

SINTESIS DE LA GLICOPROTEINA DE
SUPERFICIE DE LOS ROTAVIRUS EN
SALMONELLA TYPHIMURIUM Y SU
CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Carlos F. Arias Ortíz, en el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM, con apoyo Beca-Tesis de PUIS-DGAPA.

ENRIQUE SALAS VIDAL.

MAYO DE 1990.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.

I. INTRODUCCION.

1. GENERALIDADES.
2. LOS ROTAVIRUS.
 - A) CLASIFICACION.
 - B) ESTRUCTURA.
 - C) CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE LA CAPA EXTERNA.
 - D) CARACTERISTICAS CLINICAS.
 - E) PATOGENESIS.
 - F) CLASIFICACION SEROLOGICA DE LOS ROTAVIRUS.
 - G) INMUNOLOGIA.
3. SINTESIS DE LAS PROTEINAS DE CAPA EXTERNA DE LOS ROTAVIRUS EN *E.coli*.
4. EXPRESION DE VP7- β GAL EN *Salmonella typhimurium* ATENUADA.
 - A) CLASIFICACION DE *Salmonella*.
 - B) PATOGENIA DE *Salmonella*.
 - C) *Salmonella* ATENUADA COMO VACUNA.
 - D) *Salmonella* ATENUADA COMO ACARREADOR DE ANTIGENOS HETEROLOGOS.
 - E) SINTESIS DE LA GLUCOPROTEINA DE SUPERFICIE DEL ROTAVIRUS SA11, EN *Salmonella typhimurium* SL3261.

II. OBJETIVOS.

III. MATERIALES Y METODOS.

1. VIRUS, BACTERIAS Y LINEAS CELULARES EUKARIOTES.
2. MEDIOS DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS.
3. PLASMIDOS.
4. MANIPULACION DE ADN.
 - A) EXTACCION DE PLASMIDOS.
 - B) ENDONUCLEASAS Y CONDICIONES DE REACCION.
 - C) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.
 - D) ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.
 - E) TINCION CON BROMURO DE ETIDIO.
 - F) TINCION CON PLATA.
5. TRANSFECCION BACTERIANA.
6. OBTENCION DE FAGO TRANSDUCTANTE P22.
7. OBTENCION DE *Salmonella typhimurium* SL3261 TRANSDUCTANTES.
8. EXPRESION IN VITRO DE VP7- β GAL EN *S.typhimurium*.
 - A) ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE PROTEINAS.
 - B) TINCION CON COOMASSIE.
 - C) DENSITOMETRIA DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.
 - D) ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA.
9. DETERMINACION DE ESTABILIDAD DE PLASMIDOS EN *S.typhimurium* SL3261 EN AUSENCIA DE PRESION DE SELECCION.
10. INMUNOLOGIA.
 - A) ANIMALES.

- B) CRECIMIENTOS DE INOCULOS.
- C) INOCULACION DE ANIMALES.
- D) TOMA DE SUEROS.
- E) RECUPERACION DE BACTERIAS EN HOMOGENADOS DE HIGADO Y BAZO.
- G) ENSAYO DE ELISA
 - i) VS LIOPOLISACARIDO DE *S.typhimurium*.
 - ii) VS β -GAL.
 - iii) VS VP7 EN PARTICULAS VIRALES COMPLETAS.
- H) ENSAYO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.
- I) ENSAYO DE INHIBICION DE HEMAGLUTINACION.

IV.RESULTADOS.

1. PRESENCIA DE pUMA93Z Y pUMA93Z-ROP.
- 2.A) EXPRESION DE VP7- β GAL EN SL3261.
B) ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA, EN LISADOS BACTERIANOS.
3. ESTABILIDAD *IN VITRO* DE pUMA93Z Y pUMA93Z-ROP EN SL3261.
4. CRECIMIENTO Y PERSISTENCIA *IN VIVO* DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES.
5. INMUNOLOGIA.
 - A) ANTICUERPOS TOTALES CONTRA VP7, β -GAL Y LPS.
 - B) ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE SA11.
 - C) INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

V.DISCUSION.

1. EXPRESION DE VP7- β GAL EN SL3261.
2. EFECTO DE ROP EN PLASMIDOS EN *SALMONELLA*.
3. PERMANENCIA EN RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS RECOMBINANTES DE *SALMONELLAS*.
4. SL3261 COMO ACARREADOR DE ANTIGENOS DE ROTAVIRUS AL SISTEMA INMUNE EN RATONES.

VI.REFERENCIAS.

INTRODUCCION.

GENERALIDADES.

Las enfermedades gastrointestinales causadas por patógenos entéricos, representan una de las principales causas de mortalidad y desnutrición en el tercer mundo (Assad, 1987) (Tabla 1), debido a las serias alteraciones que provocan en las funciones de absorción de nutrientes y agua en la mucosa intestinal (Drasar y Barrow 1985).

En África, América Latina y Asia, ocurren alrededor de 3 a 5 mil millones de episodios diarreicos al año, y de cinco a diez millones de muertes en niños menores de cinco años (Warren 1985).

Los agentes etiológicos bacterianos más importantes de la gastroenteritis infantil son *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Campilobacter jejuni* y *Shigella* spp; los virales son: agente Norwalk, calcivirus, astovirus, rotavirus, adenovirus, y los virus redondos pequeños. Se ha reportado que los rotavirus son el agente etiológico más frecuente de la gastroenteritis infantil no bacteriana (Rao y Melnick 1986; Cuckor y Blackglow 1984).

