



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ompA* DE *Salmonella*
enterica serovar Enteritidis EN CULTIVO DE CÉLULAS HeLa
TRANSFECTADAS CON pIHD428

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

RODRIGO CRUZ BAUTISTA

Asesores:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA



MÉXICO, D.F.

2016



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.

DEDICATORIAS

A mi familia que siempre me ha apoyado en todo a pesar de las adversidades.

A mi madre Juliana por estar conmigo siempre. Por su comprensión y amor incondicional.

A mi padre Rodrigo por procurar lo mejor para mí y la familia, por ser mi inspiración para siempre buscar ser mejor.

A mi hermano Mario con quien compartí y aprendí de la vida. También me ha enseñado a ser perseverante.

A mi hermanita Carolina que con su alegría y entusiasmo me hace recordar que la vida es para disfrutar.

A Zulema con quien he compartido esta importante etapa de mi vida. Gracias por tu amor, compañía y apoyo, en las buenas y en las malas.

Han sido parte importante de este logro, gracias por ser parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, la FMVZ, el Departamento de Microbiología e Inmunología y al Laboratorio de Microbiología Molecular, quienes me formaron en el ámbito profesional y personal, que me dieron la oportunidad de iniciar y culminar este proyecto.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez que me abrió las puertas de su laboratorio y depositó su confianza en mí, no solo para este proyecto sino para otros más que me sirvieron para fortalecer mi formación académica y personal.

Al Dr. Francisco Basurto Alcántara que siempre estuvo dispuesto a resolver mis dudas y por aconsejarme durante la realización de mi proyecto.

A la Dra. Inda Marcela Ochoa y al Dr. Alfredo Castañeda quienes siempre me escucharon y orientaron durante mis presentaciones y fuera de ellas. Por compartir su conocimiento conmigo.

Al Dr. Ricardo Oropeza, gracias por permitirme trabajar en su laboratorio, por tomarse el tiempo para leer y resolver mis dudas. Fueron un gran aporte para este trabajo.

A la Dra. Gabriela Gómez y al Dr. Félix Sánchez, parte de mi jurado. Por su tiempo, conocimiento y dedicación para las correcciones de este trabajo.

Al a Dra. Grisel Anaya que me dio la oportunidad de iniciarme como docente y su grupo de trabajo, Juan, Mari y Araceli.

A la Dra. Fabiola Gómez que siempre me apoyo durante mi actividad docente y en mi proyecto de tesis.

A mis amigos del LMM, Cloé, Julio, Liliana, Nathlleli, Salvador y Thalia que además de escucharme y opinar sobre mi trabajo me ayudaron durante la fase experimental de distintas maneras. Cada uno a su manera me regaló su amistad, la cual aprecio mucho.

A la Dra. Rosa Elena Miranda que mientras me desempeñé como ayudante de profesor y durante mi trabajo de investigación.

A los integrantes Departamento de Microbiología e Inmunología, la Dra. Maritoña Mojica, Dr. Daniel Atilano, Dr. Raúl Segura, Dr. Raymundo Iturbe, Dra. Cristina Rodríguez, Dra. Laura Cobos, Alfredo Cortés, Uriel González, Nancy, Angelina y todos los que durante mi servicio social y el proceso para obtener mi licenciatura me ayudaron de alguna u otra manera.

A mis amigos de la carrera, que siempre estuvieron conmigo a pesar todo, siempre estuvieron ahí: Ángela, Bárbara, Carlos, Ceci, Gustavo, Luisa, Rafael y Rocher.

A mis amigos Oscar Perea y Carlos Martínez, gracias por hacerme olvidar del estrés cuando el trabajo me absorbía.

Directa o indirectamente fueron parte de este logro, gracias.

Contenido

1. Introducción	2
1.1 Salmonelosis	2
1.1.1 Epidemiología	2
1.1.2 Impacto económico	5
1.1.3 Género <i>Salmonella</i>	6
1.1.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis	7
1.1.5 Patogenia.....	7
1.1.6 Mecanismos moleculares de patogenicidad	9
1.1.7 Signología	13
1.1.8 Lesiones a la necropsia.....	13
1.1.9 Prevención y control	14
1.2 Proteínas de membrana externa	15
1.2.1 Proteína de Membrana Externa A (OmpA)	15
1.3 Inmunidad contra <i>Salmonella</i>	17
1.4 Vacunas de ADN	18
2. Justificación.....	22
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	23
4.1 Objetivos específicos	23
5. Material y Métodos	24
5.1 Elaboración de células electro competentes (<i>Escherichia coli</i> DH5 α)	24
5.2 Electroporación de células <i>E. coli</i> DH5 α con pIHD428.....	24
5.3 Extracción de plásmido por el método de lisis alcalina	25
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen <i>ompA</i>	26
5.5 Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la construcción.....	27
5.6 Extracción de plásmido para transfección	28
5.7 Cultivo de la línea celular HeLa	29
5.8 Transfección de células	29
5.9 Comprobación de la transfección	30
5.10 Obtención de proteínas de membrana externa de <i>Salmonella</i> Enteritidis	31
5.11 Obtención de las proteínas de la monocapa y el sobrenadante	32

5.12 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	33
5.13 Análisis de la expresión por la técnica de Western Blot	33
5.14 Determinación de la concentración mínima de proteínas detectables en el Western Blot.....	35
6. Resultados.....	36
6.1 Obtención del plásmido pIHD428	36
6.2 Comprobación de la presencia de <i>ompA</i> en pIHD428.....	37
6.3 Comprobación de la identidad de pIHD428 utilizando ensayos con enzimas de restricción	37
6.4 Extracción de plásmido para la transfección	40
6.5 Establecimiento de la línea celular HeLa	40
6.6 Comprobación de la transfección.....	41
6.7 Proteínas de membrana externa de <i>Salmonella</i> Enteritidis	46
6.8 Sensibilidad del Western Blot.....	47
6.9 Detección de OmpA en monocapa de células HeLa y su sobrenadante.....	48
7. Discusión	53
8. Conclusiones	57
9. Prospectivas	57
10. Referencias	58
Anexo 1. Medios de Cultivo.....	70
Anexo 2. Soluciones.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. Patogenia de Salmonella en aves.....	8
Figura 2. Mecanismos moleculares de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	12
Figura 3. Estructura tridimensional de OmpA.....	16
Figura 4. Vector con elementos para una vacunas de ADN.....	20
Figura 5. Condiciones para PCR de <i>ompA</i>	27
Figura 6. Mapa de pIHD428.....	28
Figura 7. pIHD428 digerido con <i>HindIII</i>	36
Figura 8. PCR de <i>ompA</i> a partir de pIHD428.....	37
Figura 9. Predicción <i>in silico</i> de la digestión de pIHD428 con <i>EcoRV</i> , <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i>	38
Figura 10. Digestión de pIHD428 con <i>EcoRV</i> , <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i>	39
Figura 11. Extracción de pIHD428 con kit comercial.....	40
Figura 12. Cultivo de células HeLa.....	41
Figura 13. Extracción de ADN episomal de células HeLa.....	41
Figura 14. Productos de PCR de <i>ompA</i> a partir de ADN episomal de células HeLa.....	42
Figura 15. Ensayo de restricción <i>in silico</i> de los productos de PCR a partir de ADN episomal de células HeLa con <i>BamHI</i>	43
Figura 16. Digestión de los productos de PCR a partir de ADN episomal de células HeLa con <i>BamHI</i>	43
Figura 17. Ensayo de restricción <i>in silico</i> de los productos de PCR a partir de ADN episomal de células HeLa con <i>EcoRV</i>	44
Figura 18. Digestión de los productos de PCR a partir de ADN episomal de células HeLa con <i>EcoRV</i>	44
Figura 19. <i>Western Blot</i> , OMPs de SE.....	45
Figura 20. Gel de poliacrilamida. Diluciones de OMPs.....	46
Figura 21. <i>Western Blot</i> , diluciones de OMPs.....	47
Figura 22. Gel de poliacrilamida. Proteínas de células transfectadas (24 h).....	48
Figura 23. <i>Western Blot</i> , células transfectadas (24 h).....	49
Figura 24. Gel de poliacrilamida. Proteínas de células transfectadas (48 h).....	49
Figura 25. <i>Western Blot</i> , células transfectadas (48 h).....	50
Figura 26. Gel de poliacrilamida. Proteínas de células transfectadas (72 h).....	50

Figura 27. Western Blot, células transfectadas (24 h).....51

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas de las vacunas de ADN.....19

Tabla 2. Iniciadores de *ompA*.....26

Tabla 3. Concentración de proteína en las diluciones seriadas de OMPs.....35

Abreviaturas

cm ²	Centímetros cuadrados
°C	Grados Celsius
g	Gramos
<i>g</i>	Gravedades
h	Hora
kDa	KiloDaltones
kg	Kilogramos
kV	KiloVolts
Lb	Libras
L	Litros
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
μL	Microlitro
μF	MicroFaraday
min	Minuto
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
Ω	Ohms
pb	Pares de bases
pM	Picomolar
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
U	Unidades
v/v	Volumen/volumen
V	Volts
%	Porcentaje

Resumen

Cruz-Bautista Rodrigo. Determinación de la expresión del gen *ompA* de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en cultivo de células HeLa transfectadas con pIHD428. (Bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y Dr. Francisco Basurto Alcántara)

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial causada por bacterias del género *Salmonella* que afecta mamíferos, aves, anfibios y reptiles. La Organización Mundial de la Salud, la *U. S. Food and Drug Administration* y la *European Food Safety Authority* la consideran una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos. Reportan que *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) es la principal serovariedad asociada a la enfermedad en humanos, siendo la principal fuente de infección el huevo y sus subproductos. La proteína OmpA de SE es una proteína integral de membrana con un peso molecular aproximado de 34 kDa. Las células de la respuesta inmune innata reconocen estructuras moleculares en las células microbianas conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) que se unen a los receptores para PAMPs como por ejemplo los receptores *Toll-like*. La proteína OmpA posee PAMPs que pueden iniciar una respuesta inmune adaptativa. Se ha comprobado la producción de anticuerpos contra OmpA durante la infección, inoculando la bacteria completa y la proteína sola. Al medir la cantidad de anticuerpos producidos se observa que hay una alta frecuencia de sueros reactivos positivos a porinas, LPS y OmpA. Las vacunas de ADN consisten en vectores plasmídicos que codifican para proteínas antigénicas y que pueden ser transfectadas en células animales *in vivo*. Actualmente se utilizan para producir una respuesta inmune humoral y celular protectora en una amplia variedad de modelos animales preclínicos, para enfermedades virales, bacterianas y parasitarias. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de la proteína OmpA de SE mediante *Western Blot*, transfectando células HeLa con una construcción del vector pVAX1® con el gen que codifica para esta proteína (pIHD428) utilizando Lipofectamina®. Se demostró mediante la extracción de ADN episomal de células HeLa y PCR que las cantidades necesarias para transfectar bajo las condiciones mencionadas en este trabajo son: 25 µg de Lipofectamina® y 10 µg de ADN. Las células transfectadas fueron cosechadas a las 24, 48 y 72 h junto con los sobrenadantes para obtener y precipitar las proteínas totales; así mismo se emplearon dos métodos para la obtención de proteínas de la monocapa: lisis mecánica y la utilización de un buffer de lisis seguido de la precipitación con ácido tricloroacético. Las proteínas totales se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes mediante electroforesis. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa donde se enfrentaron a anticuerpos policlonales contra OMPs de SE y un anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG de conejo. No se detectó la expresión de OmpA tanto en monocapa como en sobrenadante, en ninguno de los tiempos, así como en ninguno de los tratamientos realizados a las muestras.

1. Introducción

1.1 Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial causada por el género *Salmonella* que afecta mamíferos, aves, anfibios y reptiles.^{1, 2}

La Organización Mundial de la Salud (OMS), la *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Food Safety Authority* (EFSA) la consideran una de las principales causas de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).^{1, 3, 4} Varios alimentos se han implicado en los brotes debidos a *Salmonella enterica*; sin embargo, los alimentos de origen animal, y específicamente los productos y subproductos de la avicultura incluyendo carne y huevo, se han visto implicados en mayor medida.^{5, 6} Los principales serotipos asociados a ETAs son *Salmonella entérica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) y serovar Typhimurium (ST).^{1, 5, 6} En humanos estos serotipos provocan gastroenteritis que puede ir de media a grave caracterizada por diarrea, fiebre, dolor abdominal y deshidratación.^{1, 7} En algunos pacientes se puede presentar bacteremia y septicemia.⁸ En aves se desarrolla la llamada paratifoidea que en casos agudos provoca la muerte súbita. En los crónicos las aves presentan diarrea fétida de color amarillento, pérdida del apetito, debilidad y disminución en la ganancia de peso y postura de huevo.^{9, 10}

1.1.1 Epidemiología

Los registros de casos en animales en la mayor parte del mundo se limitan a reportes clínicos sin aislamientos que corroboren la presencia de la bacteria.

La EFSA y el *United States Department of Agriculture* (USDA) a través de *The National Veterinary Services Laboratories* (NVSL) llevan registros del número de aislamientos y cepas presentes en humanos, así como, en distintas especies animales anualmente.

En el reporte de la EFSA publicado en enero de 2015 se reportó que durante el año 2013 se aisló *Salmonella spp.* del 3.1% de todas las aves de producción (engorda y postura), el 2.6% de las gallinas de postura fueron positivas a *Salmonella spp.* y la prevalencia de SE y ST en gallinas de postura fue de 0.78% y 0.22% respectivamente.⁵ Por otra parte los NVSL reportan en 2014 que durante 2013 SE y ST fueron las principales serovariedades aisladas en aves, representando el 74.6% y 1.3%, respectivamente en muestras clínicas de aves y 47.6% y 27% en muestras no clínicas.¹²

En México solamente se elaboran reportes clínicos que sugieren la infección por *Salmonella* y solo en algunos casos se llega al aislamiento pero no se llega a la clasificación en serotipos o fagotipos.¹¹ En 2004 por primera vez en el país el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) llevó a cabo la fagotipificación de 73 aislamientos confirmados por serotipificación de SE provenientes de la avicultura en los estados de Coahuila, Durango, Edo. de México, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro. Gracias a la determinación de la susceptibilidad de serovariedades de *Salmonella* a ciertos bacteriófagos se pueden agrupar en fagotipos, para propósitos epidemiológicos se asume que aquellos aislamientos que pertenecen al mismo fagotipo tienen relación epidemiológica entre sí. En este estudio, 14 se identificaron como fagotipo 4 (aislados de reproductoras y pollo de engorda) y 29 como fagotipo 8 (aisladas de

progenitoras, reproductoras, gallinas de postura comercial, pollo de engorda, nacedoras y huevo).¹¹

Mundialmente, la OMS, estima decenas de millones de casos de salmonelosis en humanos cada año que resultan en cientos de miles de muertes.¹ Desde principios de los años 90's han surgido cepas resistentes a antimicrobianos y que han hecho que sea considerada actualmente como un serio problema de salud pública.¹³

A partir de 1980 se produjo un aumento mundial de casos de infecciones por SE en humanos. La EFSA reporta 82,694 casos de salmonelosis confirmados en humanos durante 2013; SE fue la principal serovariedad asociada a la enfermedad en humanos que se infectaron al consumir huevo y sus subproductos, representando el 44.9% del total de los brotes. Otros productos involucrados son dulces y chocolates (10.5%), carne de cerdo (8.9%), carne de pollo (5.1%), pan (5.1%), carne de bovino (1.6%), productos marinos (1.0%) y vegetales (0.6%) entre otros. Durante este mismo periodo el 0.1% del huevo para consumo fue positivo a *Salmonella* spp.⁵

Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) reportaron 45,828 casos de salmonelosis en humanos durante el 2011 y 49,004 en 2012, de estos, SE también fue reportada como la principal serovariedad.¹²

En México la Dirección General de Epidemiología (DGE) reporta los casos de salmonelosis en tres rubros: fiebre tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis. En enero de 2015, hasta la semana 53 de 2014 se reportaron 70,743 casos de salmonelosis, pero no se identifican las especies y serotipos involucrados.¹⁴ Sin embargo, sí se ha hecho un estudio de serotipificación en humanos, en el cual de 24,349 cepas de *Salmonella* aisladas de humanos entre 1972 y 1999 se identificaron 199 serotipos donde el más común fue ST y en segundo lugar SE.

