce una respuesta rápida de anticuerpos IgG_T e IgM durante la respuesta primaria en las tres dosis probadas, siendo mayores los títulos de IgM al día 4 (Figura 5b); IgM es el primer isotipo de anticuerpos que se generan y no tienen una vida media larga como en el caso de IgG que tardan más tiempo en aparecer pero persisten como anticuerpos de memoria. La respuesta secundaria se caracterizó por altos niveles de IgG_T alcanzando su máximo en el día 30 (Figura 5a). En la respuesta a largo plazo se observó que los títulos de IgG_T e isotipos se mantienen constantes desde el día 90 al 260, con excepción de los títulos de IgM e IgG₃ que decrecen paulatinamente (Figura 5 y 6).

Tanto en las cinéticas de anticuerpos IgG_T como en todas las subclases estudiadas se observó un efecto dosis dependiente (Figuras 5a y 6), a mayor cantidad de antígeno inmunizado mayor título de anticuerpos; la dosis de 30 µg de porina indujo los títulos más altos, por lo cual consideramos esta dosis como la más eficiente inductora de anticuerpos de entre las 3 probadas. Por el tipo de curva observado y al comparar con las curvas observadas inmunizando porinas de *S. Typhi*, se puede inferir que con la dosis de 30 µg se está cerca de la capacidad máxima de inducción de anticuerpos con 1 y 2 dosis, y que la inmunización con más antígeno no aportaría incrementos significativos en el título de anticuerpos [81].

La caracterización de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune de larga duración es crucial para la comprensión de los mecanismos que generan un estado de inmunidad. La participación de la respuesta inmune mediada por células es muy importante para generar protección inmunológica. Sin embargo, recientes estudios indican que la respuesta humoral es igualmente importante. Para lograr una protección efectiva contra la infección por *Salmonella*, los inmunógenos deben ser capaces de inducir tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células [82].

La respuesta de anticuerpos de larga duración se define como la presencia de inmunoglobulinas (Ig) a nivel sistémico o local durante varios años en individuos inmunizados, que funcionan como la primera defensa contra reinfecciones.

Una de las principales funciones del sistema inmune, es la del reconocimiento de patógenos para una posterior activación y erradicación del mismo. Las moléculas que son reconocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), activan a las células del sistema inmune innato a través de PRR. Recientemente Cervantes y cols. demostraron que las porinas de *S. Typhi* son ligandos de TLR-2 y TLR-4, y que el reconocimiento de las porinas por estos PRRs lleva por un lado a la activación y maduración de APCs y por el otro ejercen un efecto directo sobre el linfocito B permitiendo el mantenimiento de la respuesta de anticuerpos; por lo que podemos denominar a este tipo de moléculas antígenos-PAMPs, debido a que son reconocidos como antígenos y como PAMPs; esto los convierte en antígenos con mayor inmunogenicidad, lo que impacta en el mantenimiento de altos títulos de anticuerpos en suero y, probablemente, sea uno de los mecanismos involucrados en la generación de altos títulos de anticuerpos de larga duración inducidos por la porina OmpD [84]. En este sentido, la inducción de anticuerpos de larga duración es una respuesta muy importante que se busca obtener para el desarrollo de vacunas; donde los anticuerpos presentan un efecto directo en la neutralización de bacterias, virus y toxinas; o bien, una actividad indirecta (dependiente de otros componentes del sistema inmune) mediante la opsonización y activación del complemento.

En el caso de *Salmonella*, durante el proceso de infección se ha descrito que se generan anticuerpos en el suero de pacientes con fiebre tifoidea dirigidos contra los antígenos O, H y Vi. Sin embargo, en muchos casos los altos títulos de estos anticuerpos no poseen relación con el estado de protección ni con la evolución de la enfermedad. En las bacterias, la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo sobre su superficie, provocando la activación de los diferentes componentes del complemento de manera que se ejerce un efecto lítico.