Aproximadamente el 25% de los casos de hospitalización por diarrea, en niños entre los seis meses y tres años de edad, en México, son provocados por rotavirus (Espejo, *et al* 1978). Los rotavirus infectan también a diversas especies animales domesticas de importancia económica como los cerdos y terneras (Kapikian, *et al* 1984), que provocan alta mortalidad y retardo en el crecimiento, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas.

Se sabe que la vacunación es una de las mejores formas de controlar diferentes tipos de enfermedades infecciosas (Liew 1985), incluyendo las entéricas (Dougan, *et al* 1987). sin embargo, hasta la fecha no existe una

vacuna contra los rotavirus, por lo que su desarrollo es de gran importancia tanto médica como económica.

Infeccion	Infecciones Totales	Muertes	Infecciones con sintomatología
Diarreas	3 a 5,000,000	5 a 10,000	3 a 5,000,000
Respiratorias		4 a 5,000	
Malaria	800,000	1,200	150,000
Sarampion	85,000	900	80,000
Esquistosomiasis	200,000	500 a 1,000	20,000
Tosferina	70,000	250 a 450	20,000
Tuberculosis	1,000,000	400	7,000
Tetanos	120 a 180	100 a 150	120 a 180
Difteria	40,000	50 a 60	700 a 900
SA Tripanosomiasis	12,000	60	1,200
Oncocercosis	30,150	20 a 50	2 a 5,000
Meningitis	150	30	150
Amibiasis	400,000	30	1,500
Ascariasis	8000,000 a 1,000,000	20	1,000
Poliomielitis	80,000	10 a 20	2,000
Tifoidea	1,000	25	500
Lechmaniasis	12,000	5	12,000
A Tripanosomiasis	1,000	5	10
Lepra		muy baja	12,000
Trichuriasis	500,000	baja	100
Filariasis	250,000	baja	2 a 3,000
Giardiasis	200,000	muy baja	500
Dengue	3 a 4,000	0.1	1 a 2,000

Tabla 1- Prevalencia, mortalidad y morbilidad de las principales enfermedades infecciosas en Africa, Asia y America Latina, de 1977 a 1978. Todos los datos en miles de casos por ano.(Tomado de Warren 1985).SA)Sudamérica, A)Africa.

ROTAVIRUS

CLASIFICACION.

Los rotavirus son un género clasificado dentro de la familia Reoviridae (Murphy 1985). En esta familia se agrupan seis géneros: reovirus, orbivirus, rotavirus, fitoreovirus, fijivirus y un grupo de virus citoplásmicos polihédricos hasta ahora sin nombre (Kapikian y Chanock 1985). Los virus de esta familia

se caracterizan por tener una doble cápside protéica, no cubierta por lípidos, la cual contiene un genoma segmentado de ARN de doble cadena (Christensen 1989).

ESTRUCTURA.

Al microscopio electrónico los rotavirus se observan como partículas icosaédricas, con un diámetro que oscila entre los 65 y los 75 nm. La doble cápside de los rotavirus envuelve a un genoma compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena (Kapikian y Chanock, 1985), cada uno de los cuales codifica para una proteína específica (Arias, *et al* 1982).

La cápside interna de los rotavirus está compuesta al menos por cuatro proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6 (Liu 1988), mientras que la externa por dos, VP4 y VP7 (Espejo, *et al* 1981; Estes, *et al* 1981). (Figura 1).

CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE LA CAPA EXTERNA.

La proteína VP4 es el producto del gen 4 en el rotavirus SA11, con una masa molecular relativa (M_r) de 88,000 (Espejo, *et al* 1981; Estes, *et al* 1981). Esta proteína se ha identificado como la hemaglutinina viral (Kalika, *et al* 1983) y como responsable de la internalización del virus a la célula huésped durante la infección viral (Fukuhara, *et al* 1988).

El tratamiento del virus con tripsina produce un corte en la proteína VP4, el cual está asociado con un aumento en la infectividad de los rotavirus medido en ensayos *in vitro* (Clark, *et al* 1981; Estes, *et al* 1981) y probablemente también en infecciones naturales en humanos (Jayashree, *et al*

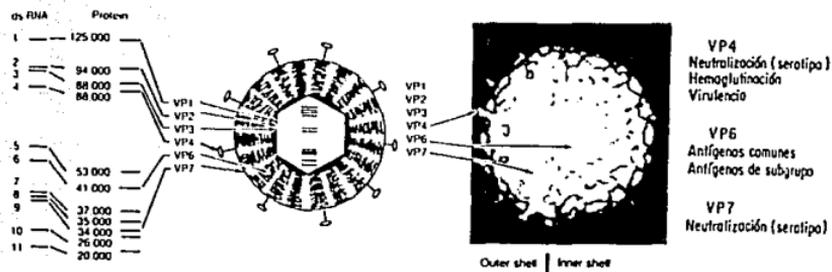


Figura 1.- Diagrama de la estructura de los rotavirus.

1988). El corte de VP4 genera dos productos VP5 (M-60,000) y VP8 (M-28,000) (Espejo, *et al* 1981; López, *et al* 1985).