También se determinó que SE fue el serotipo más frecuentemente aislado desde 1991.¹⁵

1.1.2 Impacto económico

Las principales pérdidas económicas están asociadas a la cantidad de huevo para consumo humano que se dejan de producir. Aves de postura aparentemente sanas pueden disminuir su producción anual de 10 a 20%.⁹ México es uno de los principales productores de huevo a nivel mundial ocupando el sexto lugar detrás de China, Estados Unidos, India Japón y Rusia. Para el año 2014 se produjeron 2,994,254 toneladas de huevo para plato siendo el consumo *per capita* de 22 Kg, esto posiciona a México como el primer lugar en consumo de huevo fresco a nivel mundial. La industria avícola participó en el 63% de la actividad pecuaria del país, del cual el 29% corresponde a la producción de huevo.¹⁶ Además, la contaminación del huevo puede representar problemas para el comercio nacional e internacional. Se ha demostrado que existe una mayor susceptibilidad de las líneas ligeras de gallinas de postura a la infección por SE en contraste con las líneas pesadas para producción de carne.⁷⁸ En 2004 se determinó la presencia de *Salmonella* Enteritidis en el huevo para consumo en la Ciudad de México. Se muestrearon 400 huevos de 10 marcas. Se obtuvieron 131 aislamientos de 12 géneros bacterianos y uno de SE a partir de yema. Esto representó 0.25% de las muestras.¹⁷ También es importante considerar los gastos excesivos que representan la prevención, control y erradicación de la enfermedad en aves y humanos. La baja incubabilidad y fertilidad del huevo trae pérdidas económicas puesto que además de que los pollitos pueden

nacer enfermos se ve afectada la capacidad de reemplazo de aves para postura y pollo de engorda.¹⁸

1.1.3 Género *Salmonella*

Actualmente se usan diferentes sistemas para referirse a la nomenclatura del género *Salmonella*. Ha evolucionado del concepto inicial de un serotipo – una especie propuesto por Kauffmann identificando serológicamente el antígeno “O” (somático) y “H” (flagelar). Existen otros relacionados con las características clínicas de las bacterias, características bioquímicas que dividen a los géneros en subgéneros y más recientemente con la relación genómica entre ellas.^{19, 20} El sistema más aceptado es utilizado por el CDC y es recomendado por la OMS; este divide al género *Salmonella* en dos especies: *enterica* y *bongori*. A su vez, la especie *enterica* se subdivide en 6 subespecies, *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI).^{21, 22}

La subespecie *enterica* actualmente incluye a más de 2500 serovariedades las cuales se escriben sin itálicas y con la primera letra en mayúscula. Sus nombres generalmente se refieren al área geográfica donde fueron aisladas por primera vez.²²

El género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, móviles por flagelos peritricos y anaerobios facultativos que poseen tres antígenos principales: H (flagelo), O (somático) y Vi (capsular), éste último solo lo poseen algunas serovariedades como *Salmonella* Typhi. Fermentan la glucosa frecuentemente con producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, descarboxilan lisina y ornitina, y son negativos a la

prueba de oxidasa.²³

1.1.4 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella Enteritidis es un serotipo altamente prevalente en aves de engorda y de postura. Es la principal serovariedad asociada a casos de salmonelosis en humanos que contraen la enfermedad al consumir alimentos contaminados alrededor del mundo. Estudios epidemiológicos indican como principales fuentes al huevo y sus subproductos. El huevo puede estar contaminado por la parte externa del cascarón o al interior.^{5, 6, 12, 13}

1.1.5 Patogenia

Existen dos vías de transmisión en aves para *Salmonella* Enteritidis, la horizontal y la vertical (**Figura 1**).

La transmisión horizontal es fecal – oral y se da a través del contacto con heces de animales o humanos infectados. Una vez que la bacteria ha sido ingerida pasa a través del esófago, llega al proventrículo y molleja (estómago muscular) donde debido a la acción de varios mecanismos moleculares sobrevive a las condiciones ácidas y a enzimas como la pepsina. Después recorre el intestino delgado pasando por el duodeno, yeyuno e íleon, siendo esta última región donde la bacteria adquiere un contacto estrecho con los enterocitos mediada por estructuras bacterianas conocidas como adhesinas. También puede colonizar los ciegos en el intestino grueso. Una vez adherida a las células inicia un proceso de internación mediante la modificación del citoesqueleto de células no fagocíticas, durante este proceso y la

sobrevivencia dentro de las vacuolas, la bacteria lleva a cabo la liberación de endotoxinas, su translocación a la lámina propia del intestino, el disparo de una respuesta quimiotáctica, inflamación y la destrucción del tejido. Estos eventos llevan a la producción de IL-8, la migración de polimorfonucleares (PMN) y a la pérdida de líquidos provocando diarrea. Cuando hay lisis de las células del epitelio, las bacterias son liberadas y son arrastradas por líquidos y/o heces hacia el exterior. El daño en el intestino impide una correcta absorción de líquidos y nutrientes lo que lleva al animal a una disminución en sus parámetros reproductivos, depresión e incluso puede ocasionarle la muerte.⁷⁹ En el caso de los portadores asintomáticos la bacteria es secretada a través de las secreciones de la vesícula biliar y finalmente en las heces. Se sabe que el huevo puede ser contaminado de manera horizontal cuando es ovopositado y entra en contacto con heces que se encuentran en el exterior.²³

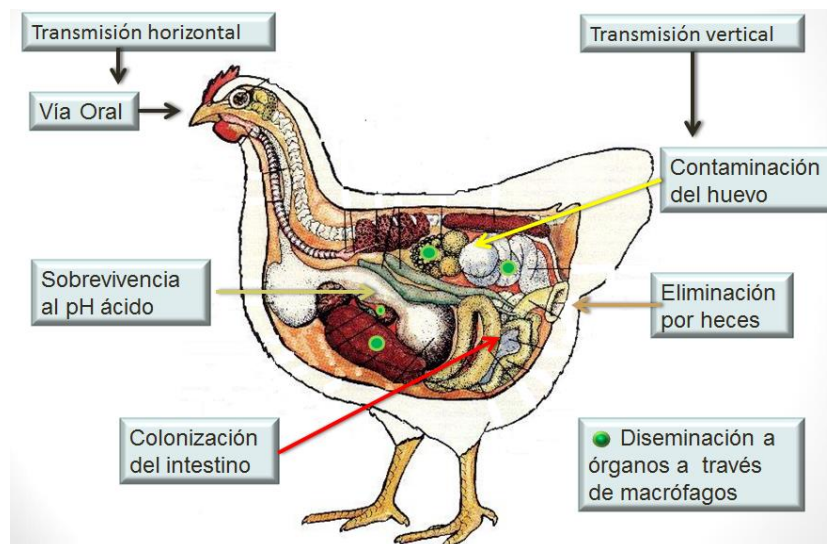


Figura 1. Esquema donde se muestra la patogenicidad de *Salmonella* Enteritidis en aves. Vía de transmisión vertical y horizontal. (Modificado de Jaime PA.)

La vía vertical se refiere a la infección directa del contenido del huevo antes de la ovoposición, como resultado de la colonización de órganos como los ovarios y el oviducto del tracto reproductivo de las aves por *Salmonella*. Durante la colonización del intestino puede atravesar la mucosa a través de células M en las placas de Peyer y así, puede llegar por vía linfática a otros órganos y colonizarlos, como es el caso de ovarios y oviducto.²⁴

1.1.6 Mecanismos moleculares de patogenicidad

La primera barrera que debe superar *Salmonella* es el pH ácido del proventrículo y ventrículo provocado por el ácido clorhídrico (HCl).²⁵

Factores como el consumo de alimentos ricos en grasas o con altos contenidos de proteína y el incremento del pH pueden proteger a *Salmonella* del contenido ácido. También el consumo de líquidos disminuye el tiempo de paso por el estómago facilitando su llegada al intestino. Además, cuenta con mecanismos que buscan mantener el pH intracelular constante (7.6 – 7.8) como las bombas de protones que extraen iones del citoplasma y sistemas que inducen la descarboxilación de la lisina y arginina utilizando un protón lo cual incrementa el pH intracelular. Otro mecanismo es la síntesis de proteínas de choque ácido (*Synthesis of acid shock proteins* o ASPs), éstas son sintetizadas con el objetivo de prevenir o reparar el daño macromolecular causado por el ácido.^{25, 26} La sustitución de ácidos grasos insaturados por saturados en la membrana bacteriana se ha asociado a su sobrevivencia cuando se enfrenta a valores de pH bajos en el estómago.²⁷

En el intestino debe resistir la acción de sales biliares que tienen un efecto detergente sobre la membrana de la bacteria disolviéndola, además pueden inducir la formación de estructuras secundarias en el ARN, daño al ADN y afectar a las proteínas desnaturalizándolas y no permitiendo su correcto ensamblaje. Enzimas como la amilasa, tripsina y lipasa representan una barrera para la sobrevivencia de la bacteria. Los principales mecanismos por los cuales puede superar estas barreras incluyen bombas de flujo, sistemas de dos componentes, regulación transcripcional y proteínas involucradas en la regulación del ADN y el mantenimiento de la integridad de la membrana. Se ha demostrado que la presencia de la cadena "O" del LPS (Lipopolisacárido) permite a la bacteria aumentar su sobrevivencia al entrar en contacto con la bilis. También se sabe que *Salmonella* puede sobrevivir en la vesícula biliar, tanto de manera intracelular como extracelular formando biopelículas.^{25, 28}

Durante su paso a través del tracto gastrointestinal la disponibilidad de oxígeno disminuye. Las proteínas Fnr y ArcAB son responsables de regular la actividad metabólica en ambientes anaeróbicos. El primero es un sensor citoplasmático capaz de unirse a secuencias promotoras e interactúa con la subunidad RpoA de la ARN polimerasa para incrementar la eficiencia de la transcripción de genes requeridos para el metabolismo anaeróbico y reprime los asociados al transporte de electrones, fosforilación oxidativa y del ciclo de los ácidos tricarbónicos. ArcAB es un sistema de dos componentes que es inducido bajo condiciones de microanaerobiosis y anaerobiosis.^{25.}

La adhesión es necesaria para contrarrestar el peristaltismo del intestino y poder así iniciar la colonización. El contacto estrecho entre la célula hospedera y la bacteria es necesario para diversos eventos como la formación de biopelículas o la translocación de proteínas que permitan la entrada a la célula. Existen tres categorías de sistemas de adhesión: adhesinas fimbriales como la fimbria ensamblada por la vía chaperon acomodador (CUP), la fimbria polar larga (Lpf) y la pequeña fimbria agregativa (Tafi), las adhesinas afimbriales comprenden adhesinas mono y oligoméricas secretadas por un Sistema de Secreción Tipo I o autotransportadas a través de la membrana bacteriana. Por último las adhesinas atípicas, estructuras en la superficie de la membrana cuya función principal no es la adhesión pero que pueden tenerla como el flagelo.^{28, 29}

Una vez que la bacteria se ha adherido a los enterocitos activa un SST-III codificado en la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1 (IPS-1) conocido como inyectosoma que atraviesa la membrana de la célula huésped. Este transloca proteínas efectoras que provocan un reordenamiento del citoesqueleto (*ruffling*) que permita el ingreso de la bacteria a células no fagocíticas. SipC y SipA se une directamente a los microtúbulos de actina promoviendo su polimerización y estabilizándolos, SopE y SopE2 lo promueven de manera indirecta actuando como factores de intercambio de guanina (GEF's) que manejan el ensamblaje del citoesqueleto vía Arp2/3. Estos eventos forman una Vacuola Contenedora de *Salmonella* (SCV) debido a la unión de membranas por SopD y el citoesqueleto retorna a su forma original gracias a SptP. Conforme la SCV se interna en la célula adquiere marcadores de endosoma temprano y tardío; la SCV empieza a acidificarse y estos cambios son detectados por la bacteria a través de sistemas reguladores de dos componentes como

OmpR/EnvZ y PhoP/PhoQ que activan mecanismos que permiten la sobrevivencia. El SST-III codificado en la IPS-2 es expresado para translocar proteínas efectoras al citoplasma. Este lleva al posicionamiento de la vacuola en el área perinuclear (SopB) formando proyecciones que se unen a microtubulos y a la dineina (SifA, SseJ, SseF y SseG). En este sitio puede obtener vacuolas que se encuentran en la ruta de endocitosis y exocitosis para aumentar su tamaño y obtener nutrimentos. SipB activa la muerte celular mediada por la caspasa 1 tanto en enterocitos como en células fagocíticas y la bacteria es liberada al lumen intestinal o transportada a otros órganos y ganglios linfáticos (**Figura 2**). Su persistencia en el tracto reproductor está asociado a la presencia de la fimbria tipo 1 que permite la adhesión a la superficie del epitelio.^{29, 30, 31, 32}

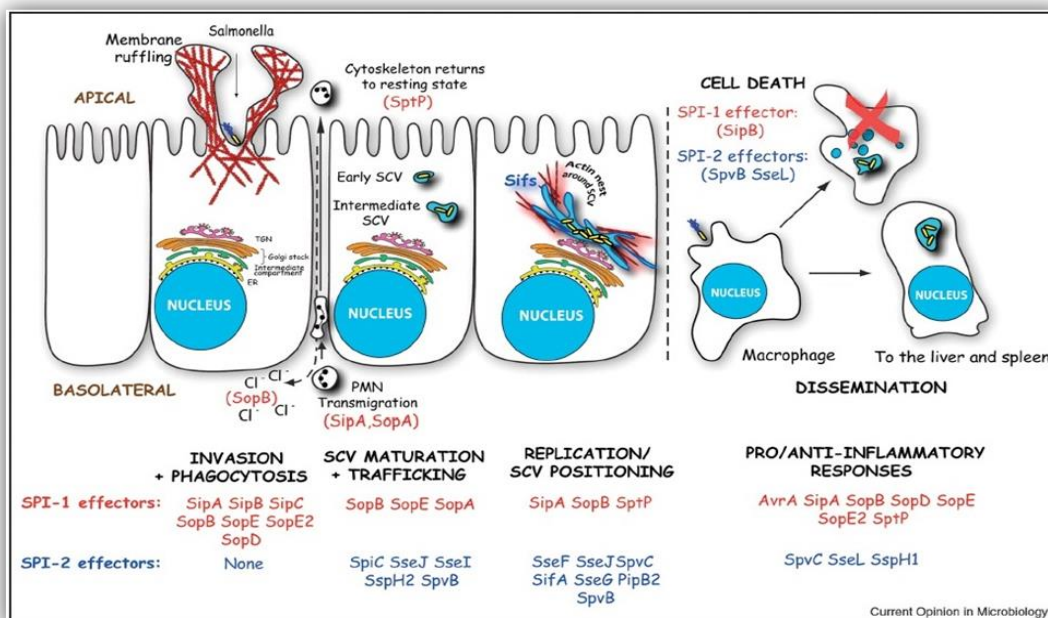


Figura 2. Principales mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. al invadir células no fagocíticas y fagocíticas. Tomado de: Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr Opin Microbiol. 2009 February; 12(1): 117–124.