Singh y cols. descubrieron que algunos anticuerpos anti-porinas van dirigidos contra epítomos expuestos, la minoría contra epítomos periplásmicos y la mayoría contra

epítomos enterrados en la bicapa lipídica. Generalmente las porinas contienen cinco o más epítomos exteriores, algunos de ellos parcialmente tapados por LPS [60]. En este trabajo se obtuvieron altos títulos de anticuerpos contra la porina OmpD completamente descubierta; evaluar la capacidad de unión de estos anticuerpos a la bacteria *S. Typhimurium* I₂ completa nos indica que poseen una función biológica ya sea opsonofagocítica o bacteriolítica, que tiene gran importancia al combatir las infecciones provocadas por *Salmonella*, en particular durante la bacteriemia, fase en la cual la bacteria se encuentra en el torrente sanguíneo.

En nuestros resultados sí se observaron anticuerpos IgG_T presentes en los sueros anti-OmpD que tienen la capacidad de reconocer de manera directa epítomos sobre la superficie de la bacteria (Figura 7). Se observó que la cantidad de anticuerpos dirigidos contra la bacteria completa es menor que los anticuerpos dirigidos contra la porina completa, de acuerdo con los trabajos de Singh, el resto de los anticuerpos van dirigidos contra epítomos que se encuentran dentro de la bicapa lipídica a los cuales el sistema inmune no tiene libre acceso. No obstante, la alta cantidad de anticuerpos inducidos por OmpD demuestra que esta porina es altamente inmunogénica.

10.- CONCLUSIONES

En este trabajo se presenta por primera vez la purificación, caracterización y evaluación de la capacidad inmunogénica de la porina mayoritaria OmpD de *S. Typhimurium*. Se consideró la dosis de 30 μ g de OmpD como la más eficiente inductora de anticuerpos de entre las 3 probadas, y se mostró que la porina OmpD es altamente inmunogénica, capaz de inducir una respuesta inmune humoral en ratones BALB/c inmunizados con OmpD purificada sin adyuvante, generando altos títulos de anticuerpos IgG_T, IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ de larga duración, que pudieran ser bactericidas ya que son capaces de unirse a la bacteria completa.

Estos resultados representan un avance importante en la inmunoquímica de la porina OmpD y apoyan la realización de futuras investigaciones para evaluar la utilidad de esta porina en el desarrollo de una vacuna experimental capaz de inducir protección contra la salmonelosis no tifoídica.