La proteína 4 es capaz de inducir anticuerpos que neutralizan la infectividad viral. Se han descrito anticuerpos monoclonales contra esta capaces tanto de neutralizar al virus *in vitro* (Greenberg, *et al* 1983), como de proteger pasivamente contra la diarrea a ratones lactantes (Offit, *et al* 1986). Los epitopes de neutralización de la proteína VP4, se han localizado recientemente. Estos se encuentran en los aminoácidos 305, 433 y uno más que depende de la conformación, ubicado en la interacción de los aminoácidos (aa) 392 y 439; éstos epitopes se encuentran hacia el extremo amino-terminal de la proteína (Mackow, *et al* 1988, Taniguchi, *et al* 1988).

La proteína VP7 tiene una M_r de 37,000 (Chan, *et al* 1986), la cual se encuentra glucosidada con muchos residuos de manosa (Kabcenell y Atkinson 1985). Esta proteína es codificada por el segmento 9 de ARN en SA11 y diversas evidencias sugieren, que es a través de ella que el virus interactúa con su receptor en la superficie de la célula huésped (Kapikian y Chanock 1985; Choppin, *et al* 1978; Sabara, *et al* 1985; Fukuhara, *et al* 1988). La proteína VP7 es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes cuando se encuentra como parte de la partícula viral (Kalica, *et al* 1981), como proteína aislada (Matsuno, *et al* 1983), e incluso cuando se utilizan fragmentos de ella (Sabara, *et al* 1985). Al igual que para la VP4, se han descrito anticuerpos monoclonales dirigidos contra la VP7 que son capaces de neutralizar la infectividad viral *in vitro* (Greenberg, *et al* 1983), y de proteger pasivamente a los ratones contra la diarrea causada por rotavirus (Offit, *et al* 1986).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Las dos características clínicas principales en la infección por rotavirus son: la aparición repentina de vómitos, con duración promedio de 3 días, y la diarrea,

con duración promedio de 5 a 6 días (Kapikian y Chanock, 1985). En la Tabla 2 se muestran las características clínicas que se observan en las infecciones por rotavirus comparadas con diarreas agudas con otro origen.

PATOGENESIS.

Los rotavirus son agentes infecciosos ampliamente distribuidos. Se han aislado rotavirus de humanos, chimpancés, gorilas, terneros, puercos, borregos, cabras, conejos, antílopes, gacelas, impalas, adax, perros, caballos, ratones, gatos, pavos, pollos y patos (Kapikian, *et al* 1984).

Los rotavirus infectan las células de las puntas de las vellosidades del intestino delgado (Kapikian y Chanock 1985). En ratones se ha observado que a las 24 horas postinfección, los rotavirus provocan el acortamiento de las vellosidades, isquemia intestinal y disminución en la irrigación sanguínea a las vellosidades infectadas (Osborne, *et al* 1988).

Algunas alteraciones en la fisiología de la célula infectada son la disminución en el transporte de glucosa acoplado a sodio, decremento en la actividad de disacaridasas, como sacarosas, maltasas y lactasas, y un aumento en la actividad de timidín cinasas, disminución en sodio intracelular y de adenosín trifosfatasa (Kapikian y Chanock 1985, Christensen 1989). Las alteraciones a nivel celular reportadas son: distensión de las cisternas del retículo endoplásmico e hinchamiento de las mitocondrias (Kapikian y Chanock 1985).

Síntomatología	% que presenta la sintomatología	
	Con rotavirus	Sin rotavirus
Vómito	96	58
Fiebre	77	61
Deshidratación	83	40
Hipertónica	5	16
Isotónica	95	77
Hipotónica	0	6
Irritabilidad	47	40
Letargo	36	27
Rinitis	26	22
Timpanos enrojecidos	19	9
Nódulos linfáticos-cervicales palpables	18	9

Tabla 2- Características clínicas de 150 niños hospitalizados con gastroenteritis-aguda. (Modificado de Kapikian y Chanok 1985).

CLASIFICACION SEROLOGICA DE LOS ROTAVIRUS.

Los rotavirus están divididos en 5 grupos (del A al E) con base en las diferencias antigénicas de sus cápsides (Ushijima, *et al* 1989), la diferencia en el tamaño de los segmentos de ARN y en la hibridación diferencial de sus ácidos nucleicos (Yolken, *et al* 1988).

El grupo A es el que más comunmente infecta a los humanos. Sin embargo, recientemente se han descrito brotes provocados por rotavirus del grupo B en China (Fang, *et al* 1989) y del grupo C en Japon (Ushijima, *et al* 1989).

Dentro del grupo A existen varios serotipos de rotavirus, los cuales están definidos con base en la neutralización de la infectividad viral en ensayos *in vitro*, y están determinados principalmente por VP7 y en menor proporción por VP4 (Gerna, *et al*. 1988).

Entre los rotavirus del grupo A se han identificado 4 serotipos que

infectan a humanos, y recientemente se ha propuesto la existencia de dos serotipos más (Green *et al* 1989). dentro de este mismo grupo, se han descrito 6 serotipos en otras especies animales, dos de los cuales (3 y 4) presentan reacciones cruzadas con los serotipos correspondientes en humanos (Hoshino, *et al* 1984). Recientemente en nuestro laboratorio se ha propuesto la existencia de un nuevo serotipo de rotavirus, el cual infecta a cerdos (Ruiz, *et al* 1988).