1.1.7 Signología

La enfermedad se hace clínicamente aparente, desde el nacimiento hasta la tercera semana de edad, en el cual los brotes tienden a desaparecer. La mayoría de las aves que se recuperan continúan excretando la bacteria por algunas semanas y en ocasiones pueden persistir como excretoras durante toda su vida. En infecciones agudas esporádicas las aves presentan crestas y barbillas pálidas, diarrea verdosa o amarillenta, debilidad, deshidratación, somnolencia y empastamiento de la cloaca. Cuando la infección es crónica hay disminución en la ganancia de peso y, de la cantidad y calidad del huevo.^{9, 18}

1.1.8 Lesiones a la necropsia

Puede existir congestión y aumento de tamaño del hígado, bazo y riñones. El hígado puede presentar focos blanquecinos. En algunos casos puede observarse contenido caseoso en el saco vitelino. Algunas veces, las aves que muestran signos respiratorios pueden presentar nódulos blancos en los pulmones y en el músculo cardíaco. Nódulos similares pueden ser encontrados en molleja y en la pared de los ciegos que pueden contener exudado caseoso. Las alteraciones cardíacas pueden producir congestión pasiva crónica en el hígado y ascitis. El pericardio puede estar engrosado y contener exudado seroso o fibrinoso amarillento. Algunas aves pueden presentar alteraciones en las articulaciones, con la presencia de un exudado viscoso amarillento. En adultos las lesiones pueden ser imperceptibles, sin embargo, aves portadoras crónicas de la bacteria pueden presentar deformación y óvulos quísticos con contenido caseoso. Las alteraciones del ovario y oviducto pueden llevar a

ovulación peritoneal y peritonitis fibrinosa. En mucosa y submucosa de buche, duodeno, yeyuno, íleon y ciego, se puede observar con congestión, hemorragia, descamación epitelial y áreas focales de necrosis coagulativa. En hígado, bazo, pulmón, corazón e intestino puede observarse a nivel microscópico la infiltración de heterófilos y macrófagos.^{9, 33.}

1.1.9 Prevención y control

En México no existe ningún documento de referencia para el control de SE en aves o humanos. En otros países el control se lleva a cabo mediante un estricto protocolo de bioseguridad que requiere de una gran inversión en instalaciones, equipo, químicos y capacitación de personal. Además, se realizan tratamientos al agua y comida para evitar el crecimiento de bacterias, también se aplican sistemas de exclusión competitiva permitiendo la colonización de bacterias benéficas en el intestino de las aves; este manejo se realiza con la adición de prebióticos y probióticos.^{5, 6, 21}

El principal objetivo para el control de *Salmonella* es la prevención utilizando buenas prácticas de manejo e higiene para evitar la infección sistémica y su localización en el tracto reproductivo, así como, reducir la eliminación de la bacteria por vía fecal y la contaminación del huevo por esta vía. Existen vacunas vivas y atenuadas; se ha demostrado que estas evitan que las aves presenten signos, pero no eliminan la situación de los portadores asintomáticos. Además, existe el riesgo de una reversión a la virulencia por lo cual solo algunas han sido aceptadas y se utilizan en países de la Unión Europea.²¹

1.2 Proteínas de membrana externa

La membrana externa de las Gram negativas está formada por dos bicapas lipídicas que crean un espacio periplásmico. Estas membranas tienen proteínas embebidas que permiten el paso de moléculas. Aproximadamente el 50% de la membrana externa corresponde a proteínas o lipoproteínas.^{34, 35} Algunas proteínas integrales como OmpA y generalmente las porinas, se expresan en altos niveles y son conocidas como proteínas mayoritarias. También hay proteínas minoritarias cuya síntesis es comúnmente inducida cuando la bacteria las necesita.^{34, 35} Estas proteínas externas pueden funcionar como receptores para bacteriófagos y bacteriocinas; como proteínas estructurales y como mediadoras para la conjugación.^{36, 37}

Su forma puede ser de alfa hélice u hojas beta plegadas en forma de barril. Esta arquitectura no solo define dos tipos de proteínas de membrana, sino que también se relaciona con su ubicación pues las alfa hélices solo se encuentran en la membrana citoplasmática y los barriles beta en la membrana externa.³⁶

Las porinas permiten la difusión de moléculas hidrofílicas (< 600 Da) y no muestran una especificidad de sustrato, pero sí cierta selectividad por cationes y aniones.^{34,}

35.

1.2.1 Proteína de Membrana Externa A (OmpA)

Es una de las proteínas más abundantes en la membrana externa (10^5 moléculas por célula), tiene un peso molecular aproximado de 34 kDa y es rica en láminas β al igual que las porinas. Su porción N-terminal está compuesta por ocho hojas β

plegadas en forma de barril conectadas por cuatro largos giros que están hacia el exterior de la membrana y cuatro pequeños hacia el interior. Su porción C-terminal es de forma globular con una alta proporción de α hélices que se encuentra en el espacio periplásmico y tiene interacción con el petidoglicano (**Figura 3**).^{36, 37, 38}

Debido a su número de copias y localización tiene una gran variedad de funciones como receptor de bacteriófagos que reconocen secuencias de aminoácidos en los giros externos mediante la proteína filamentosa p38. Su expresión también ha sido asociada a la resistencia al complemento uniéndose a la proteína C4bp la cual es inhibidora de C3b que se activa por la vía clásica del complemento. Además, se sabe que funciona como proteína estabilizadora, mediadora para la conjugación y receptor para bacteriocinas.^{36, 37}

También se ha sugerido que OmpA tiene un papel importante en la formación de biopelículas en superficies abióticas y en superficies cubiertas con colesterol.³⁷

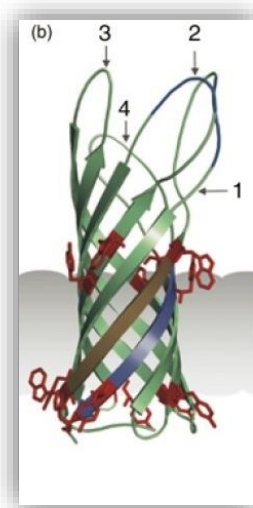


Figura 3. Estructura tridimensional de OmpA. Numerados los 4 giros largos hacia el exterior de la membrana. En color café la primera hoja beta plegada y en azul la octava y última que dan la forma de barril.

Durante la inflamación se produce una proteína conocida como amiloide sérico A (SAA) que se une a varias enterobacterias mediada por OmpA funcionando como opsonina.³⁷

Las células de la respuesta inmune innata reconocen estructuras en las células microbianas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se unen a receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) como los receptores Toll-like (TLRs). OmpA es un PAMP que inicia la respuesta inmune adaptativa.^{37, 38}

1.3 Inmunidad contra *Salmonella*

En gallinas que han sido infectadas naturalmente con SE, se han detectado anticuerpos séricos IgG y secretores IgA.^{39, 40} Altos niveles de anticuerpos se correlacionan con una menor morbilidad, mortalidad, disminución en la colonización de órganos, así como la disminución en la excreción en heces y en huevo.^{41, 42} También se ha demostrado que un alto nivel de anticuerpos no es un factor imprescindible para evitar la colonización de órganos y que tampoco favorece la eliminación de los microorganismos pero cuando hay una respuesta inmune celular la eliminación de la bacteria es más eficiente. Las citocinas producidas por linfocitos T sensibilizados, son importantes al conferir inmunidad a las gallinas, debido a que aumentan el número de heterófilos circulantes y facilitan su reclutamiento en los sitios de infección.^{43, 44}

Salmonella posee diversas estructuras que pueden inducir inmunidad protectora en gallinas infectadas experimentalmente. Se ha medido la cantidad de anticuerpos

producidos mediante Western Blot, para las porinas, proteína de la membrana externa A (OmpA), fimbria de SE (SEF) 14, SEF21, lipopolisacárido (LPS) y flagelina. Se encontró que hubo una alta frecuencia de sueros positivos cuando se enfrentaron con porinas (97.3%), LPS (81.8%), Omp de 22.1 kDa (66.2%), OmpA (64.7%), SEF21 (60.8%), SEF14 (50%) y flagelina (47.3%). Sin embargo, también hubo reacción de LPS y porinas con sueros provenientes de gallinas no infectadas. Esto indica que los componentes inmunogénicos de SE son OmpA, SEF y flagelina, de los cuales OmpA fue la que reaccionó con un mayor número de sueros de gallinas infectadas naturalmente con SE. Se ha comprobado la producción de anticuerpos contra OmpA durante la infección, inoculando la bacteria completa y la proteína sola. Por esto se propone a OmpA como candidato para el diseño de un inmunógeno.^{46, 47, 48}

1.4 Vacunas de ADN

Desde principios de los años 90's se ha observado que, ADN plasmídico que codifica para proteínas antigénicas podía ser directamente transfectado en células animales *in vivo* para inducir una respuesta inmune.⁴⁹

Actualmente se utilizan para producir una respuesta inmune humoral y celular protectoras en una amplia variedad de modelos animales preclínicos para enfermedades virales, bacterianas y parasitarias.^{49, 50} Estas vacunas de ADN tienen varias ventajas sobre las vacunas actuales (**Tabla 1**).

Cualidades	Atributos
Diseño	Métodos de síntesis y PCR facilitan su diseño. Optimización de plásmidos a través de modificaciones en codones y estructura del ARN.
Tiempo de manufactura	Producción y formulación rápida. Producción a larga escala.
Seguridad	Incapaces de revertir a formas virulentas como las vacunas vivas. No hay necesidad de utilizar elementos tóxicos como en algunas vacunas inactivadas. Sin situaciones adversas significantes en pruebas clínicas.
Estabilidad	Más termoestables que las vacunas convencionales. Una vida de anaquel más prolongada.
Movilidad	Fáciles de almacenar y transportar. Pueden no requerir de una cadena fría.
Inmunogenicidad	Inducción de respuesta celular T y B específica a los antígenos similar a aquella producida por vacunas vivas atenuadas.

Tabla 1. Ventajas de las vacunas de ADN. (Modificado de: Kutzler MA. Y Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? Macmillan Publishers Limited. 2008.)

Las vacunas de ADN consisten en un gen de interés que es clonado en un plásmido (**Figura 4**), que es diseñado para una óptima expresión en células eucariotas. Los elementos básicos de este plásmido incluyen: un origen de replicación bacteriano que permite su multiplicación, un gen de resistencia bacteriano a antibióticos como ampicilina o kanamicina para la selección de clones, un fuerte promotor para su expresión en células de mamíferos como el del Citomegalovirus (CMV) o del virus del simio 40 (SV40), un estabilizador de los transcritos de ARNm con secuencias de poliadenilación como el de la hormona del crecimiento bovino (BGH) y un sitio de clonación múltiple para permitir la inserción del gen de interés.^{49, 50, 51}

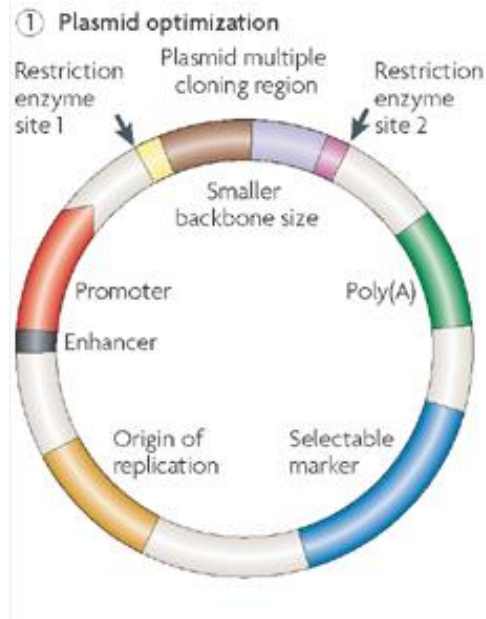


Figura 4. Esquema que muestra las principales características de una vacuna de ADN. DNA vaccines: ready for prime time? Nature Reviews Genetics 9, 776-788 (October 2008)

Estos vectores pueden ser inoculados por distintas vías como: subcutánea, intramuscular y nasal obteniendo resultados favorables. Una vez dentro de la célula eucariota el plásmido es translocado por mecanismos que involucran la red de microtubulos y su asociación a proteínas motoras en el citoplasma que le permiten alcanzar el núcleo y se inicia la transcripción del ARNm que después será traducido.^{51, 76}

Existen tres posibles vías por las cuales el antígeno codificado en el plásmido es procesado y presentado por los complejos principales de histocompatibilidad I y II (MHC-I y MHC-II) para producir una respuesta inmune: las primeras dos ocurren cuando las células transfectadas son somáticas (miocitos, queratinocitos o células que carecen del MHC-II) o células presentadoras de antígenos (APCs), en donde se lleva a cabo la presentación del antígeno endógeno por el MHC-I desencadenando una respuesta mediada por linfocitos CD8+ citotóxicos; la tercera

vía es conocida como *cross-priming*, en esta vía las células transfectadas pueden ser somáticas o APC's, estas liberan el antígeno debido a necrosis o apoptosis y es fagocitado por otras APC's que lo presentan por medio del MHC-II, activando una respuesta mediada por linfocitos T cooperadores CD4+.^{50, 52, 53}

Actualmente existe una gran cantidad de vacunas de ADN en fases de desarrollo y pruebas clínicas, tanto para animales como para humanos. Si bien son pocas las vacunas que actualmente están en el mercado, se sigue haciendo investigación para que en el futuro se aprovechen sus características. Algunas de las estrategias que se implementan para mejorarlas son: la optimización de los transcritos, la adición de codones que incrementan la expresión de la proteína, la inoculación de adyuvantes como liposomas o micropartículas biodegradables poliméricas, la adición de genes que codifican proteínas inmonomediadoras y métodos de transfección directa de tipos de células particulares como las APCs.^{54, 55, 56, 57}

2. Justificación

En un trabajo anterior en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología, realizado por Hernández-Morales I. (2008) se evaluó el candidato vacunal pIHD428 en gallinas de postura de la estirpe *Bovans* contra el desafío con la cepa SE FT 13a. No hubo aislamiento del microorganismo en el bazo de aves vacunadas, contrario a los grupos control de donde se aisló de 3 aves. Estos resultados sugieren que la vacunación disminuyó la colonización de la bacteria en órganos internos.⁵⁹ Por esto es necesario evaluar si pIHD428 es capaz de dirigir la expresión de la proteína en cultivo celular para que en estudios posteriores se determine si lo puede hacer *in vivo* y si es capaz de inducir una respuesta inmune protectora.

3. Hipótesis

La transfección de células HeLa con la vacuna de ADN elaborada con el plásmido pIHD428 que contiene el fragmento *ompA* resultará en la expresión de la proteína de membrana externa OmpA de *Salmonella* Enteritidis.

4. Objetivo general

Determinar la expresión de la proteína OmpA de *Salmonella* Enteritidis en células HeLa mediante la técnica de *Western Blot* para conocer la eficiencia de la transfección y traducción del plásmido en células eucariotas.

4.1 Objetivos específicos

- Realizar la transfección de los cultivos de células HeLa mediante el método de lipofectamina para evaluar su expresión en el sobrenadante y en las células.
- Realizar la extracción de proteínas a partir de las células en la monocapa y el sobrenadante mediante la obtención de proteínas totales utilizando métodos químicos y físicos como del sobrenadante utilizando TCA para evaluarlos mediante WB.
- Detectar la expresión de la proteína OmpA de *Salmonella* Enteritidis mediante la técnica de Western Blot.

5. Material y Métodos

5.1 Elaboración de células electro competentes (*Escherichia coli* DH5 α)

Se utilizaron células *E. coli* DH5 α que tienen una alta eficiencia de transformación⁸⁰, éstas se prepararon siguiendo la metodología descrita por Sambrook y Russell⁵⁸ con algunas modificaciones. Brevemente se sembró una colonia de la bacteria en 50 mL de medio LB (Luria Bertani). Se cultivaron toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Después se inocularon 25 mL de este cultivo en 500 mL de caldo LB, se incubó a 37 °C con agitación a 300 rpm y se tomaron muestras cada hora hasta alcanzar un valor de densidad óptica (OD) de 0.4, a una longitud de onda de 600 nm. Seguidamente el matraz con medio se enfrió en baño de hielo durante 20 min y el medio se transfirió a tubos de 50 mL para centrifugar las células bacterianas a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se suspendió en 50 mL de agua Mili Q fría con 10 % de glicerol (Sigma - Aldrich®) estéril, este procedimiento se repitió 2 veces más. Una vez que la pastilla estuvo lo más seca posible se suspendió en 1 mL de agua Mili Q y se hicieron alícuotas de 40 μ L cada una para después ser almacenadas a - 80 °C hasta su uso.

5.2 Electroporación de células *E. coli* DH5 α con pIHD428

Para la transformación se descongelaron en hielo los tubos de 1.5 mL con células electrocompetentes necesarios y fueron colocadas en celdas de electroporación previamente enfriadas. Se añadieron 2 μ L (100 ng) de plásmido purificado conservado anteriormente en congelación a - 20 °C y se incubó durante 1 min en

hielo. Se colocó cada una de las cubetas en el electroporador y se les dio un pulso a 25 μ F de capacitancia, 2.5 kV y 200 Ω de resistencia durante 4 seg. Inmediatamente después se les añadió 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente y se transfirió a un tubo Eppendorf® de 1.5 mL donde se incubaron durante 1 h a 37 °C con agitación suave (100 rpm).

Una vez incubadas se sembraron 200 μ L de cada tubo en placas de agar LB con 50 μ g/mL de Kanamicina (affymetrix USB®) utilizando un asa de vidrio, se esperó hasta que el líquido estuviera completamente evaporado y se incubaron a 37 °C durante 18 h. Las colonias que crecieron se volvieron a sembrar en placas con 50 μ g/mL de Kanamicina y fueron analizadas.