11. BIBLIOGRAFIA

1. **Agbaje M.**, R.H.B., M. A. Oyekunle, O. E. Ojo, O. T. Adenubi, "Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note". *folia microbiologica*, 2011. **56**(6): p. 497–503.
2. **Swearingen**, M.C., Porwollik, S., Desai, P. T., McClelland, M., Ahmer, B. M., "Virulence of 32 *Salmonella* strains in mice". *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e36043.
3. **Calva**, E., "Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública". Instituto de Biotecnología, UNAM.
4. **Moreno**, M.A.E., Tesis de "Estudio de la respuesta inmune e inducción de inmunidad generada por la porina *OmpS2* de *Salmonella enterica* serovar Typhi", in *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Sección de Investigación y Postgrado*. 2008, Instituto Politécnico Nacional: México, D. F. p. 1-74.
5. **Morpeth**, S.C., H.O. Ramadhani, and J.A. Crump, "Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa". *Clinical infectious diseases*, 2009. **49**(4): p. 606-11.
6. **Feasey**, N.A., Dougan Gordon, Kingsley Robert A., Heyderman Robert S., Gordon Melita A., "Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa". *The Lancet*, 2012. **379**(9835): p. 2489-2499.
7. **Zaidi**, M.B., C.L. Macías, and E. Calva, "Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2006. **48**(2): p. 121 - 125.
8. **Majowicz** S. E., M.J., Scallan E., Angulo F. J., Kirk M., O'Brien S. J., Jones T. F., Fazil A., Hoekstra R. M., "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis". *Clinical infectious diseases*, 2010. **50**(6): p. 882-9.
9. Centers for Disease, C.a.P., "Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 2008". *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2011. **60**(35): p. 1197-1202.
10. **Crump**, J.A., S.P. Luby, and E.D. Mintz, "The global burden of typhoid fever". *Bulletin of the World Health Organization*, 2004. **82**(5): p. 346-353.
11. **Chimalizeni**, Y., K. Kawaza, and E. Molyneux, "The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections". *Adv Exp Med Biol* 2010. **659**: p. 33-46.
12. **Reddy**, E.A., A.V. Shaw, and J.A. Crump, "Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis". *The Lancet Infectious Diseases*, 2010. **10**(6): p. 417-432.
13. **Wright** Jennifer G. , L.A.T., Kirk E. Smith, Jeff B. Bender, Rodney K. Frank, John H. Grendon, Daniel H. Rice, Ann Marie B. Thiessen, Catherine Jo Gilbertson, Sumathi Sivapalasingam, Timothy J. Barrett, Thomas E. Besser, Dale D. Hancock, Frederick J. Angulo, "Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium in Four Animal Facilities". *Emerging Infectious Diseases*, 2005. **11**(8): p. 1235-1241.
14. **Raffatellu** Manuela , R.P.W., Sebastian E. Winter, Andreas J. Bäumlner, "Clinical pathogenesis of typhoid fever". *J Infect Developing Countries* 2008. **2**(4): p. 260-266.
15. **Salazar-Gonzalez** R. M., N.J.H., Zammit D. J., Ravindran R., Srinivasan A., Maxwell J. R., Stoklasek T., Yadav R., Williams I. R., Gu X., McCormick B. A., Pazos M. A., Vella A. T., Lefrancois L., Reinecker H. C., McSorley S. J., "CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches". *Immunity*, 2006. **24**(5): p. 623-32.
16. **Mendoza**, M.G., Tesis de "Utilidad de las porinas de *Salmonella typhi* para desarrollar una prueba diagnóstica de fiebre tifoidea con alto grado de especificidad y sensibilidad", in *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Sección de Estudios de Posgrado e Investigación*. 2010, Instituto Politécnico Nacional: México, D.F.

17. **Broz, P.**, M.B. Ohlson, and D.M. Monack, "*Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen*". Gut Microbes, 2012. **3**(2): p. 62-70.
18. **Gordon, M.A.**, "*Invasive nontyphoidal Salmonella disease: epidemiology, pathogenesis and diagnosis*". Current opinion in infectious diseases, 2011. **24**(5): p. 484-9.
19. **Agbor, T.A.** and B.A. McCormick, "*Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection*". Cellular microbiology, 2011. **13**(12): p. 1858-69.
20. **Alvarez-Ordóñez A.**, B.M., Prieto M., Messens W., Lopez M., Bernardo A., Hill C., "*Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract*". Microbiology, 2011. **157**(Pt 12): p. 3268-81.
21. **Bueno S. M.**, R.S., Riedel C. A., Kalergis A. M., "*Mechanisms used by virulent Salmonella to impair dendritic cell function and evade adaptive immunity*". Immunology, 2012. **137**(1): p. 28-36.
22. **Levine, M.M.**, M.B. Sztein, and D.M.F. Pasetti., "*The immunological basis for immunization series: module 20: salmonella enterica serovar Typhi (typhoid) vaccines*", V.a.B. Department of Immunization, Editor. 2011: Switzerland.
23. **Rydstrom, A.** and M.J. Wick, "*Monocyte Recruitment, Activation, and Function in the Gut-Associated Lymphoid Tissue during Oral Salmonella Infection*". The Journal of Immunology, 2007. **178**: p. 5789-5801.
24. **Tam Miguel A.** , A.R., Malin Sundquist, Mary Jo Wick, "*Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more*". Immunological Reviews, 2008 **225**(1): p. 140–162.
25. **Ueda, Y.**, M. Kondo, and G. Kelsoe, "*Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow*". The Journal of experimental medicine, 2005. **201**(11): p. 1771-80.
26. **Serbina, N.V.** and E.G. Pamer, "*Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*". Nature immunology, 2006. **7**(3): p. 311-7.
27. **Kirby, A.C.**, U. Yrlid, and M.J. Wick, "*The Innate Immune Response Differs in Primary and Secondary Salmonella Infection*". The Journal of Immunology, 2002. **169**: p. 4450-4459.
28. **Dougan Gordon, V.J.**, Sophie Palmer, Pietro Mastroeni, "*Immunity to salmonellosis*". Immunological Reviews, 2011. **240**(1): p. 196-210.
29. **Sinha Katharine** , P.M., Julia Harrison, Raquel Demarco, Carlos E. Hormaeche, "*Salmonella typhimurium aroA, htrA, and aroD htrA Mutants Cause Progressive Infections in Athymic (nu/nu) BALB/c Mice*". Infection and Immunity, 1997. **65**(4): p. 1566-1569.
30. **Lo Wei-Feng, H.O.**, Eleanor S. Metcalf, Mark J. Soloski, "*T Cell Responses to Gram-Negative Intracellular Bacterial Pathogens: A Role for CD8 T Cells in Immunity to Salmonella Infection and the Involvement of MHC Class Ib Molecules*". The Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 5398-5406.
31. **Mastroeni Pietro, C.S.**, R. Fowler, C. E. Hormaeche, G. Dougan, "*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*". Infection and Immunity, 2000. **68**(1): p. 46–53.
32. **Hess J, C.L.**, D Miko, S H Kaufmann, "*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, 1996 **156**: p. 3321-6.
33. **Mastroeni Pietro, B.V.-R.**, Carlos E. Hormaeche, "*Adoptive Transfer of Immunity to Oral Challenge with Virulent Salmonellae in Innately Susceptible BALB/c Mice Requires Both Immune Serum and T Cells*". Infection and Immunity, 1993. **61**(9): p. 3981-3984.