INMUNOLOGIA.

Los factores inmunes que intervienen en la resistencia a infecciones causadas por rotavirus son poco comprendidos.

En infecciones naturales en niños se observa que los primeros anticuerpos séricos en aparecer son IgM en la fase aguda, los cuales son reemplazados por IgG en la fase convalesciente (Christensen 1989). Los anticuerpos de clase IgG contra rotavirus son detectables hasta doce meses más tarde.

En infecciones experimentales en ratones, se detectan anticuerpos de tipo IgA contra rotavirus en heces son detectables a los siete días (Eydellot, *et al.* 1984). En humanos su persistencia puede variar de una semana hasta 6 meses postinfección (Christensen 1989).

Los estudios de infecciones naturales en niños, sugieren que la aparición de anticuerpos séricos no está correlacionada con resistencia a infecciones. Por otro lado, en estudios con terneros, la presencia de anticuerpos neutralizantes en el lumen intestinal parece correlacionarse con resistencia a la infección. (Christensen 1989).

En niños alimentados con leche materna existen títulos más altos de anticuerpos IgA, en el lumen intestinal, contra rotavirus mas altos que en los

niños alimentados con leche en polvo (Christensen 1989). Los estudios de Hjelt y colaboradores (1987) indican que la presencia de este tipo de anticuerpos en lumen intestinal reduce las posibilidades de desarrollar infecciones, o hace las infecciones por rotavirus menos violentas y de menor duración (Kapikian y Chanock 1985); además la evidencia experimental en ratones indica que la aparición de este tipo de anticuerpos en el intestino está correlacionado con la disminución de antígenos virales en las heces (Eydelloth *et al* 1984). Se ha sugerido que en infecciones de neonatos por rotavirus tanto los anticuerpos tipo IgA, específicos contra rotavirus, como los inhibidores de tripsina son los principales factores de protección contra la infección (Jayashree, *et al* 1989), ya que se ha observado que las infecciones en neonatos alimentados con leche materna en general son asintomáticas, o con efectos poco severos debido a protección de tipo pasiva (Eydelloth, *et al* 1984).

En infecciones naturales en adultos se ha observado una correlación del nivel de anticuerpos séricos neutralizantes, en ensayos *in vitro* con la probabilidad de sufrir infecciones con evidencia clínica (Smith, *et al* 1983). Asimismo, en infecciones experimentales en humanos, se ha observado que los anticuerpos de tipo IgG séricos se correlacionan de manera directa con la probabilidad de infección, pero los niveles de anticuerpos tipo IgA en el fluido intestinal (jejuno) disminuyen las probabilidades de desarrollar la enfermedad, o de presentarla con sintomatología severa (Ward, *et al* 1989).

Recientemente se ha considerado que la inmunidad contra infecciones de rotavirus puede estar también dada por linfocitos T citotóxicos (Ward, *et al* 1989).

Por otro lado el papel de cada proteína del rotavirus en la respuesta inmune en infecciones naturales y de laboratorio es poco comprendida. No es todavía claro cual de los polipéptidos de la cápside externa (VP4 o VP7), induce un nivel mayor de anticuerpos neutralizantes. En adultos infectados con la cepa CJN se observó que los anticuerpos neutralizantes estaban mayoritariamente dirigidos contra VP4 (Ward, *et al* 1988), mientras que en infecciones naturales en niños de 1 a 15 meses, se ha observado que los títulos de anticuerpos contra VP7 son mayores que para VP4 (Ushijima, *et al* 1989).

Otro fenómeno interesante es la aparición de anticuerpos heterotípicos al serotipo del rotavirus que infectó primariamente. Algunos estudios indican que éste fenómeno se da en infecciones naturales (Puerto, *et al* 1987), y que se debe a la presencia de epitopes heterotípicos en las proteínas de la cápside externa (Taniguchi, *et al* 1988; Mackow 1988). La respuesta heterotípica no solo se ha correlacionado con anticuerpos neutralizantes sino también con linfocitos T citotóxicos (Offit y Dudzik 1988). Zheng y colaboradores (1988), sugieren que la respuesta heterotípica, reportada por otros grupos, se debe a infecciones previas subclínicas, ya que en los niños con infecciones naturales de rotavirus que estudiaron, nunca observaron la aparición de anticuerpos heterotípicos.

SINTESIS DE LAS PROTEINAS DE CAPA EXTERNA DE LOS ROTAVIRUS EN *E.coli*.

Las proteínas de la cápside externa de los rotavirus (VP4 y VP7), han demostrado ser inmunógenos adecuados para estimular la protección contra las

infecciones por rotavirus, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Recientemente se han clonado y secuenciado los genes 4 y 9 del rotavirus de simio SA11 (Arias, *et al* 1984; Lopez, *et al* 1985). Estos genes se han utilizado en el laboratorio para obtener la síntesis de regiones seleccionadas de las proteínas VP4 y VP7, en *E.coli*.

El vector de expresión pUMA481 dirige la síntesis de una región de VP4 (aminoácidos 42 al 387) que contiene los sitios de corte con tripsina responsables de la activación de la infectividad de los rotavirus. Esta región se sintetiza como producto de fusión con los primeros 98 aa de la polimerasa del fago MS2 (Arias *et al* 1987). Esta proteína de fusión contiene cinco de los siete epítopes de neutralización descritos para VP4 (Taniguchi, *et al* 1988; Mackow 1988).