5.3 Extracción de plásmido por el método de lisis alcalina

Se utilizó el método descrito por Sambrook y Russell⁵⁸. Brevemente, las colonias se sembraron en 2 mL de caldo LB + 50 μ g/mL de Kanamicina y se incubaron durante toda la noche en agitación a 220 rpm. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se decantó el medio. La pastilla bacteriana seca se suspendió en 100 μ L de solución I, se homogeneizó en vortex y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min, después se agregaron 200 μ L de solución II recién preparada y se mezcló con pipeteo suave hasta que la solución aclaró y se volvió viscosa. Se colocó en hielo por 10 min al término de los cuales se agregó solución III mezclando con vortex invirtiendo el tubo durante 10 seg, se mantuvo 5 min en hielo y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, el ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes

de isopropanol e incubando durante 1 h en hielo. Después se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min a 4 °C en microcentrífuga (Labnet), se decantó el isopropanol y el pellet se limpió con 1 mL de etanol frío al 70% mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Una vez que el pellet se secó fue suspendido en agua Mili Q estéril y almacenado a -20 °C hasta su utilización.

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *ompA*

Para comprobar que el inserto *ompA* de *Salmonella* Enteritidis se encontraba en el vector se realizó la PCR utilizando los siguientes iniciadores⁵⁹:

Nombre	Secuencia
Sentido (<i>ompA</i> -S)	5' <u>CGGCCAAGCTTT</u> GACGGAGTTCACACTTGT 3'
Antisentido (<i>ompA</i> -A)	5' <u>CGGCCTCTAGACC</u> CACGTTAAAGCAGGATT 3'

Tabla 2. Iniciadores de *ompA*. La secuencia de nucleótidos subrayada corresponde a sitios de reconocimiento para enzimas de restricción.

Dichos iniciadores incluyen en su secuencia sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, *HindIII* en el iniciador sentido y *XbaI* en el iniciador antisentido. Estos sitios no tuvieron utilidad práctica en este ni en los ensayos posteriores de PCR y digestión con enzimas de restricción.

La reacción se llevó a cabo en 50 µL mezclando 34.5 µL de agua inyectable, 5 µL de amortiguador de enzima *Taq* polimerasa 10X (50 mM), 2.5 µL de cloruro de magnesio (2.5 mM), 2 µL de desoxinucleotidos trifosfato equimolar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP 10 mM), 2 µL de cada uno de los iniciadores (220 pM), 1 µL de ADN

(100 ng) y 1 μ L de *Taq* polimerasa (1 U). Estas cantidades se utilizaron en ensayos posteriores de PCR.⁵⁹

La mezcla se sometió a las siguientes condiciones en un termociclador *Techne*®:

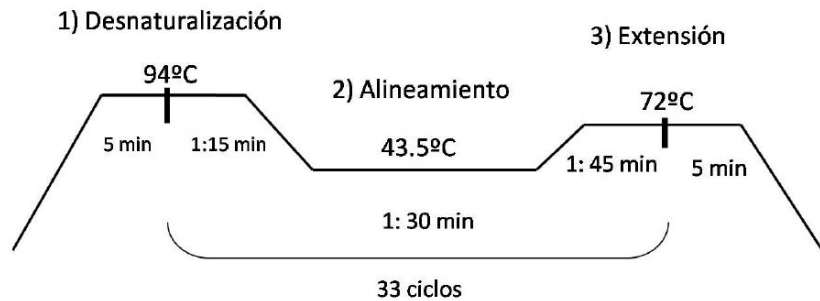


Figura 5. Condiciones de temperatura y ciclos para la PCR de *ompA*.

5.5 Ensayo con enzimas de restricción para comprobar la construcción

Para verificar que el inserto se encontraba insertado en la dirección correcta y que se trataba del vector pVAX1 se realizó una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII* (Invitrogen™) y *BamHI* (Gibco®) (**Figura 6**). El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. En un tubo Eppendorf® con capacidad para 0.6 μ L se colocaron 2 μ L de enzima (2 U), el ADN (1 μ g) y el buffer correspondiente para cada enzima (4 μ L). La reacción se incubó por 1 h a 37 °C en baño María. Después de inactivar la enzima a 65 °C en baño María se observó el patrón electroforético en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X aplicando 60 volts durante 1 h y teñidos con Bromuro de Etidio a través del fotodocumentador (MiniLumi, Bio Imaging Systems).

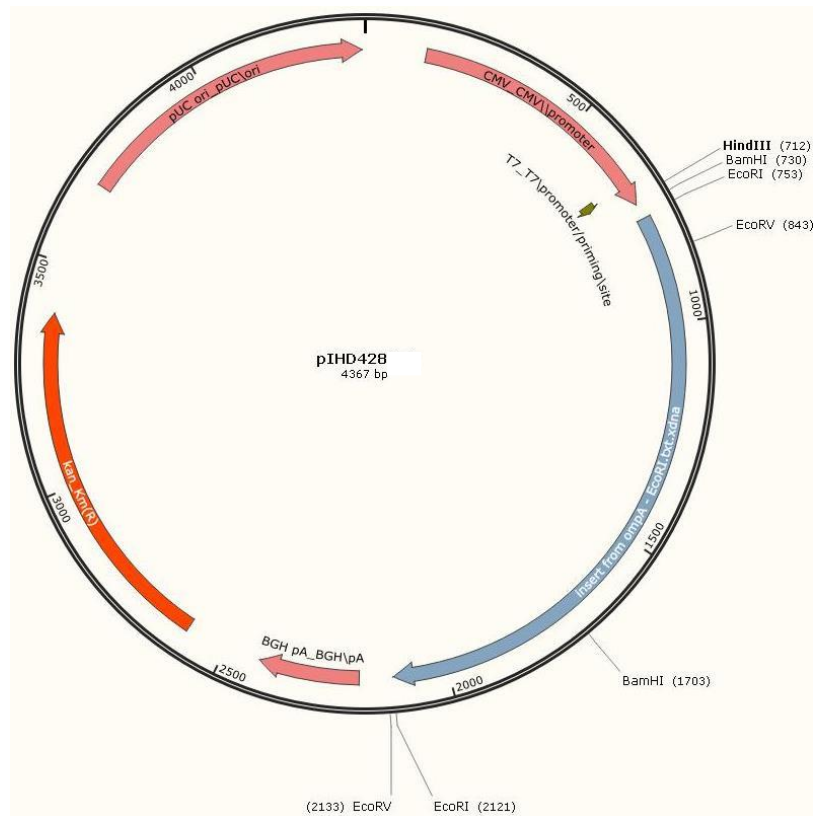


Figura 6. Mapa de pIHD428. En color **rosa** de izquierda a derecha primero el origen de replicación bacteriano y seguido, el promotor eucariótico. En **azul** el inserto *ompA* y después el gen de la Hormona del crecimiento bovino (BGH). En **anaranjado** el gen de resistencia a Kanamicina. También se muestran los sitios para enzimas de restricción.

5.6 Extracción de plásmido para transfección

El plásmido utilizado en los ensayos de transfección se obtuvo mediante su extracción con columnas Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research®). Brevemente a 600 µL de cultivo bacteriano se agregaron 100 µL de solución de lisis, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó durante 3 min. Después se agregaron 350 µL de buffer de neutralización y se mezcló con un Vortex, una vez formado el precipitado se centrifugó a 12,000 g durante 2 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a una columna teniendo cuidado de no succionar el precipitado, la columna se colocó dentro de un microtubo de 1.5 mL y se le dio un pulso en microcentrífuga a máxima velocidad durante 15 seg. Después se realizaron dos lavados al ADN en

la columna con soluciones incluidas en el estuche comercial dando un pulso de 30 seg. en la microcentrifuga con cada una. Por último, el ADN fue eluido con agua inyectable dando un pulso de 30 seg. El plásmido extraído fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X, cuantificado y almacenado a -20 °C hasta su utilización.

5.7 Cultivo de la línea celular HeLa

Se descongeló un vial con células HeLa conservadas con 60% de Suero Fetal Bovino (SFB), 30% de Medio Mínimo Esencial (MEM Gibco®) y 10% Dimetil Sulfoxido (DMSO Sigma Aldrich®), se centrifugaron las células a 1000 rpm durante 5 min y se decantó el medio. Se suspendió la pastilla en 500 µL de medio MEM y se transfirió en su totalidad a una botella para cultivo de 25 cm² con 10 mL de medio suplementado con SFB 10%, L-Glutamina (Gibco®) 2 mM, Penicilina 100 U - Estreptomina 100 µg/mL (Gibco®), Piruvato de sodio (Gibco®) 1mM y Bicarbonato de sodio 20mM (J.T. Baker®). Se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y se observaron periódicamente al microscopio durante los días siguientes para verificar su adherencia a la botella y crecimiento. Una vez establecidas se mantuvieron haciendo cambios el medio y cosechando con tripsina para hacer pases hasta su utilización en los ensayos de transfección.

5.8 Transfección de células

La transfección se llevó a cabo con Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen™) siguiendo las recomendaciones del proveedor.⁶⁰ Brevemente, se

sembraron células HeLa en cajas de 25 cm² con 5 mL de medio de cultivo suplementado con SFB 10% hasta alcanzar una confluencia del 80%. Una vez alcanzada se realizó una dilución con 50 µL de Lipofectamine® (1 µg/µL) y de ADN plasmídico (40 µg) en 500 µL y 2 000 µL (respectivamente) de medio de cultivo sin SFB. Después se prepararon los complejos lípido - ADN colocando 1000 µL de la dilución de ADN con 500 µL de la dilución de lipofectamina en un tubo nuevo. Estos se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 min. El medio en las cajas se retiró y fue reemplazado con 5 mL de medio con 5% de SFB para después colocar 750 µL de los complejos lípido - ADN. Al paso de 12, 24 y 48 h se tomó el medio con pipeta de manera suave para evitar tomar células adheridas, después se agregó 1 mL de PBS para retirar de manera mecánica con un scrapper las células de la monocapa.

5.9 Comprobación de la transfección

Para comprobar la transfección del plásmido al interior de las células eucariotas se llevó a cabo una extracción de ADN episomal utilizando el método de Hirt⁶¹ (Hirt Preparation). Brevemente, después de la transfección e incubación de células en una botella de 25 cm², se retiró el medio y fueron lavadas tres veces con PBS. Después se agregaron 7 mL de solución de lisis y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, se despegaron con un descamador y se colocaron en un tubo tipo Falcón de 15 mL con 1.4 mL de Cloruro de sodio (NaCl) 4M (J. T. Baker®). El lisado celular se incubó durante toda la noche a 4 °C y se centrifugó a 17 000 g durante 60 min a 4 °C para recuperar el sobrenadante y agregar fenol saturado con

Tris pH 8 0.01M y de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.001M (Bio Basic Canada Inc). Este se agregó al sobrenadante y se centrifugó en tres ocasiones a 12 000 rpm durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, el ADN se precipitó con dos volúmenes de isopropanol (J. T. Baker) y 0.1 volúmenes de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 3M (J. T. Baker®) en congelador a -20 °C durante toda la noche. El ADN se obtuvo centrifugando a 12 000 rpm durante 10 min a 4 °C y las sales restantes se eliminaron con tres lavados de etanol al 70%, 90% y 100%, respectivamente. Como control negativo, se obtuvo ADN mediante el mismo procedimiento de células que no fueron transfectadas.

Los pellets obtenidos se suspendieron en 20 μL de agua inyectable, se verificó la presencia de ADN en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X para posteriormente ser utilizado en una PCR con los iniciadores de *ompA* y así corroborar la presencia del plásmido o su ausencia en el caso del control negativo. Los productos obtenidos se comprobaron con enzimas de restricción (*Bam*HI y *Eco*RV). Se utilizaron 5 μL (1 μg) de ADN producto de la PCR, 4 μL de buffer de enzima 10X, 2 μL de enzima (1 U/ μL) y 6 μL de agua inyectable, la reacción se llevó a cabo en baño maría a 37 °C durante 1 h. El resultado de la digestión se observó en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X.

5.10 Obtención de proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis

Para obtener OmpS de SE se siguió un protocolo amablemente proporcionado por el Dr. Oropeza-Navarro R. del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Brevemente,

se inoculó una colonia de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis en 5 mL de caldo LB, se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación a 220 rpm. El cultivo fue concentrado en un micro tubo de 1.5 mL, una vez obtenida, la pastilla se suspendió en 1 mL de Fosfato de Sodio Dibásico (Na₂HPO₄) 10mM pH 7.2 (J. T. Baker®) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 min a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió en 500 µL de Na₂HPO₄ 10mM pH 7.2 por medio de pipeteo sin hacer espuma. Después se sonicó (por pulsos) hasta que la muestra se clarificó. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 min a 12000 rpm para luego tomar el sobrenadante y depositarlo en un micro tubo limpio. Este sobrenadante se centrifugó a 4 °C durante 30 min a 13200 rpm. Luego se retiró el sobrenadante para suspender la pastilla del lisado celular en 500 µL de Na₂HPO₄ 10mM pH 7.2 / Triton X-100 al 2%. Se incubó a 37 °C por 30 min para después centrifugar a 4 °C durante 30 min a 13200 rpm. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla suspendida en 500 µL de Na₂HPO₄ 10mM pH 7.2 para nuevamente ser centrifugada a 4 °C durante 30 min a 13200 rpm. Una vez más se retiró el sobrenadante para suspenderlo en 50 µL de PBS pH 7.4 y ser almacenado a – 80 °C hasta su utilización.

5.11 Obtención de las proteínas de la monocapa y el sobrenadante

Se realizó una extracción de proteínas totales de las células en la monocapa mediante la adición de 200 µL de solución de lisis (Tritón X100, deoxycolato y SDS) incubando durante 5 min en hielo, después se precipitaron con 200 µL de ácido

tricloroacético (TCA) al 10% durante 10 min en hielo y se centrifugaron a 12 000 rpm a 4 °C durante 10 min. El pellet obtenido fue lavado con 500 µL de etanol absoluto evitando suspenderlo. En el caso del sobrenadante, las proteínas fueron precipitadas agregando 200 µL de TCA al 10%, se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min a 4 °C y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol absoluto. Una vez que la pastilla se secó fue suspendido en 100 µL (dependiendo de su tamaño) de Tris 16µM y se almacenaron a – 80 °C hasta su utilización.

Como método alternativo para la obtención de las proteínas en la monocapa se realizó una lisis mecánica con una aguja de jeringa estéril y el lisado fue sometido a la electroforesis desnaturizante.

5.12 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se siguió el método descrito por Bradford MM.⁶² Brevemente se realizó una curva estándar mediante la cuantificación de diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) desde 2 µg y hasta 12 µg en un 1 mL de reactivo de Bradford utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Como blanco se utilizó 1 mL del reactivo de Bradford. Habiendo obtenido una curva con un mínimo de 98% de linealidad, se realizó la lectura de las muestras haciendo una dilución 1/20 en PBS y agregando 980 µL de reactivo de Bradford.

5.13 Análisis de la expresión por la técnica de Western Blot

Se realizó una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS - PAGE) para separar las proteínas en las muestras. Se prepararon geles gemelos

de 1.0 mm de espesor con 10 pozos, se elaboró el gel separador de acrilamida al 12% con sello de agua en la superficie, una vez polimerizado se retiró el sello y se vertió el gel concentrador al 3.9% para después colocar el peine y esperar hasta la polimerización. Antes de depositar las muestras en los pozos se llenó la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida Tris – Glicina 1X. En el primer pozo se colocaron 4 μ L marcador de peso molecular (Gibco® BRL BenchMark™ Protein Ladder) y en los pozos subsecuentes las proteínas a una concentración de 1 μ g/ μ L (10 μ L) con amortiguador de muestra Laemmli (10 μ L). Éstas se calentaron en baño María a 100 °C durante 5 min antes de ser colocadas en el gel.