34. **McSorley** Stephen J., S.A., Massimo Costalonga, R. Lee Reinhardt, Marc K. Jenkins, "Tracking Salmonella-Specific CD4 T Cells In Vivo Reveals a Local Mucosal Response to a Disseminated Infection". Immunity, 2002. **16**: p. 365-377.
35. **Siegemund** S., S.N., Schulz S., Wolk K., Nasilowska K., Straubinger R. K., Sabat R., Alber G., "Differential IL-23 requirement for IL-22 and IL-17A production during innate immunity against Salmonella enterica serovar Enteritidis". International immunology, 2009. **21**(5): p. 555-65.
36. **Cookson**, B. and B. MJ, "Identification of a natural T cell epitope presented by Salmonella-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice". J Immunol 1997 **158**(9): p. 4310-9.
37. **Cunningham** Adam F., F.G., Karine Serre, Elodie Mohr, Ian R. Henderson, Anthony Scott-Tucker, Sinead M. Kenny, Mahmood Khan, Kai-Michael Toellner, Peter J. L. Lane, Ian C. M. MacLennan, "Salmonella Induces a Switched Antibody Response without Germinal Centers That Impedes the Extracellular Spread of Infection". The Journal of Immunology, 2007. **178**: p. 6200-6207.
38. **Bueno** Susan M., P.A.G., J. Reid Schwebach, Alexis M. Kalergis, "T cell immunity evasion by virulent Salmonella enterica". Immunology Letters, 2007. **111**(1): p. 14-20.
39. **Ugrinovic** S., M.N., Goh N., Mastroeni P., "Characterization and Development of T-Cell Immune Responses in B-Cell-Deficient (Igh-6-/-) Mice with Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection". Infection and Immunity, 2003. **71**(12): p. 6808-6819.
40. **Siggins** M. K., C.A.F., Marshall J. L., Chamberlain J. L., Henderson I. R., MacLennan C. A., "Absent bactericidal activity of mouse serum against invasive African nontyphoidal Salmonella results from impaired complement function but not a lack of antibody". Journal of immunology, 2011. **186**(4): p. 2365-71.
41. **Secundino** I., L.-M.C., Cervantes-Barragan L., Gil-Cruz C., Rios-Sarabia N., Pastelin-Palacios R., Villasis-Keever M. A., Becker I., Puente J. L., Calva E., Isibasi A., "Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response". Immunology, 2006. **117**(1): p. 59-70.
42. **Arockiasamy** A., M.G.S., Rukmini M. R., Sundara Baalaji N., Katpally U. C., Krishnaswamy S., "Conformational epitope mapping of OmpC, a major cell surface antigen from Salmonella typhi". Journal of structural biology, 2004. **148**(1): p. 22-33.
43. **Secundino-Velázquez**, I., Tesis de "Estudio de los mecanismos de inmunidad humoral y protección inducidos por las porinas OmpC y OmpF de Salmonella enterica serovar Typhi". 2006, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F. .
44. **Nikaido**, H., "Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membranes". The Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(6): p. 3905-3908.
45. **Arockiasamy**, A. and S. Krishnaswamy, "Crystallization of the immunodominant outer membrane protein OmpC; the first protein crystals from Salmonella typhi, a human pathogen". FEBS Letters () 1999. **453** p. 380^382.
46. **Arockiasamy**, A. and S. Krishnaswamy, "Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from Salmonella typhi for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein". Analytical biochemistry, 2000. **283**(1): p. 64-70.
47. **Tamm**, L.K., A. Arora, and J.H. Kleinschmidt, "Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins". The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(35): p. 32399-402.
48. **Kissel** Vincent, C.G., Miriam astudillo, Andre Godard, Brenda Wachman, Felipe C. Cabello, "Salmonella-Specific Monoclonal Antibodies against Recombinant Salmonella typhi 36-Kilodalton Porin". Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1994. **1**(2): p. 250-252.