El vector pUMA93Z (Figura 2), dirige la síntesis del 72% de la proteína VP7 madura, como producto de fusión con la β -galactosidasa de *E.coli* (Arias *et al* 1986). La región de VP7 incluida en esta construcción va del aminoácido 63 al 300, y le faltan 62 aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína madura y 26 aa del extremo carboxilo.

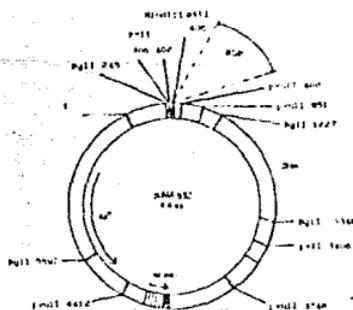


Figura 2- Diagrama del vector de expresión de la proteína híbrida VP7- β -galactosidasa, pUMA93Z. Se muestran los principales sitios de restricción utilizados para su caracterización. Lac poz' promotor originado del gene lac-Z. Ap es el gene marcador de resistencia a ampicilina.

El producto híbrido sintetizado (VP7-bgal), contiene los tres epitopes de neutralización reportados para VP7, aa 87 al 96, 145 al 150 y 211 al 223 (Dyall-Smith *et al* 1986).

Tanto VP7 como los fragmentos de VP4 expresados en *E. coli*, al inocularlas en ratones inducen anticuerpos séricos neutralizantes de la infección del virus, en ensayos *in vitro* (Arias, *et al* 1986, 1987).

Los resultados anteriores son estimulantes para continuar el estudio de estas proteínas y las posibilidades de utilizarlas para inducir protección contra infecciones por rotavirus. Una posibilidad es el uso de bacterias entéricas invasivas atenuadas, que con anterioridad se han caracterizado como vacunas, como acarreadores de antígenos virales al sistema inmune intestinal, que es necesario estimular para la protección en contra de las infecciones de rotavirus.

EXPRESION DE VP7-BGAL EN *Salmonella typhimurium* ATENUADA.

CLASIFICACION DE *Salmonella*.

El género *Salmonella* se clasifica dentro de la familia Enterobacteriaceae, la cual es un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. Los miembros de esta familia se caracterizan por ser bacilos facultativos, gram negativos que no fermentan lactosa (Kelly, *et al* 1985).

La mayoría de las vacunas generadas en contra de infecciones entéricas bacterianas, han sido desarrolladas empíricamente, y por lo general son de baja eficacia y/o con efectos colaterales. En los últimos años se han

generado bacterias entéricas atenuadas, con mutaciones genéticamente definidas y sin tendencia a revertir al genotipo silvestre patógeno. Estas bacterias han mostrado cualidades importantes como vacunas contra infecciones bacterianas intestinales. Del genero *Salmonella* se han generado y caracterizado cepas atenuadas utilizadas como vacunas vivas en pruebas de laboratorio en ratones y humanos, y en pruebas masivas de campo, las cuales han dado buenos resultados, con escasos o nulos efectos colaterales. Incluso, estas cepas se han comenzado a utilizar como acarreadores de antígenos heterólogos para la obtención de vacunas multivalentes (Dougan, *et al* 1987, Black, *et al* 1987).

Para comprender el valor potencial de *Salmonella* como acarreador de antígenos heterólogos al sistema inmune, es necesario revisar la patogenia de *Salmonella*.

PATOGENIA DE SALMONELLA.

Varias especies del genero *Salmonella* infectan a los humanos, y pueden provocar desde gastroenteritis poco severas, como es el caso de infecciones por *S. typhimurium* (Dougan, *et al* 1987, Calva, *et al* 1988), hasta gastroenteritis severas con bacteremia, provocada por diferentes especies invasivas como *S. choleraesuis*, *S. paratyphi* A y *S. typhi* (Dougan, *et al* 1987, Kelly, *et al* 1985). La patogenia en la fiebre tifoidea es poco conocida, pero se ha logrado reconstruir parcialmente al utilizar a *S. typhimurium* y *S. enteritidis* como modelo de infección en diferentes animales (Collins 1971, 1974). *Salmonella* entra al hospedero generalmente por la via oral, las dosis infectivas son de 10^7 a 10^{10} , (Drasar y Barrow

1985) (Tabla 3). Algunas bacterias mueren en el tracto digestivo debido a la acidez gástrica (García M. de L. 1985) y las restantes se activan en un fenotipo invasivo por la acción de diferentes enzimas proteolíticas (Hale y Formal 1988). Las salmonelas se adhieren a las células del epitelio intestinal a nivel del *ileon* distal y *cecum* (Carter y Collins 1974). La adhesión consta de 2 fases (Finlay, *et al* 1989): una de pegado reversible, en la cual la *Salmonella* se adhiere a la mucosa por medio de receptores específicos (Arp 1988) y/o por medio de *pilli* (Korhonen, *et al* 1981); en esta fase la *Salmonella* puede ser removida del epitelio intestinal por medio de lavados (Finlay, *et al* 1989). En la segunda fase, o fase irreversible, las salmonelas no se pueden desprender por medio de lavados; esta fase aparentemente es mediada por glucoproteínas sintetizadas *de novo* durante la fase reversible, e inducidas por la adhesión al epitelio (Finlay, *et al* 1989).