Se aplicaron 60 V durante 1 h y 70 V durante 3 h más. Al término de la electroforesis se desmontó la cámara y uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie durante 2 h en un agitador orbital, se retiró el colorante y se agregó solución desteñidora por 30 min en agitación suave y se restiró. Se siguió agregando solución desteñidora fresca hasta que se observaron las bandas de proteínas de manera clara. El segundo gel se montó en la cámara de transferencia junto con una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño, se llenó con amortiguador de transferencia y se aplicaron 100 V durante 1 h manteniendo la cámara en contacto estrecho con hielo para evitar el calentamiento. Pasado el tiempo se desmontó la cámara y la membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante 30 min para verificar la transferencia de proteínas, la membrana se lavó con agua destilada hasta que se eliminó el colorante. Se hicieron lavados de la membrana con TBS + Tween 20 al 1% (TBS-T) en dos ocasiones durante 5 min y dos veces más con TBS, después se bloqueó con 100 mL de TBS-T + 1% de leche descremada en polvo durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Una vez bloqueada, se incubó toda la

noche con un anticuerpo primario policlonal anti OMPs de *Salmonella* Enteritidis de origen conejo diluido 1/400 en 15 mL de TBS-T+1% de leche descremada, seguidamente se lavó la membrana con TBS-T dos veces y con TBS dos veces más durante 5 min cada una. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo monoclonal de origen cabra conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich®) diluido 1/600 en TBS. Se incubó durante 1 h con agitación suave para luego realizar lavados con TBS-T y TBS. Se preparó solución reveladora (20 mL de Metanol, 100 µL de peróxido de hidrógeno y 0.06g de 4-cloro-naftol) y se agregó a la membrana junto con 100 mL de TBS, una vez que se observó la reacción de revelado se detuvo sustituyéndola con agua destilada fría.

5.14 Determinación de la concentración mínima de proteínas detectables en el Western Blot.

Para determinar la concentración mínima de proteínas detectables por la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos policlonales contra OMPs, se hicieron diluciones dobles seriadas de las OMP's obtenidas de *Salmonella* Enteritidis.

Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Concentración	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019
	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg

Tabla 3. Concentración de proteína en las diluciones seriadas de OMPs.

6. Resultados

6.1 Obtención del plásmido pIHD428

El plásmido pudo ser visualizado después de la lisis alcalina en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. En el carril 2 de la fotografía (**Figura 7**) se aprecian dos formas del plásmido con dos pesos distintos, ninguno de estos coincide con el peso real por lo que fue necesario realizar una digestión con *Hind*III. Esta enzima al reconocer una secuencia única en el vector hace un corte que permite que la molécula circular de ADN se alineé y pueda así observarse su tamaño real.

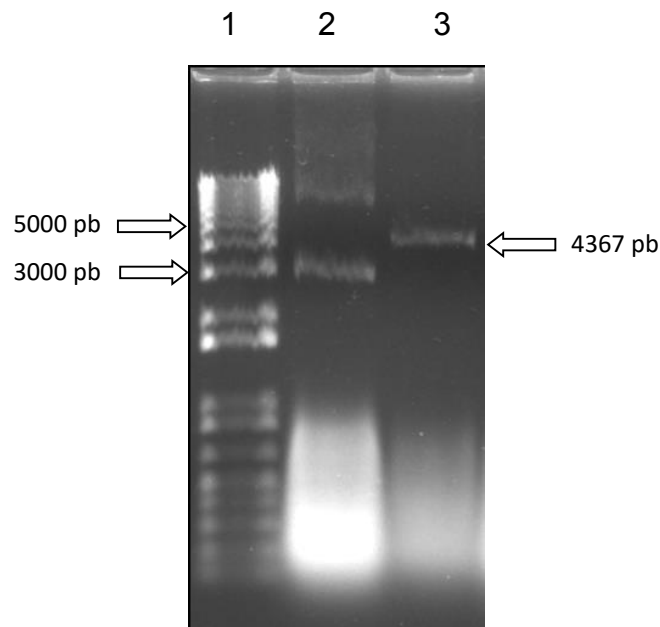


Figura 7. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen®).
Carril 2: Plásmido pIHD428.
Carril 3: pIHD428 digerido con *Hind*III.

6.2 Comprobación de la presencia de *ompA* en pHD428

Se obtuvo un amplificado de 1,373 pares de bases (pb) que corresponde a las 1,351 pb del gen completo *ompA* más las 22 pares de bases adicionadas por la amplificación con los iniciadores que presentaban en su secuencia los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (**Figura 8**). Este resultado demostró la presencia del gen en la construcción.

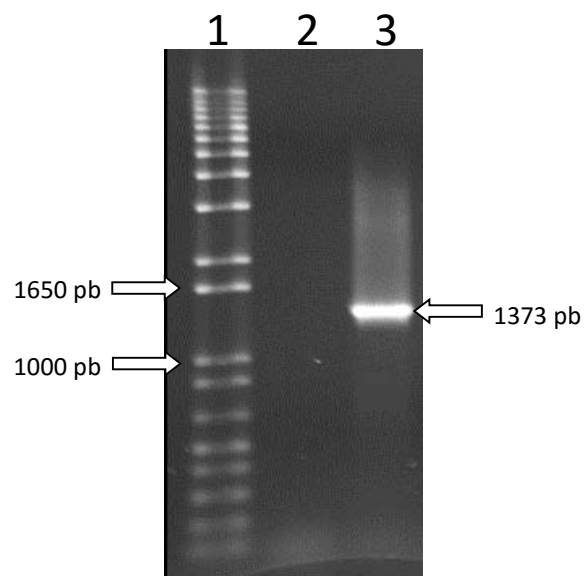


Figura 8. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen®).
Carril 2: Control negativo.
Carril 3: PCR con los iniciadores de *ompA* a partir de pHD428.

6.3 Comprobación de la identidad de pHD428 utilizando ensayos con enzimas de restricción

Una vez que se determinó el peso molecular del plásmido se realizó un ensayo *in silico* (**Figura 9**) para generar un patrón de cortes con enzimas de restricción para determinar la presencia y dirección correcta del gen *ompA* clonado en el plásmido

pVAX1. El corte con *EcoRV* generó dos fragmentos, uno de 1,290 pb y uno de 3,077 pb. La enzima *BamHI* también generó dos fragmentos, uno de 973 pb y otro de 3,394 pb. Ya que el gen *ompA* fue insertado haciendo un único corte del plásmido pVAX1 con la enzima *EcoRI*, esta liberó el gen de 1,368 pb y dejó abierto el vector de 2,999 pb. El resultado de las digestiones (**figura 10**) coincidió con el ensayo *in silico*, lo que permite corroborar la clonación del gen *ompA* en la dirección correcta en el vector pVAX1 para permitir su transcripción y traducción.

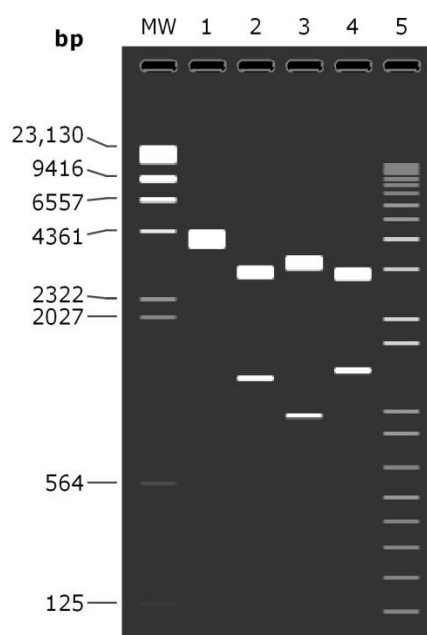


Figura 9. Predicción *in silico* de la digestión de pIHD428 con enzimas de restricción utilizando el programa SnapGene®. Gel de agarosa al 1%.

Carril 1: Marcador de peso molecular λ *HindIII* (Invitrogen®).

Carril 2: pIHD428.

Carril 3: pIHD428 digerido con *EcoRV* (Thermo Scientific®).

Carril 4: pIHD428 digerido con *BamHI* (Thermo Scientific®).

Carril 5: pIHD428 digerido con *EcoRI* (Thermo Scientific®).

Carril 6: Marcador de peso molecular 1 kb Plus

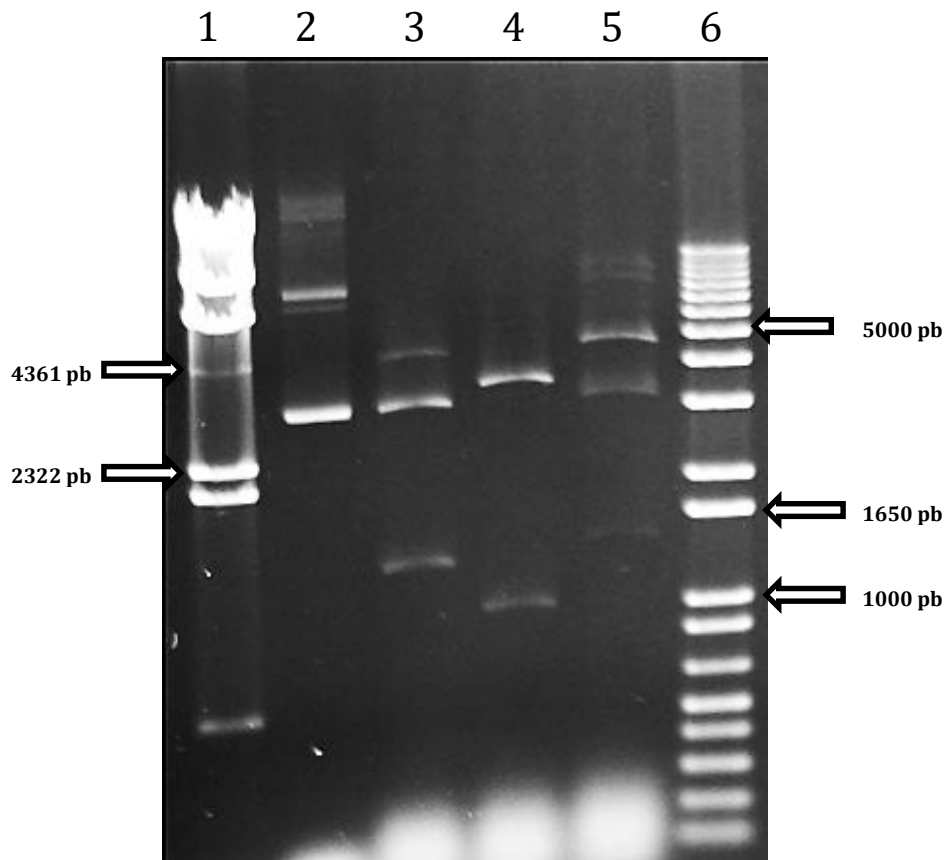


Figura 10. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Carril 1: Marcador de peso molecular λ HindIII (Invitrogen®).

Carril 2: pIHD428. **Carril 3:** pIHD428 digerido con *EcoRV* (Thermo Scientific®).

Carril 4: pIHD428 digerido con *BamHI* (Thermo Scientific®).

Carril 5: pIHD428 digerido con *EcoRI* (Thermo Scientific®).

Carril 6: Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®).

6.4 Extracción de plásmido para la transfección

Se realizó la extracción de ADN plasmídico con el estuche comercial Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research®). En el gel se observó sin presencia de ARN y ADN cromosomal (**Figura 11**). El manual de usuario indica que el ADN obtenido por este medio tiene la pureza necesaria para ser utilizado en ensayos de transfección.

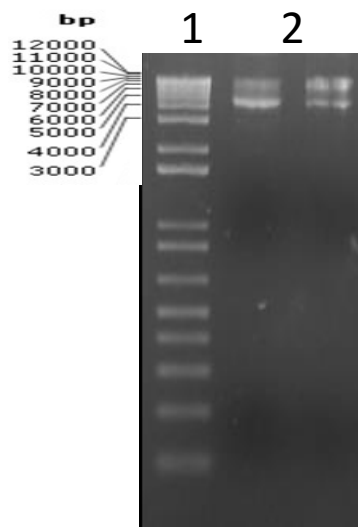


Figura 11. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®).

Carril 2 y 3: Plásmido pIHD428

6.5 Establecimiento de la línea celular HeLa

Después de descongelar las células pasaron aproximadamente 6 días antes de que llegaran a su tasa de replicación normal (cada 23 h). Estas presentaron una silueta alargada en forma de huso, lo cual indica su adherencia a la superficie formando una Monocapa (**Figura 12**). Una vez establecidas en botellas de cultivo celular

(Corning®) se realizaron subcultivos cuando alcanzaban un 80% de confluencia utilizando tripsina para desprender las células. Éstas se utilizaron para los ensayos de transfección.

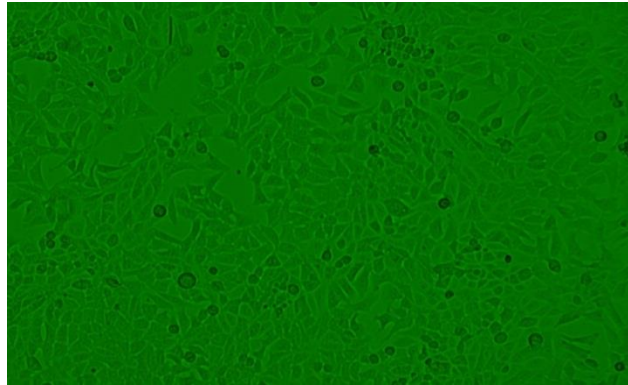


Figura 12. Células HeLa adheridas a la superficie de una botella de 25 cm² con un 90% de confluencia. La observación se llevó a cabo en un microscopio Nikon Eclipse e200® con objetivo 10X.

6.6 Comprobación de la transfección

Después de haber realizado la transfección en las células HeLa, estas se cosecharon y se llevó a cabo la extracción de ADN episomal. Como se observa en la fotografía (**Figura 13**) se obtuvieron grandes cantidades de ADN cromosomal. A pesar de que el método de Hirt se reporta para la extracción de vectores virales y no virales (plásmidos) de células transfectadas mucho del ADN cromosomal es extraído.

La ausencia de ADN plasmídico en el gel no significa que este no esté presente, por esto se llevó a cabo la PCR.

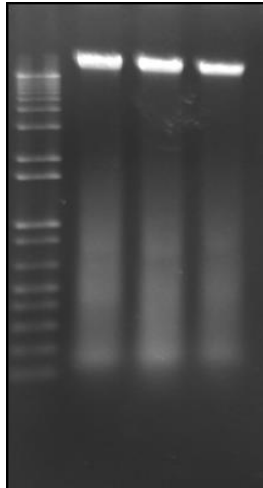


Figura 13. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Extracción de ADN episomal de células HeLa transfectadas a diferentes tiempos
Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®).
Carril 2: 24 h.
Carril 2: 48 h.
Carril 3: 72 h.

La cantidad de ADN que logra ingresar a las células es menor al utilizado en la transfección y lo recuperado de las células eucariotas es muy poco, por lo que es improbable que sea observado en los geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. La PCR es un método de detección de ADN sensible que puede detectar incluso nanogramos, esta prueba se utilizó para comprobar la presencia del plásmido utilizando los iniciadores de *ompA*. Se lograron observar varios amplificados. Una banda corresponde al peso del gen *ompA* (1402 pb) y varias bandas inespecíficas por debajo del peso de este gen (**Figura 14**).

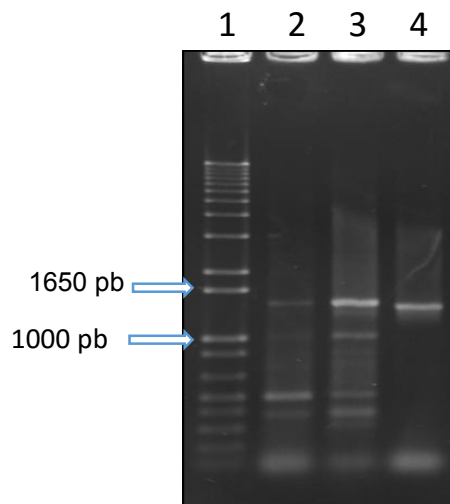


Figura 14. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Productos de PCR con los iniciadores de *ompA* utilizando como template el ADN extraído de células HeLa y ADN plasmídico.
Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®).
Carril 2: Células HeLa transfectadas.
Carril 3: Células HeLa sin transfectar.
Carril 4: Plásmido pHD428.