49. **Beher**, M.G., C.A. Schnaitman, and A.P. Pugsley, "Major Heat-Modifiable Outer Membrane Protein in Gram-Negative Bacteria: Comparison with the OmpA Protein of *Escherichia coli*". Journal of Bacteriology, 1980. **143**(2): p. 906-913.
50. **Freudl**, R. and S.T. Cole, "Cloning and Molecular Characterization of the ompA Gene from *Salmonella typhimurium*". Eur. J. Biochem., 1983. **134**: p. 497- 502
51. **Bentley**, A.T. and P.E. Klebba, "Effect of Lipopolysaccharide Structure on Reactivity of Antiporin Monoclonal Antibodies with the Bacterial Cell Surface". Journal of Bacteriology, 1988. **170**(3): p. 1063-1068.
52. **Frohlich** K. S., P.K., Berger A. A., Vogel J., "A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD". Nucleic acids research, 2012. **40**(8): p. 3623-40.
53. **Meyer** Paul N., M.R.W.-R., Christos Stathopoulos, Roy Curtiss, "Virulence of a *Salmonella typhimurium* OmpD Mutant". Infection and Immunity, 1998. **66**(1): p. 387-390.
54. **Santiviago** C. A., T.C.S., Hidalgo A. A., Youderian P., Mora G. C., "Global Regulation of the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Major Porin, OmpD". Journal of Bacteriology, 2003. **185**(19): p. 5901-5905.
55. **Singh** R., S.A.K., Aggarwal A., Sinha S., Sisodia B. S., Khanuja S. P., Misra R., "Low molecular weight proteins of outer membrane of *Salmonella typhimurium* are immunogenic in *Salmonella* induced reactive arthritis revealed by proteomics". Clinical and experimental immunology, 2007. **148**(3): p. 486-93.
56. **Gil-Cruz** C., B.S., Marshall J. L., Kingsley R. A., Ross E. A., Henderson I. R., Leyton D. L., Coughlan R. E., Khan M., Jensen K. T., Buckley C. D., Dougan G., MacLennan I. C., Lopez-Macias C., Cunningham A. F., "The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a protective B1b cell antibody response". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(24): p. 9803-8.
57. **Szabo** D., S.F., Hujer A. M., Bonomo R. A., Hujer K. M., Marsh J. W., Bethel C. R., Doi Y., Deeley K., Paterson D. L., "Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*". Antimicrobial agents and chemotherapy, 2006. **50**(8): p. 2833-5.
58. **Palma** M., Z.J., Ferreras J. A., Worgall S., Larone D. H., Shi L., Campagne F., Quadri L. E., "*Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response". Infection and immunity, 2005. **73**(5): p. 2958-66.
59. **Santiviago** Carlos A., C.S.T., Sergio A. Bucarey, Guido C. Mora, "A chromosomal region surrounding the ompD porin gene marks a genetic difference between *Salmonella typhi* and the majority of *Salmonella* serovars". Microbiology 2001. **147**: p. 1897-1907.
60. **Singh** Shiva P., Y.U., Tariq Abdullah, Shree R. Singh, Phillip E. Klebba, "Structural Relatedness of Enteric Bacterial Porins Assessed with Monoclonal Antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC". Journal of Bacteriology, 1992. **174**(6): p. 1965-1973.
61. **Singh** Shiva P., S.M., Yvonne U. Williams, Kenneth E. Rudd, Hiroshi Nikaido, "Immunochemical structure of the OmpD porin from *Salmonella typhimurium*". Microbiology 1996. **142**: p. 3201-3210.
62. **Hu** W. S., C.H.W., Zhang R. Y., Huang C. Y., Shen C. F., "The expression levels of outer membrane proteins STM1530 and OmpD, which are influenced by the CpxAR and BaeSR two-component systems, play important roles in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011. **55**(8): p. 3829-37.
63. **Santiviago** Carlos A., J.A.F., Susan M. Bueno, A. Nicole Trombert, Alejandro A. Hildago, L. Teresa Socias, Philip Youderian, Guido C. Mora, "The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium

- smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen". Molecular Microbiology, 2002. **46**(3): p. 687-698.
64. **Isibasi** Armando, V.O., Martin Vargas, Jorge Paniagua, Cesar Gonzalez, Jose Moreno, Jesus Kumate, "Protection against *Salmonella typhi* Infection in Mice after Immunization with Outer Membrane Proteins Isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi". Infection and Immunity, 1988. **56**(11): p. 2953-2959.
 65. **Singh** Mantej, H.V., Lata Kumar, Nirmal K. Ganguly, "Induction of systemic and mucosal immune response in mice immunised with porins of *Salmonella typhi*". J. Med. Microbiol, 1999. **48** p. 79-88.
 66. **Ortiz** Vianney, A.I., Ethel García- Ortigoza, Jesus Kumate, "Immunoblot Detection of Class-Specific Humoral Immune Response to Outer Membrane Proteins Isolated from *Salmonella typhi* in Humans with Typhoid Fever". Journal of clinical microbiology, 1989. **27**(7): p. 1640-1645.
 67. **Calderón** Inés, S.R.L., Héctor A. Rojas, Carmen Palomino, Luis H. Rodríguez, Guido C. Morai, "Antibodies to Porin Antigens of *Salmonella typhi* Induced during Typhoid Infection in Humans". Infection and Immunity, 1986. **52**(1): p. 209-212.
 68. **Udhayakumar**, V. and V.R. Muthukkaruppan, "An Outer Membrane Protein (Porin) as an Eliciting Antigen for Delayed-Type Hypersensitivity in Murine Salmonellosis". Infection and Immunity, 1987. **55**(3): p. 822-824.
 69. **Salazar-Gonzalez** R. M., M.-B.C., Ramirez-Cruz N. E., Rios-Sarabia N., Beltran-Nava J., Castanon-Gonzalez J., Castillo-Torres N., Palma-Aguirre J. A., Carrera-Camargo M., Lopez-Macias C., Isibasi A., "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". Immunology letters, 2004. **93**(2-3): p. 115-22.
 70. **Nandakumar**, K.S., V. Palanivel, and V. Muthukkaruppan, "Diagnosis of typhoid fever: detection of *Salmonella typhi* porins-specific antibodies by inhibition ELISA". Clin Exp Immunol 1993. **94**: p. 317-321.
 71. **Verma**, S.K., Vandana Gautam, Konduru Balakrishna, Subodh Kumar, "Overexpression, Purification, and Immunogenicity of Recombinant Porin Proteins of *Salmonella enterica* Serovar Typhi (*S. Typhi*)". Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **19**(9): p. 1034-1040.
 72. **Kodama**, C. and H. Matsui, "*Salmonella* Flagellin Is Not a Dominant Protective Antigen in Oral Immunization with Attenuated Live Vaccine Strains". Infection and Immunity, 2004. **72**(4): p. 2449-2451.
 73. **Bobat** S., F.-L.A., Hitchcock J., Marshall J. L., Kingsley R. A., Goodall M., Gil-Cruz C., Serre K., Leyton D. L., Letran S. E., Gaspal F., Chester R., Chamberlain J. L., Dougan G., Lopez-Macias C., Henderson I. R., Alexander J., MacLennan I. C., Cunningham A. F., "Soluble flagellin, *FliC*, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of *Salmonella typhimurium* infection". European journal of immunology, 2011. **41**(6): p. 1606-18.
 74. **Lee**, S.J., H. O'Donnell, and S.J. McSorley, "B7-H1 (programmed cell death ligand 1) is required for the development of multifunctional Th1 cells and immunity to primary, but not secondary, *Salmonella* infection". Journal of immunology, 2010. **185**(4): p. 2442-9.
 75. **Svenson**, S.B. and A.A. Lindberg, "Artificial *Salmonella* Vaccines: *Salmonella typhimurium* O-Antigen-Specific Oligosaccharide-Protein Conjugates Elicit Protective Antibodies in Rabbits and Mice". Infection and Immunity, 1981. **32**(2): p. 490-496.
 76. **Hanedaa** Takeshi, N.O., Yuji Kikuchi, Masami Takagi, Tetsuro Kurotaki, Tsuyoshi Miki, Setsuo Arai, Hirofumi Danbara, "Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and