Organismo	Dosis infecciosa
<i>Escherichia coli</i>	10' a 10'
<i>Salmonella</i> sp	10' a 10'
<i>Shigella</i> sp	10 a 200
<i>Vibrio cholerae</i>	10'
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10' a 10'

Tabla 3.- Tabla comparativa de dosis infecciosas en humanos de diferentes agentes infecciosos intestinales (Tomado de Drasar y Barrow 1985).

La *Salmonella* se adhiere preferentemente a las células M, las cuales se caracterizan por ser planas, de estructura membranosa y con numerosas vesículas pinocíticas (Sneller y Strober 1986). Las células M presentan en su cara anti-luminal numerosas proyecciones de la membrana celular, que se indentan con

linfocitos y macrófagos subyacentes (Sneller y Strober 1986), asociados a Placas de Peyer (Calva, *et al* 1988). La traslocación de *Salmonella* del lumen intestinal a las Placas de Peyer, es mediada por vesículas pinocíticas de las células M, en las cuales no sufren degradación alguna (Sneller y Strober 1986, Hale y Formal 1988) y en donde pueden tener cierto número de duplicaciones (Arp 1988). Estudios *in vitro*, en monocapas de células MDCK, indican que el proceso dura cuatro horas, desde la adherencia de tipo reversible hasta el comienzo de la invasión-translocación (Finlay *et al* 1989). Recientemente se han descrito otras proteínas que participan en la invasividad en *S. typhi* y *S. typhimurium* (Elsinghorst, *et al* 1989, Galán y Curtis III 1989).

Las salmonelas son liberadas en la cara anti-luminal de las células M, debido a la destrucción de la membrana celular o bien por exocitosis de la vacuola que las contiene (Arp 1988); algunas son rápidamente ingeridas por macrófagos en las Placas de Peyer (Wells, *et al* 1988, Finlay, *et al* 1989), y otras penetran hasta los nódulos linfáticos mesentéricos, y de ahí drenan al ducto torácico (Levine, *et al* 1983) a través del cual llegan a la circulación sanguínea, lo que origina una bacteremia temprana (Maskell, *et al* 1986). Así se diseminan a todo el sistema retículo-endotelial, principalmente a tejidos con gran densidad de fagocitos, como lo son el hígado, bazo y médula ósea (Levine, *et al* 1983), en los que presentan un crecimiento exponencial (Dougan, *et al* 1987a). El paso de Placas de Peyer al resto del sistema retículo endotelial parece estar asociado principalmente a un plásmido de alto peso molecular (Ceulig y Curtis III 1987).

***Salmonella* ATENUADA COMO VACUNA.**

Desde 1896 existen vacunas contra *Salmonella*, basadas en bacterias muertas (Levine, *et al* 1989). A pesar de que algunas de estas vacunas confieren niveles altos de protección contra infecciones de *Salmonella*, estas presentan efectos adversos, como fiebre, malestar generalizado, y reacciones locales severas en el porcentajes altos (del 25 al 50%) de los pacientes inmunizados (Levine, *et al* 1983, Bodhidatta, *et al* 1987).

Una alternativa a las vacunas de bacterias inactivadas completas, es el uso de bacterias atenuadas por vía oral, que retienen la capacidad de invadir el sistema reticuloendotelial, pero que presentan crecimiento y persistencia limitado.

La obtención de cepas de *Salmonella* avirulentas, ha propiciado el desarrollo de mutantes para su uso como vacunas, con diversas estrategias de atenuación (Tabla 4).

Salmonella	Gen deletado	Generado por	Efecto.
<i>S. typhi</i> <i>S. typhimurium</i>	<i>galE'</i>	NG	Deficiencia en LPS En presencia de galactosa hay lisis celular por acumulación intracelular de galactosa-1-fosfato y UDP-galactosa.
<i>S. typhi</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. dublin</i>	<i>aroA'</i>	Tn::10	Deficiencia en la biosíntesis de pABA, compuesto ausente en tejidos de mamíferos. pABA es un precursor del folato.
<i>S. typhi</i>	<i>aroA, purA"</i>	Tn::10	Deficiencias de <i>aroA</i> y en biosíntesis de adenina.
<i>S. typhi</i>	<i>cya, crp'</i>	Tn::10	Deficiencia en receptor de AMPc y amilato ciclasa. Afecta transporte, anabolismo y síntesis de proteínas de membrana.

Tabla 4.- Estrategias de atenuación en *Salmonella*. Tn::10 transposón. NG nitrosoguanidina. LPS, Lipopolisacárido. pABA, Acido aminobenzoico. (1)Germainer y Ftrer 1975, (2)Levine, *et al* 1983,(3)Hoiseth y Stocker 1981, (4 y 5) Levine, *et al* 1987 y 1989, (6)CurtisIII y Kelly 1987.