Para comprobar si el amplificado correspondía a *ompA* se realizó un ensayo de restricción *in silico* con dos enzimas de restricción (**Figuras 15 y 17**). La enzima *Bam*HI reconoce un sitio y generó dos fragmentos, uno de 950 pb y otro de 423 pb. En la **figura 16** se observa que el patrón generado al realizar la digestión del fragmento amplificado a partir de ADN de células HeLa transfectadas (carril 5) es idéntico al del control positivo (carril 3), que corresponde a *ompA* amplificado a partir de pIHD428.

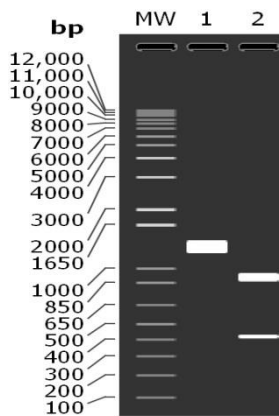


Figura 15. Ensayo de restricción *in silico* de los productos de PCR utilizando los iniciadores de *ompA*. **MW:** Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®).
Carril 1: Producto de PCR sin digerir.
Carril 2: Producto de PCR digerido con *Bam*HI (Thermo Scientific®).

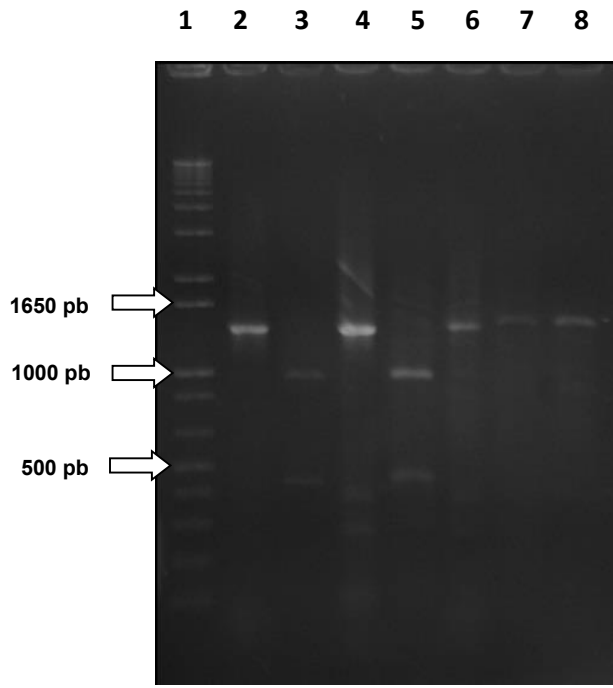


Figura 16. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Productos de PCR utilizando los iniciadores de *ompA* teniendo como templado ADN obtenido de células HeLa y ADN plasmídico digeridos con enzimas de restricción. **Carril 1:** Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen®). **Carril 2:** Producto a partir de pHD428 digerido con *Bam*HI (Thermo Scientific®). **Carril 3:** Producto a partir de pHD428 digerido con *Bam*HI (Thermo Scientific®). **Carril 4:** Producto a partir de ADN de células HeLa transfectadas. **Carril 5:** Producto a partir de ADN de células HeLa transfectadas digerido con *Bam*HI (Thermo Scientific®). **Carril 6:** Producto a partir de células HeLa sin transfectar. **Carril 7 y 8.** Producto a partir de células HeLa sin transfectar digerido con *Bam*HI (Thermo Scientific®).

La segunda enzima utilizada fue *EcoRV* que cortó a *ompA* en un fragmento de 1,283 pb y uno de 90 (Figura 17). El fragmento de 90 pb no es visible en el gel (Figura 18) pero es evidente la pérdida de peso (carril 3 y 5) de la banda con respecto al amplificado completo (carril 2 y 4).

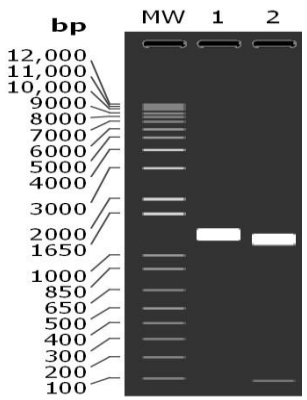


Figura 17. Ensayo de restricción *in silico* de los productos de PCR utilizando los iniciadores de *ompA*. **MW:** Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen®). **Carril 1:** Producto de PCR sin digerir. **Carril 2:** Producto de PCR digerido con *EcoRV* (Thermo Scientific®).

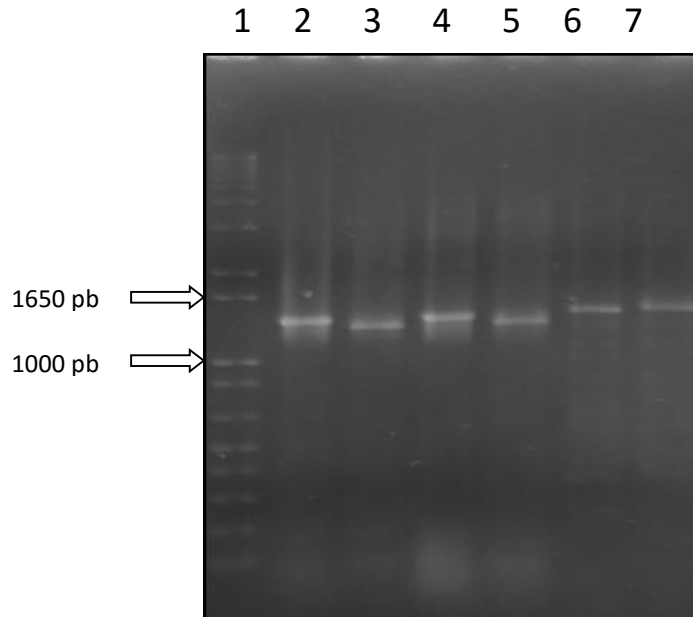


Figura 18. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Productos de PCR utilizando los iniciadores de *ompA* teniendo como templado ADN obtenido de células HeLa y ADN plasmídico digeridos con enzimas de restricción. **Carril 1:** Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen®). **Carril 2:** Producto a partir de pIHD428 **Carril 3:** Producto a partir de pIHD428 digerido con *EcoRV* (Thermo Scientific®). **Carril 4:** Producto a partir de ADN de células HeLa transfectadas. **Carril 5:** Producto a partir de ADN de células HeLa transfectadas digerido con *EcoRV* (Thermo Scientific®). **Carril 6.** Producto a partir de células HeLa sin transfectar. **Carril 7 y 8.** Producto a partir de células HeLa sin transfectar digerido con *EcoRV* (Thermo Scientific®).

Todos los patrones obtenidos coinciden con el obtenido con el programa *SnapGene*®. En ambas fotografías se observa la comparación con el control positivo (amplificado de *ompA* a partir de ADN de *Salmonella* Enteritidis) y negativo (amplificados obtenidos a partir de ADN de células HeLa sin transfectar), ambos sometidos a las mismas condiciones y enzimas de digestión. Esto permite identificar al amplificado de las células trasfectadas como *ompA* y al del control negativo como una banda inespecífica.

6.7 Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis

Las proteínas obtenidas de SE fueron visualizadas en un gel de electroforesis desnaturalizante, luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde fueron detectadas por los anticuerpos policlonales contra OMP's (**Figura 19**). Estas fueron utilizadas como control positivo en los ensayos posteriores de *Western Blot*.

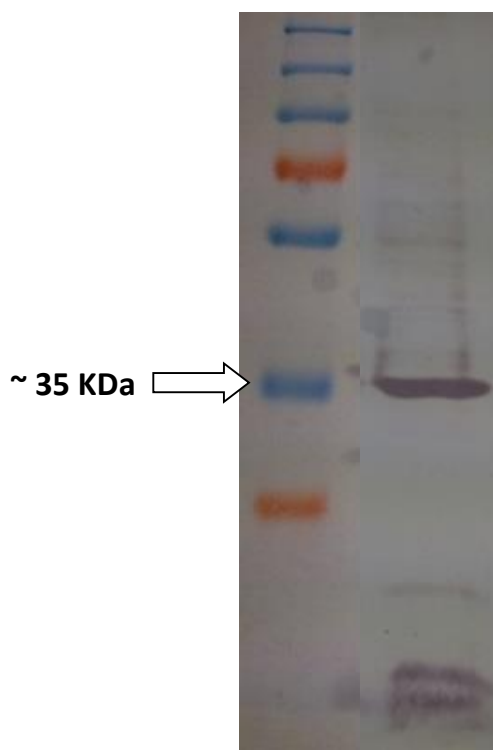


Figura 19. Western Blot. Proteínas en membrana de nitrocelulosa con anticuerpos policlonales de conejo contra Omp's de SE y anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano.

Carril 1: Marcador de peso molecular.

Carril 2: Omp's de *Salmonella*

6.8 Sensibilidad del Western Blot

Para determinar la cantidad mínima detectable de proteína en el WB se hicieron diluciones dobles seriadas de OMPs de SE. En la **figura 20** se observa el patrón electroforético de las OMPs. De izquierda a derecha se observa la disminución gradual de la concentración proteínas.

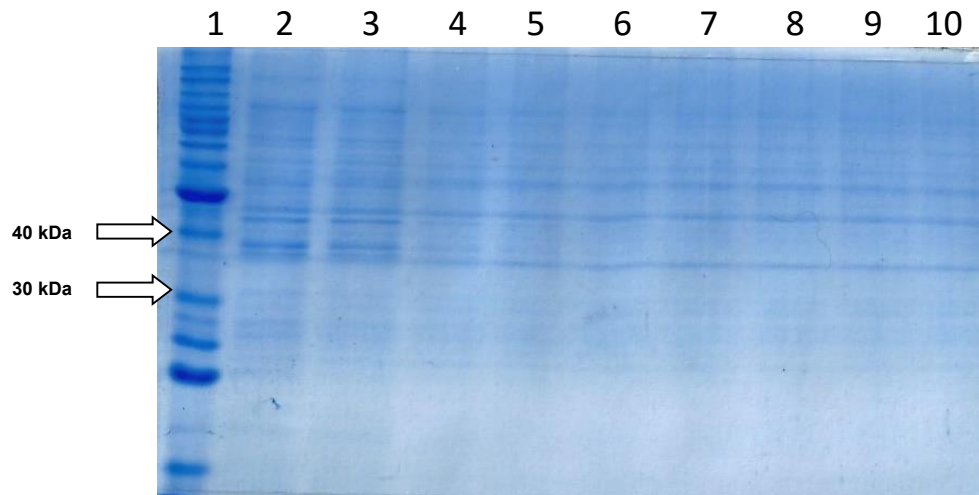


Figura 20. Gel desnaturalizante de poliacrilamida - SDS. Gel concentrador (4%) - Gel separador (12%). Teñido con Azul de Comassie **Carril 1:** Marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder. **Carril 2:** 2 µg. **Carril 3:** 1 µg. **Carril 4:** 0.5 µg. **Carril 5:** 0.25µg. **Carril 6:** 0.125 µg. **Carril 7:** 0.062 µg. **Carril 8:** 0.031 µg. **Carril 9:** 0.015 µg. **Carril 10:** 0.007 µg.

Una vez realizada la separación de proteínas en el gel de poliacrilamida el segundo gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. En la **Figura 21** se muestra la membrana revelada después de realizar el bloqueo e incubación con los anticuerpos. En los carriles del 2 al 6 se observa una señal suficiente para determinar la presencia de OmpA. En este ensayo se demostró que 0.125 µg de proteína es la cantidad mínima detectable utilizando las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

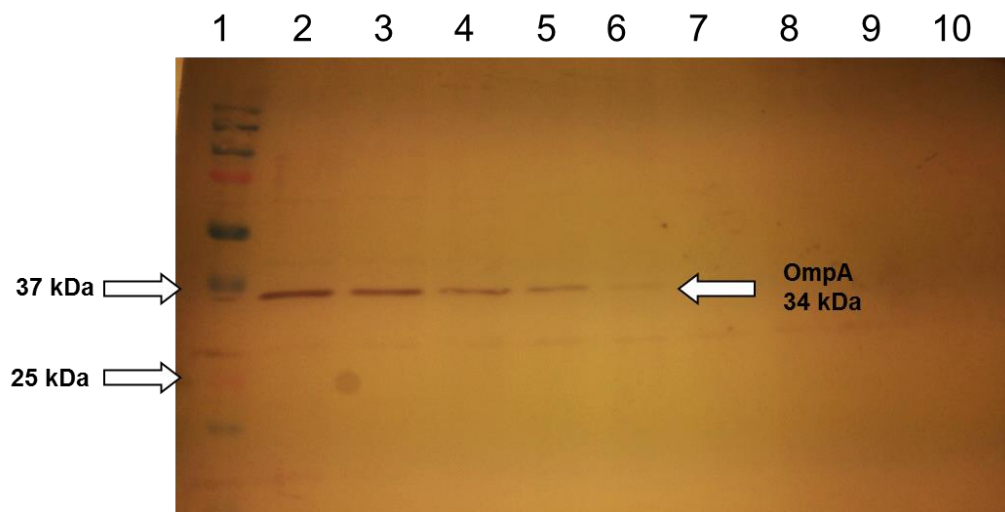


Figura 21. Western Blot. Membrana de nitrocelulosa revelada con anticuerpos policlonales de conejo contra Omp's de SE y anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano. **Carril 1:** Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. **Carril 2:** 2 µg **Carril 3:** 1 µg **Carril 4:** 0.5 µg **Carril 5:** 0.25 µg **Carril 6:** 0.125 µg **Carril 7:** 0.062 µg **Carril 8:** 0.031 µg **Carril 9:** 0.015 µg **Carril 10:** 0.007 µg

6.9 Detección de OmpA en monocapa de células HeLa y su sobrenadante

Las células transfectadas y no transfectadas (controles) así como sus sobrenadantes fueron colectados a las 24, 48 y 72 h después de la transfección. Para determinar la presencia de OmpA se obtuvieron proteínas totales de la monocapa mediante 2 procedimientos: en el primero se utilizó una solución de lisis y fueron precipitadas con TCA al 10%, en el segundo se realizó la lisis de manera mecánica. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con TCA al 10%. Estas fueron separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida mediante electroforesis (**Figura 22, 24 y 26**).

Después de separar las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloqueó, se agregaron los anticuerpos primarios y secundarios para visualizar la presencia o ausencia de OmpA. En los tres tiempos, 24 h (**Figura 23**), 48 h (**Figura 25**) y 72 h (**Figura 27**) se observa la presencia de la proteína OmpA únicamente en el control positivo que son OMPs de SE. También se observan otras bandas en el control que corresponde a otras OMPs detectadas por los anticuerpos policlonales. En el resto de los carriles no existe señal.

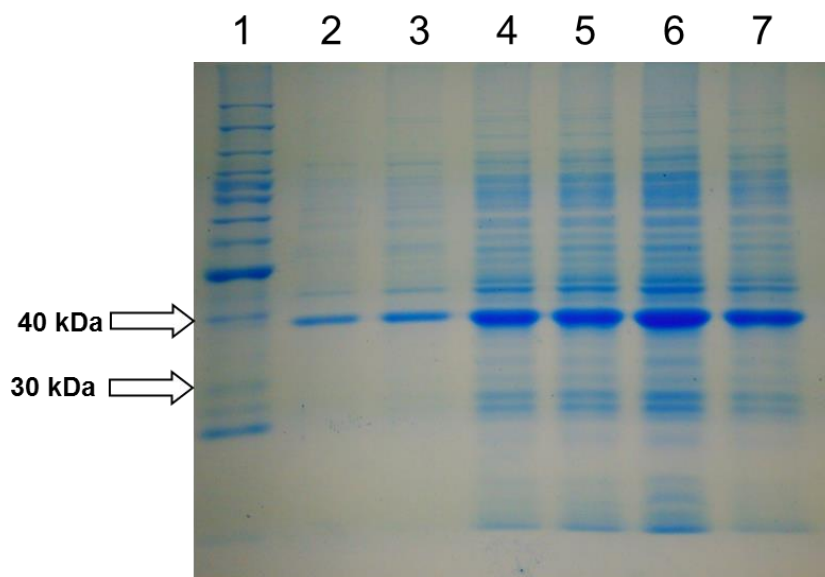


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de proteínas - SDS. Gel concentrador (4%). Gel separador (12%). Muestras obtenidas a las **24 h**. **Carril 1:** Marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder. **Carril 2:** Proteínas de la monocapa precipitadas con TCA (5 µg). **Carril 3:** Proteínas de la monocapa obtenidas por lisis mecánica (5 µg). **Carril 4:** Proteínas del sobrenadante precipitadas con TCA (15 µg). **Carril 5:** Sobrenadante sin precipitar (15 µg). **Carril 6:** Proteínas de la monocapa de células HeLa sin transfectar (5 µg). **Carril 7:** Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis (15 µg).