- Choleraesuis slyA mutant strains for use in live attenuated oral vaccines". Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2011. **34** (5): p. 399-409.*
77. **Lee** Seung-Joo, L.L., Silvia Juarez, Minelva R. Nanton, Esther N. Gondwe, Chisomo L. Msefula, Matthew A. Kayala, Francesca Necchi, Jennifer N. Heath, Peter Hart, Renée M. Tsolis, Robert S. Heyderman, Calman A. MacLennan, Philip L. Felgner, D. Huw Davies, Stephen J. McSorley, "Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis". PNAS, 2012 **109** (13): p. 4998-5003.
 78. **MacLennan** C. A., G.J.J., Gordon M. A., Cunningham A. F., Cobbold M., Goodall M., Kingsley R. A., van Oosterhout J. J., Msefula C. L., Mandala W. L., Leyton D. L., Marshall J. L., Gondwe E. N., Bobat S., Lopez-Macias C., Doffinger R., Henderson I. R., Zijlstra E. E., Dougan G., Drayson M. T., MacLennan I. C., Molyneux M. E., "Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal Salmonella in HIV-infected African adults". Science, 2010. **328**(5977): p. 508-12.
 79. **Nikaido**, H., "Isolation of Outer Membranes". Methods in Enzymology, 1994. **235**: p. 225-234.
 80. **Lee**, D.R. and C.A. Schnaitman, "Comparison of Outer Membrane Porin Proteins Produced by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*". Journal of Bacteriology, 1980. **142**(3): p. 1019-1022.
 81. **Isibasi** Armando, V.O.-N., Jorge Paniagua, Rosana Pelayo, César R. González, JoséA. García, Jesús Kumate, "Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins". Vaccine, 1992. **10**(12): p. 811-813.
 82. **Hamid**, N. and S.K. Jain, "Characterization of an outer membrane protein of *Salmonella enterica* serovar typhimurium that confers protection against typhoid". Clinical and vaccine immunology 2008. **15**(9): p. 1461-71.
 83. **Selke** M., M.J., Springer S., Frank R., Gerlach G. F., "Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine". Infection and immunity, 2007. **75**(5): p. 2476-83.
 84. **Cervantes-Barragan** L., G.-C.C., Pastelin-Palacios R., Lang K. S., Isibasi A., Ludewig B., Lopez-Macias C., "TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to *Salmonella typhi* antigens". European journal of immunology, 2009. **39**(1): p. 126-35.