Las mutantes *aroA* en *S. typhimurium* (Una de las cuales es usada en el presente trabajo) fueron generadas por mutagéneis con Tn::10 *aroA554*. Las bacterias con esta atenuación son incapaces de sintetizar moléculas de la ruta de biosíntesis de compuestos aromaticos (Figura 3), tales como el ácido paraaminobenzoico (pABA), el ácido dihidroxibenzoico (DHB), ubiquinona, menaquinona y diversos aminoácidos. El pABA es un metabolito virtualmente

ausente en los tejidos de mamíferos, y es un precursor obligado en la biosíntesis de folato en *Salmonella*; debido a la incapacidad del género *Salmonella* de asimilar folato exógeno, la delección en la biosíntesis de pABA resulta en mutantes atenuados (Hoiseth y Stocker 1981).

SALMONELLA ATENUADA COMO ACARREADOR DE ANTIGENOS HETEROLOGOS

La idea de usar *Salmonella* avirulenta como acarreador de antígenos heterólogos, se basa en 4 consideraciones:

En primer lugar, la posibilidad de generar bacterias entéricas atenuadas por medio de mutagénesis, con frecuencias de reversión muy bajas y sin deteriorar su capacidad inmunogénica (Germainer y Furer 1975, Hoiseth y Stocker 1981, Curtis III y Kelly 1987)

En segundo lugar, el descubrimiento de que *Salmonella*, a diferencia de otros patógenos entéricos, es capaz de invadir el sistema retículo endotelial asociado al sistema digestivo (SREASD) y a otros órganos, y a su capacidad de persistir, reproducirse e inducir protección de larga duración contra cepas silvestres, tanto en modelos animales (Hoiseth y Stocker 1981) como en humanos.

En tercer lugar, la presentación de antígenos al SREASD genera una respuesta inmune de mucosas generalizada, es decir, se secretan anticuerpos en otras mucosas como la pulmonar, el tracto urinario y vagina; además se observa la presencia de IgA contra el antígeno en secreciones tales como lagrimas, saliva, leche y calostro (Curtis III, et al. 1988, Bergman y Waldman 1988).

Finalmente, la clonación en *E. coli* de factores de virulencia y de colonización

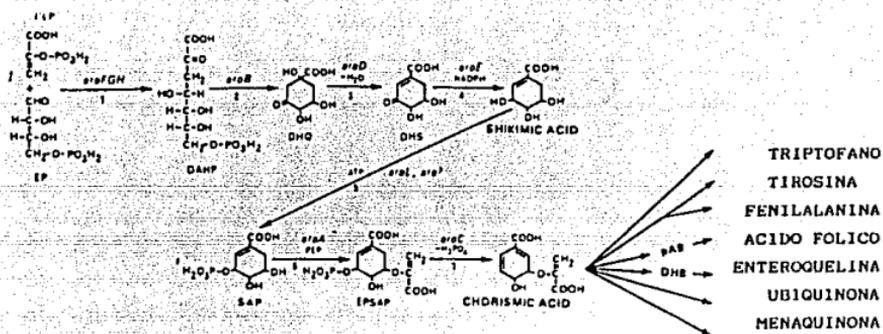


Figura 3.-Biosíntesis de compuestos aromáticos en *S. typhimurium*.

de otros patógenos, capaces de generar inmunidad protectora, permiten la construcción de derivados de *Salmonella* que expresen estos antígenos.

En la Tabla 5, se muestran los antígenos que han sido clonados en diferentes salmonelas.

La expresión de los diferentes antígenos en *Salmonella* no afecta las propiedades de estas cepas como vacunas contra la fiebre tifoidea (Dougan, et al. 1987). Además, cuando se inoculan en ratones cepas de *Salmonella* vivas, acarreadoras de antígenos heterólogos, estas inducen una respuesta inmune humoral y/o secretoria, contra el antígeno heterólogo. La respuesta celular por lo general no ha sido reportada; sin embargo en el caso del circunsporozoito de *P. berghei*, esta fue el único tipo de respuesta observada (Sadoff, et al 1988a). Para antígenos de hepatitis y de *S. mansoni*, no se observó una respuesta inmune de tipo humoral o secretoria (Scchodel, et al 1988), sin embargo en estos

estudios no se reporta si fue medida la respuesta de tipo celular.

Ag	Salmonella	Via	Respuesta	Protec.	Ref. Ag. Het
K88(<i>E.coli</i>)	I-A y G	iv. y o.	H. y S.	nr.	1,2,3
LT-B(<i>E.coli</i>)	I-A, II-G, III-A	o., ip.	H. y S.	nr.	1,4,5
M(<i>S.equii</i>)	I-C	nr.	nr.	nr.	6
SpaA(<i>S.sobrinus</i>)	I-C	nr.	nr.	nr.	7
Fl(<i>S.sonnei</i>)	II-G	ip.	H.	si	8
CS(<i>P.berghoi</i>)	I-M,	sc. y o.	C., no H ni S.	si	9
M(<i>S.pyogenes</i>)	I-A	o.	H. y S.	si	10
Hepatitis	I-A, III-A	o. e im.	sr. y H.	nr.	11,12
β -Gal	I-A	iv.	H. y C.	nr.	13
<i>S.mansoni</i>	II-A, II-G		sr.	nr.	14
CT-B	III-A	ip.	H.	nr.	15