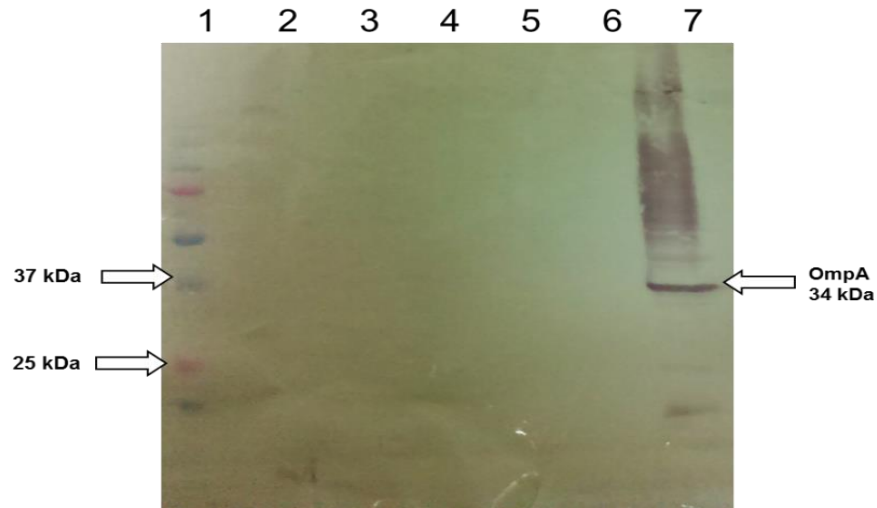


Figura 23. Western Blot. Membrana de Nitrocelulosa. Anticuerpo primario policlonal de conejo contra OMPs de SE y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano. Muestras obtenidas de la monocapa y sobrenadante de células transfectadas o no. **24 h.** **Carril 1:** Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Bio-Rad®. **Carril 2:** Proteínas de la monocapa precipitadas con TCA. **Carril 3:** Proteínas de la monocapa obtenidas por lisis mecánica. **Carril 4:** Proteínas del sobrenadante precipitadas con TCA. **Carril 5:** Sobrenadante sin precipitar. **Carril 6:** Proteínas de la monocapa de células HeLa sin transfectar. **Carril 7:** Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis.

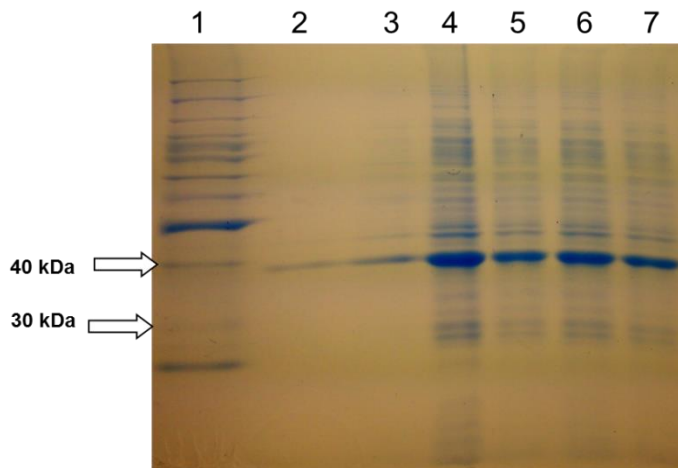


Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de proteínas - SDS. Gel concentrador (4%). Gel separador (12%). Muestras obtenidas a las **48 h.** **Carril 1:** Marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder. **Carril 2:** Proteínas de la monocapa precipitadas con TCA (5 µg). **Carril 3:** Proteínas de la monocapa obtenidas por lisis mecánica (5 µg). **Carril 4:** Proteínas del sobrenadante precipitadas con TCA (15 µg). **Carril 5:** Sobrenadante sin precipitar (15 µg). **Carril 6:** Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis (15 µg). **Carril 7:** Proteínas de la monocapa de células HeLa sin transfectar (5 µg).

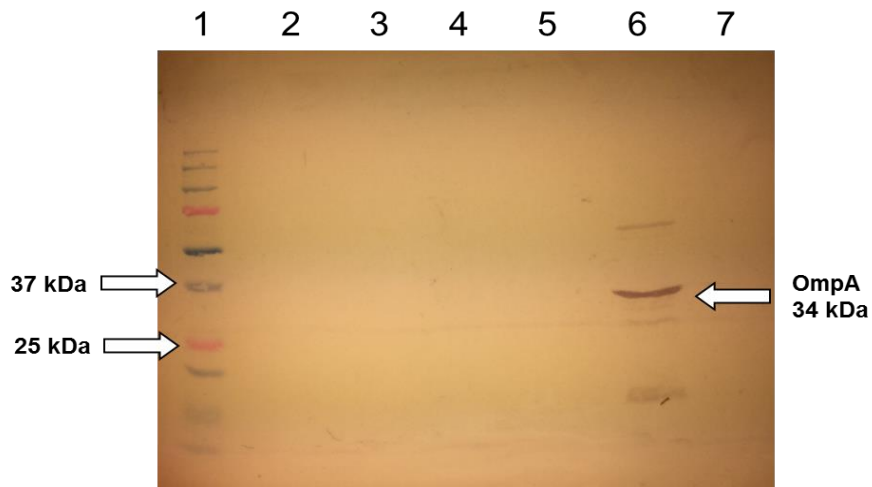


Figura 25. Western Blot. Membrana de Nitrocelulosa. Anticuerpo primario policlonal de conejo contra OMPs de SE y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano. Muestras obtenidas de la monocapa y sobrenadante de células transfectadas o no. **48 h.** **Carril 1:** Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Bio-Rad®. **Carril 2:** Proteínas de la monocapa precipitadas con TCA. **Carril 3:** Proteínas de la monocapa obtenidas por lisis mecánica. **Carril 4:** Proteínas del sobrenadante precipitadas con TCA. **Carril 5:** Sobrenadante sin precipitar. **Carril 6:** Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis. **Carril 7:** Proteínas de la monocapa de células HeLa sin transfectar.

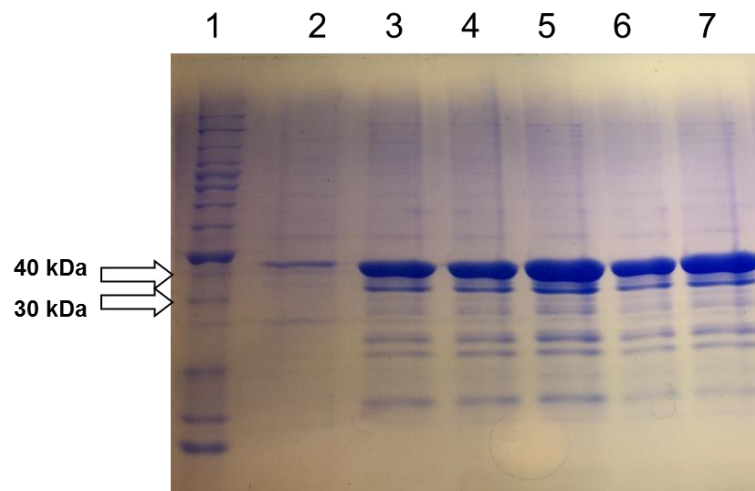


Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de proteínas - SDS. Gel concentrador (4%). Gel separador (12%). Muestras obtenidas a las **72 h.** **Carril 1:** Marcador de peso molecular Benchmark™ Protein Ladder. **Carril 2:** Proteínas de la monocapa precipitadas con TCA (5 µg). **Carril 3:** Proteínas de la monocapa obtenidas por lisis mecánica (5 µg). **Carril 4:** Proteínas del sobrenadante precipitadas con TCA (15 µg). **Carril 5:** Sobrenadante sin precipitar (15 µg). **Carril 6:** Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis (15 µg). **Carril 7:** Proteínas de la monocapa de células HeLa sin transfectar (5 µg).

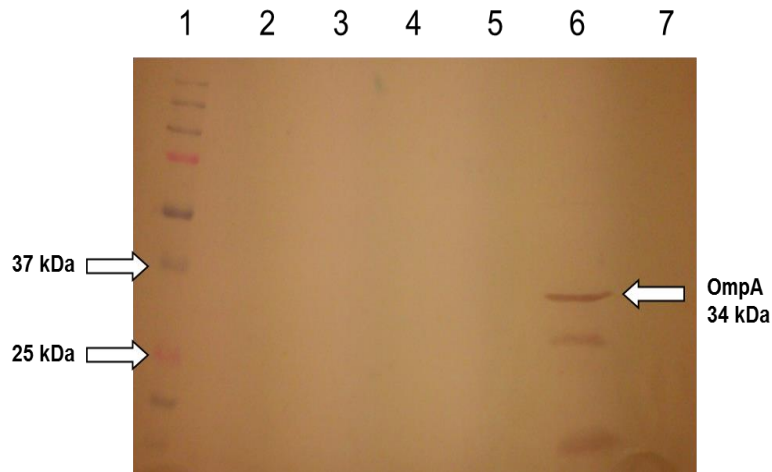


Figura 27. Western Blot. Membrana de Nitrocelulosa. Anticuerpo primario policlonal de conejo contra OMPs de SE y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano. Muestras obtenidas de la monocapa y sobrenadante de células transfectadas o no. 72 h. **Carril 1:** Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Bio-Rad®. **Carril 2:** Proteínas de la monocapa precipitadas con TCA. **Carril 3:** Proteínas de la monocapa obtenidas por lisis mecánica. **Carril 4:** Proteínas del sobrenadante precipitadas con TCA. **Carril 5:** Sobrenadante sin precipitar. **Carril 6:** Proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis. **Carril 7:** Proteínas de la monocapa de células HeLa sin transfectar.

En los ensayos de *Western Blot* la proteína OmpA de *Salmonella* Enteritidis no fue detectada en ninguno de los tiempos de cosecha de células y obtención de sobrenadante. Tampoco con ninguno de los dos métodos de obtención de las proteínas de la monocapa.

7. Discusión

En este trabajo no se detectó la presencia de OmpA tanto en el sobrenadante como en la monocapa en ninguno de los tres tiempos bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

Se logró determinar las condiciones ideales para la transfección de células HeLa con el plásmido pIHD428 utilizando Lipofectamine 2000® (Invitrogen®). La obtención del plásmido se realizó con Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research), el fabricante, en su hoja técnica indica que el ADN extraído con su producto tiene la pureza adecuada para su utilización de ensayos de restricción.

La presencia del plásmido en las células transfectadas se determinó recolectando las células de la monocapa, realizando extracción de ADN episomal con la metodología de Hirt⁶¹ y llevando a cabo la PCR con los iniciadores de *ompA*. Se desconocen las causas por las cuales se observaron bandas inespecíficas cuando se realizó la PCR a partir de ADN obtenido de células HeLa sin transfectar, sin embargo, fue posible determinar la identidad de *ompA* mediante su digestión con enzimas de restricción.

Existen estudios que han demostrado la expresión de los genes clonados en pVAX1® bajo la influencia del promotor CMV después de su transfección en células HeLa. Qiang Fang y col. (2013) detectaron la expresión de la proteasa romboide de *Eimeria tenella* después de su transfección en células HeLa con Lipofectamine 2000® a las 48 h utilizando inmunofluorescencia⁶³. Wang X. y col. (2013) también utilizaron inmunofluorescencia y RT-PCR para demostrar la expresión del gen ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo de células HeLa⁶⁴.

Usha Antony y col. (2014) detectaron en células CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectadas con Lipofectame® la expresión de un fragmento de 21 kDa de la proteína VP2 de la cápside del virus de la enfermedad infecciosa bursal que afecta pollitos jóvenes (IBDV) a nivel transcripcional y traduccional mediante RT-PCR y WB respectivamente a las 24 h post transfección⁶⁵.

Así mismo, Yungfeng Wang y col. (2013) utilizaron el vector pVAX1 conteniendo el inserto del gen F (proteína de fusión) del virus de Newcastle (NDV), con este transfectaron células BHK (Baby Hamster Kidney) con Lipofectamine 2000®. Determinaron la expresión de la proteína mediante inmunofluorescencia y WB. En todos estos casos la confirmación del inserto en el vector se comprobó por ensayos con enzimas de restricción y secuenciación⁶⁶.

En el trabajo realizado anteriormente⁵⁹ el gen *ompA* de SE fue insertado en el sitio múltiple de clonación del vector pVAX1®, justo después del promotor del Citomegalovirus humano (CMV). Este es un fuerte promotor capaz de conducir la expresión constitutiva de proteínas exógenas bajo su control dentro de una célula eucariota^{67,68,69}. El plásmido pIHD428 incluye la secuencia de *ompA*, que a su vez contiene la secuencia para el péptido señal y un sitio de Kozak en fase con el codón ATG de inicio. Esto es importante pues el manual de usuario del vector pVAX1® indica que debe existir una secuencia Kozak de iniciación de la traducción antes del ATG del codón de inicio para el buen funcionamiento del promotor CMV.

Para futuros trabajos se recomienda secuenciar la construcción para verificar la integridad del promotor y el gen *ompA*. Si alguna de estas secuencias sufrió mutaciones puntuales puede ser que no se lleve a cabo el inicio de la transcripción debido al desplazamiento, desfase o cambio de los marcos abiertos de lectura

(ORFs). Por otro lado, si la transcripción se lleva a cabo, la traducción y el ensamblaje de la proteína pueden verse alterados. Esto podría afectar el reconocimiento de epítopes específicos por los anticuerpos en la técnica de *Western Blot*.

También el uso de otra técnica inmunológica como la inmunofluorescencia podría permitir la detección de la proteína.

Por otra parte, se recomienda que en el futuro se utilicen otras técnicas de detección como RT-PCR para detectar la presencia de ARN mensajero el cual indicaría que hay transcripción del ADN plasmídico.

También es probable que la eficiencia de la transfección del plásmido sea muy baja y que por lo tanto los niveles de expresión de la proteína también lo sean.^{70, 71, 72}

Además de lo anterior podría modificarse la construcción original del vector añadiendo una etiqueta que produzca fluorescencia al paso de cierta longitud de onda ligada al gen *ompA*, como la proteína verde fluorescente (GFP) para detectar la expresión por microscopia de fluorescencia e incluso en transfecciones *in vivo*.^{73, 74, 75}

Debido a la gran cantidad de variables que afectan la transfección⁷⁶ es posible que con la inmunofluorescencia o la visualización por microscopia de fluorescencia se puedan buscar de manera más precisa las condiciones adecuadas para las células, cantidad de plásmido, lípidos catiónicos y tiempos de incubación para aumentar la eficiencia de la transfección.

Es posible que debido a los resultados obtenidos previamente⁵⁹ donde la inoculación del plásmido en gallinas impidió la colonización de SE en el oviducto, el tipo de células tenga alguna relación pues los promotores funcionan de manera

diferente en algunos tipos de células,^{82, 83} por lo que se recomienda probar la transfección de una línea celular proveniente de aves como las LMH (hepatocarcinoma de aves Leghorn).

Por último, Poh CL. y col. demostraron la expresión de OmpA de *Klebsiella pneumoniae* mediante *Western Blot* clonando el gen en el vector pVAX1 y transfectando células de rhabdomyosarcoma humano con Lipofectamina®. Además, demostraron la producción de una respuesta inmune humoral y celular al medir IgGs y citocinas en ratones inmunizados. Estos fueron desafiados con la bacteria por vía intradérmica y muscular, los resultados mostraron que hubo una protección del 60 y 80% respectivamente.⁷⁷

Debido a lo reportado en la literatura el candidato vacunal pIHD428 puede seguir siendo evaluado pues tiene las características adecuadas para la expresión de la proteína y producción de una respuesta inmune.

8. Conclusiones

- Se detectó la presencia del plásmido pIHD428 en células HeLa después de ser transfectado con Lipofectamine® 2000 (Invitrogen®).
- Fue determinado que 0.125 µg de proteína es la cantidad mínima necesaria para observar una señal positiva en el Western Blot bajo las condiciones utilizadas en este experimento.
- No se detectó la presencia de la proteína OmpA de *Salmonella* Enteritidis mediante la técnica de Western Blot en células HeLa transfectadas ni en el sobrenadante.

9. Prospectivas

- Realizar la secuenciación de la construcción pIHD428.
- Utilizar otras líneas celulares (LMH - 1 o fibroblastos de embrión de pollo).
- Detectar el ARN mensajero en las células eucariotas mediante la técnica de RT - PCR.
- La utilización de técnicas de inmunofluorescencia para observar la presencia de la proteína.
- Agregar a la construcción una etiqueta fluorescente para facilitar la detección de la proteína mediante fluorescencia.

10. Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. 2013. Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
2. Bennet JE., Dolin R., Blaser MJ. Principles and Practice of Infectious Diseases. 8ª Ed. Canada. Elsevier Health Sciences, 2014. Página: 2559.
3. U. S. Food and Drug Administration. 2015. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/ucm069966.htm>
4. European Food Safety Authority. 2011. Disponible en URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>
5. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 162 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Salmonella Surveillance Annual Report, 2012. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014.
7. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-07-12/signs-symptoms.html>
8. Cianflone NFC. Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter. *Current gastroenterology reports*. 2008;10(4):424-431.

9. Flores CR. Epizootiología de las Salmonelosis en Bovinos, Porcinos y Aves. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias S.A.R.H. Palo Alto, México, D.F. Clínica Veterinaria. 1981;3: 148-175.
10. Bagust TJ. Salud de las aves de corral y control de enfermedades en los países en desarrollo. Department of Avian Medicine, Faculty of Veterinary Science, University of Melbourne, Australia. FAO. 2008.
11. Mancera MA., Vázquez NJ., Heneidi ZA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. Tec Pecu Méx. 2004;42(2):287-294.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Salmonella Surveillance Annual Report, 2012. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014.*
13. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en URL: <http://www.fao.org/docrep/005/Y4392E/y4392e08.htm#bm08.2>
14. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. boletín conmemorativo die - edición especial 135 años. semana epidemiológica n° 43 del 25 al 31 de octubre de 2015.
15. Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México 2000;42(6):490-495.
16. Unión Nacional de Avicultores. Disponible en URL: <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/crecera-2-5-la-avicultura-mexicana-en-2015>

17. Mancera MA., Vázquez NJ., Ontiveros CM de L., Durán VS., López HD., Tenorio GVR. Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. *Técnica Pecuaria en México*, 2005;43(002):229-237
18. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *The EFSA Journal* (2004) 114, 1-74.
19. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(7):2465-2467.
20. Giannella RA. Salmonella. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 21. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>
21. Grimont PAD., Weill FX. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. 9ª Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur. France. 2007.
22. CDC. National *Salmonella* Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
23. Wray C., Wray A. *Salmonella* in Domestic Animals. 1ª Ed. CABI Publishing. 2000. United Kingdom. J. De Vylder, J. Dewulf, S. Van Hoorebeke, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems *Poultry Science* (2011) 90 (7): 1391-1396 doi:10.3382/ps.2010-00944

24. Thiagarajan D., Saeed AM., Asem EK. Mechanism of Transovarian Transmission of *Salmonella enteritidis* in Laying Hens. *Poultry Science*. 1994 73(1): 89-98 doi:10.3382/ps.0730089
25. Álvarez-Ordóñez., Begley M., Prieto M., Messens W., López M., Bernardo A., Hill C. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, December 2011 157: 3268-3281, doi: 10.1099/mic.0.050351-0
26. Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL, Foster JW. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1995;177(14):4097-4104.
27. Álvarez-Ordóñez A., Fernández A., López M., Arenas R., Bernardo A. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. Elsevier. 2008. 123, (3): 212–219.
28. Book Section. 2011. 978-94-007-0939-3. Bacterial Adhesion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Linke E., Dirk, Goldman E., Adrian R. Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_2 Springer Netherlands. 2011-01-01. A Wagner, Carolin A. Hensel, Michael P. 17-34 English.
29. McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology*. 2009;12(1):117-124. doi:10.1016/j.mib.2008.12.001.
30. Haraga A., Ohlson MB., Miller SI. *Salmonella* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*. 2008. (6): 53-66 doi:10.1038/nrmicro1788.

31. De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. 97(2): 233-245.
32. Keller LH, Benson CE, Krotec K, Eckroade RJ. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 1995;63(7):2443-2449.
33. Ruiz FG., Constantino CF., Quintana LJA., Cedillo PC., Urquiza BO. Patogenicidad de *Salmonella enteritidis* FT 13^a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko in broiler chickens. *Vet. Méx.*, 2008;39(2):145-160.
34. Koebnik R., Locher KP., Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* 2000. 37(2): 239-253.
35. White SH., Ladokhin AS., Jayasinghe., Hristova K. How Membranes Shape Protein Structure. *The Journal of Biological Chemistry.*, 2001. 276;(35): 32395-32398.
36. Marcoux J, Politis A, Rinehart D, et al. Mass spectrometry defines the C-terminal dimerization domain and enables modeling of the structure of full-length OmpA. *Structure (London, England: 1993)*. 2014;22(5):781-790. doi:10.1016/j.str.2014.03.004.
37. Smith SGJ., Mahon V., Lambert MA., Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters* Aug 2007, 273 (1) 1-11; DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00778.x
38. Lee JS, Jung ID, Lee C-M, et al. Outer membrane protein a of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates dendritic cells and enhances Th1

- polarization. *BMC Microbiology*. 2010;10:263. doi:10.1186/1471-2180-10-263.
39. Hassan JO., Mockett AP., Catty D., Barrow PA. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. *Avian Dis*. 1991. 35(4):809-19.
40. Barrow PA., Lovell MA. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Avian Pathology*. 1991. 20(2):335-348.
41. Gast RK., Stone HD., Holt PS. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella enteritidis* by laying hens. *Avian Dis*. 1993; 37(4):1085-1091.
42. Gantois .I, Ducatelle R., Timbermont L., Boyen F., Bohez L., Haesebrouck F., Pasmans F., van Immerseel F. Oral immunization of laying hens with the live vaccine strains of TAD Salmonella vac® E and TAD Salmonella vac® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine*, 24(37–39): 6250-6255.
43. Michael H. Kogut, Guillermo I. Tellez, Edward D. McGruder, Billy M. Hargis, John D. Williams, Donald E. Corrier, John R. DeLoach, Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections, *Microbial Pathogenesis*, Volume 16, Issue 2, February 1994, Pages 141-151
44. Téllez GI., Kogut MH., Hargis BM. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks. *Avian Dis*. 1993; 37(4):1062-1070.

45. Gordon MA, Jack DL, Dockrell DH, Lee ME, Read RC. Gamma interferon enhances internalization and early nonoxidative killing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by human macrophages and modifies cytokine responses. *Infection and Immunity*. 2005;73(6):3445-3452. doi:10.1128/IAI.73.6.3445-3452.2005.
46. Liu W., Yang Y., Chung N., Kwang J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella enteritidis* after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. *Avian Dis*. 2001; 45(4): 797-806.
47. Ochoa-Repáraz J., Sesma B., Álvarez M., Renedo MJ., Irache JM., Gamazo C. Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet. Res.*, 35 3 (2004) 291-298.
48. Salazar-González RM., Maldonado-Bernal C., Ramírez-Cruz NE., Rios-Sarabia N., Beltrán-Nava J., Castañón-González J., Castillo-Torres N., Palma-Aguirre JA., Carrera-Camargo M., López-Macías 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): 115-122
49. Donnelly JJ., Ulmer JB., Shiver JW., Liu MA. DNA Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. 15:617-48.
50. Gurunathan S., Klinman DM., Seder RA. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. 18:927-974.

51. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature reviews Genetics*. 2008;9(10):776-788. doi:10.1038/nrg2432.
52. Mota-Sánchez J. Vacunas de AND: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Pública de México*. 2009; 51(3):463-469.
53. Gurunathan S., Wu C-Yu. Freidag BL., Seder RA. DAN vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12(4):442-7
54. Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, Muthumani K, Weiner DB. DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert review of vaccines*. 2010;9(7):747-763. doi:10.1586/erv.10.57.
55. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: Current Progress. Plotkin S, ed. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(3):296-302. doi:10.1093/cid/cir334.
56. Díaz DJC., Barrera VM. Las vacunas de ADN: una promisorio medicina para el paciente veterinario. 2006;7(02): 1-15
57. Jin H., Li Y., Ma Z., Zhang F., Xie Q., Gu D., Wang B. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine*. 2004; 22(21-22):2925-35
58. J. Sambrook, D. W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 1. Third Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. 2001.
59. Hernández-Morales I. Elaboración y Evaluación de una Vacuna de ADN contra la Proteína de Membrana Externa A (OmpA) de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis para Aves de Postura. (Tesis de Licenciatura). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2008.

60. ThermoFisher Scientific Inc. 2015. Lipofectamine® 2000 Reagent. Disponible en [URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf)
61. Eizuru Y., Inagawa S., Minamishima Y. Application of “Hirt Supernatant” DNA to the Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984; 20: 1012 – 1014.
62. Bradford MM. A Rapid Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem*. 1976. 72, 248-254
63. Liu Y., Zheng J., Li J., Gong P., Zhang X. Protective immunity induced by a DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* rhomboid against homologous challenge. *Parasitol Res*. 2013. 112: 251-257.
64. Xuemei W., Ying W., Yuqin X., Yong C., Zhiyong T., Hui X., Jie T., Qiang F. Construction, identification and immunoreactivity of *Mycobacterium tuberculosis* DNA vaccine pVAX1/ESAT-6 plasmid. *J. South Med Univ*. 2013. 33: 945-950.
65. Pradhan SN., Prince PR., Madhumathi., Arunkumar C., Roy P., Narayanan RB. Antony U. DNA vaccination with VP2 gene fragment confers protection against Infectious Bursal Disease Virus in chickens. *Vet. Microbiol*. 2014. 171: 13-22.
66. Zhao K., Li W., Huang T., Luo X., Chen G., Zhang Y., Guo C., Dai C., Jin Z., Zhao Y., Cui H., Wang Y. Preparation and Efficacy of Newcastle Disease

- Virus DNA Vaccine Encapsulated in PLGA Nanoparticles. PLOS ONE. 2013. 8: 1-8.
67. Fracassi C., Postiglioni L., Fiore G., di Bernardo D. Automatic Control of Gene Expression in Mammalian Cells. American Chemical Society. 2015.
68. Tretyakova I, Nickols B, Hidajat R, Jokinen J, Lukashevich IS, Pushko P. Plasmid DNA Initiates Replication of Yellow Fever Vaccine In Vitro and Elicits Virus-Specific Immune Response in Mice. *Virology*. 2014;0:28-35.
69. Qin JY, Zhang L, Clift KL, et al. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. Hansen IA, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10611.
70. Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(2):e9.
71. Bryan R. Cullen, [71] Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1987, Volume 152, Pages 684-704
72. Horst DB., Jean-Pierre A., Gonzalo JM., Alain RB. Large scale transient expression with COS cells *Cytotechnology*, 1996, Volume 18, Number 3, Page 183.
73. Praetorius M., Pfannenstiel S., Klingmann C., Baumann I., Plinkert PK, Staecker H. Expression patterns of non-viral transfection with GFP in the organ of Corti in vitro and in vivo. *Journal: Advanced Drug Delivery Reviews*, HNO, 2008, Volume 56, Number 5, Page 524.

74. Fujiki Y, Tao K, Bianchi DW, Giel-Moloney M, Leiter AB, Johnson KL. Quantification of green fluorescence protein by *in vivo* imaging, PCR and flow cytometry: comparison of transgenic strains and relevance for fetal cell microchimerism. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008;73(2):11-118.
75. Hoffman R. Application of GFP imaging in cáncer. *Laboratory Investigation* (2015) **95**, 432–452
76. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(8):3173-3178.
77. Kurupati P, Ramachandran NP, Poh CL. Protective Efficacy of DNA Vaccines Encoding Outer Membrane Protein A and OmpK36 of *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 2011;18(1):82-88. doi:10.1128/CVI.00275-10.
78. Jf Guillot, C Beaumont, F Bellatif, C Mouline, F Lantier, *et al.* Comparison of resistance of various poultry lines to infection by *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Research*, BioMed Central, 1995, 26 (2), pp.81-85.
79. Tacchini M.; Caraffini A.; Montamat M.; Spitale N.; Bosio Y. y Minguez A. 2010. Empiema causado por *Salmonella typhimurium*. *Rev Chil Enf Respir*; 26: 91-94.
80. Células Competentes DH5 α TM. ThermoFisher Scientific®. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>
81. Pereira, V.B. DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications. *World Journal of Vaccines*, (2014) 4, 50-71.

82. Liu J., Jones KL., Sumer H., Verma PJ. Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. *Mol. Reprod. Dev.* 2009. 76; (6): 1098-2795
83. Chung S., Kwang-Soo K. Transfection and Promoter Analysis in Embryonic Stem Cells. *Embryonic Stem Cell Protocols, Volume 1: Isolation and Characterization.* Humana Press 2006. pp 187-193.

Anexo 1. Medios de Cultivo

Caldo Luria Bertani (LB)

Cloruro de Sodio (JT Baker®)	10 g
Triptona (Becton Dickinson®)	10 g
Extracto de Levadura (Becton Dickinson®)	5 g
Agua destilada	950 mL

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 115 °C.

Agar LB

Al preparar caldo LB agregar 15 g de agar-agar (Difco®) para 1 L.

Medio SOB

Triptona (Becton Dickinson®)	20 g
Extracto de Levadura (Becton Dickinson®)	5 g
Cloruro de Sodio (JT Baker®)	0.5 g
Agua destilada	950 mL

Al disolver los componentes adicional 10 mL de KCl 250 mM, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1 L. Esterilizar durante 20 min, 15 lb de presión y a 115 °C. Antes de utilizar agregar 5 mL de MgCl₂ 2 M.

Medio SOC

A 1 L de medio SOB agregar 20 mL de glucosa 1 M para obtener una concentración final 20 mM.

Anexo 2. Soluciones

Solución TAE 50X

Tris base (Affymetrix USB®)	242 g
Ácido acético glacial (JT Baker®)	57.1 mL
Ácido Etilen Diamino Tetracético - EDTA (Affymetrix USB®)	37.2 g
Aforar a 1 L de agua destilada.	

Solución de Hirt (Hirt Preparation)

Compuesto	Concentración Final
Tris - HCl pH 8.0	0.01 M
Dodecyl Sulfato de Sodio Sigma Aldrich® (SDS)	0.6%
EDTA	0.01 M

Solución de Lisis (células eucariotas)

Compuesto	Concentración Final
Triton X-100	1 %
Deoxicolato (Sigma Aldrich®)	0.2%
SDS	0.1%

Soluciones para extracción de plásmido (Lisis alcalina)

- Solución I

50 mM glucosa
25 mM Tris – HCl pH 8
10 mM EDTA pH 8

- Solución II

0.2 N NaOH
1% SDS

- Solución III

5 M Acetato de Potasio	60 mL
Ácido Acético Glacial	11.5 mL
Agua Destilada	28.5 mL

Soluciones para proteínas, electroforesis desnaturizante y WB

Reactivo de Bradford

Coomasie Brilliant Blue G-250	100 mg
Etanol Absoluto	50 mL
Ácido Fosfórico	100 mL
Aforar a 1 L con agua destilada.	

Gel de Poliacrilamida Separador

H ₂ O destilada	3.35 mL
Tris HCl pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida 30%	4 mL
Persulfato de amonio	60 µL
TEMED	7µL

Gel de Poliacrilamida Concentrador

H ₂ O destilada	6.1 mL
Tris HCl pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida 30%	1.3 mL
Persulfato de amonio	60 µL
TEMED	10 µL

Amortiguador de corrida

Tris base 25 mM	3.03 g
Glicina 192 mM	14.4 g
SDS 0.1%	1.0 g

Solución Desteñidora

Metanol	160 mL
Ácido acético	40 mL
H ₂ O	240 mL

Amortiguador de Transferencia

Tris	3.02 g
Glicina	14.41 g
Metanol	200 mL
Aforar a 1 L con agua destilada	

SoluciónTBS

Tris base 100 mM	12.11 g
NaCl 150 mM	8.76 g

Amortiguador de carga

0.5 M Tris - HCl pH 6.8	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10 %	1.6 mL
2 – Mercaptoetanol	0.4 mL
Agua destilada	0.4 mL
Azul de Bromofenol	Cristales