Tabla 5.-Antígenos clonados en diferentes especies de *Salmonella*. *S.thyphimurium* (I), *S.typhi* (II), *S.dublin* (III). *aroA* (A), *galE* (G), *cya crp* (C), sensible a macrólago (M). Via de administración intravenosa (iv), oral (o), intraperitoneal (ip), intramuscular (im) y subcutánea (sc). Respuesta inmune humoral (H), secretoria (S), celular (C), sin respuesta (sr), no reportada (nr). Protección dada por antígeno heterólogo clonado (Protec Ag Het). * Gene integrado en genoma. ** Genes clonados como producto de fusión con flagelina, se exportan extracelularmente. (1)Maskell, et al 1986.(2)Stevenson y Manning 1985. (3) Hone et al 1988 (4)Clements y El-Morshidy 1984. (5) Clements 1988. (6) Curtis III, et al 1988a. (7) Curtis III, et al 1988b. (8) Formal et al 1981. (9) Sadoff, et al 1988a, 1988b. (10) Porier et al manuscrito no publicado.(11) Schodel et al 1988. (12) Wu et al 1989. (13) Brown et al 1987. (14) Taylor et al 1986. (15) Newton et al 1989.

Es importante recalcar que incluso las proteínas de localización estrictamente intracelular como la β -galactosidasa, expresadas en *Salmonella*, son capaces de estimular respuesta inmune de tipo humoral, secretoria y celular (Brown, et al 1987).

SINTESIS DE LA GLICOPROTEINA DE SUPERFICIE DEL ROTAVIRUS

SA11 EN *Salmonella typhimurium* SL3261.

Los resultados reportados en el laboratorio al caracterizar las propiedades

inmunogenicas de VP7- β gal (Arias, *et al* 1986), y los antecedentes de *Salmonella typhimurium aroA* como acarreador de antígenos heterólogos, sirvieron de base para la realización del presente trabajo, en el que se describe la clonación de la glucoproteína de superficie del rotavirus de simio SA11, en la *Salmonella typhimurium* atenuada *aroA* SL3261, y caracterización inmunológica.

La inestabilidad de algunos plásmidos en *Salmonella* puede ser un serio problema para la clonación de antígenos heterólogos (Watanabe y Ogata 1970, Nakayama, *et al* 1988, Kaper 1988). Se sabe que para algunos plasmidos en *Salmonella* se incrementa su inestabilidad mientras mayor es el número de plásmidos por célula (Stougaard, *et al* 1979); así como cuando las bacterias tienen una alta tasa de crecimiento (Curtis III. *et al* 1988); si el control de la expresión del antígeno esta bajo un promotor fuerte (Dougan, *et al* 1987); o si presenta el antígeno un efecto negativo para el metabolismo de la bacteria (Mungía 1987).

El plásmido pUMA93Z es un plásmido tipo ColE1 (Arias, *et al* 1986) derivado de pUC8, el cual se encuentra en un alto número de copias por célula.

La duplicación en plásmidos tipo ColE1 esta regulada por la interacción de dos transcritos; el primero o ARN II y un contratranscrito o ARN I, y por una proteína de 63 aminoácidos llamada *rop* (Cesareni, *et al* 1982).

La formación de un primero de ARN(ARN II), por la ARN polimerasa del hospedero, y su procesamiento por la ARNsa H, marcan el inicio de la replicación (Willets 1985). Sin embargo, la síntesis de un contratranscrito (ARN I) inhibe la "maduración" del ARN II (por la acción de la ARNsa H) para formar un extremo 3' funcional, para que la ADN polimerasa continúe con la duplicación

(Wang y Polinsky 1985) (Figura 4). Los plásmidos ColE1 expresan adicionalmente una proteína de 63aa, *rop*, la cual incrementa las probabilidades de interacción entre el ARN I y el II, disminuyendo así el número de duplicaciones del plásmido y, por lo tanto, el número de copias (Tomizawa y Som 1984).

Para evaluar el efecto del número de copias en la estabilidad del vector de expresión de VP7-βgal, a partir del plásmido pBR435 (proporcionado por M.A. Munguía) se obtuvo el gen de *rop* y se clonó en pUMA93Z (Plebañsky 1988, resultados sin publicar). En la Figura 5 se describe la estrategia de clonación de *rop*.

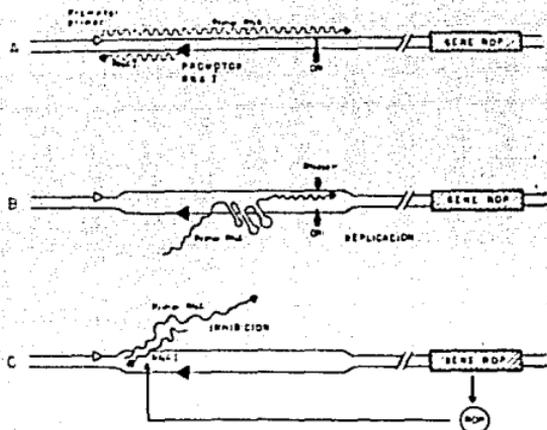


Figura 4.- Mecanismo de replicación de plásmidos tipo ColE1. A) La replicación es controlada principalmente por 3 elementos genéticos: El ARN primero, ARN II y el producto del gen *rop*. La molécula precursora del ARN primero, forma un híbrido con el ADN que lo codifica, así es procesado por la ARNasa H formando un primero maduro para la ADN polimerasa. C) La inhibición por ARN I esta mediada por la interacción con el ARN primero complementario, interacción que es aumentada por la proteína *rop*.

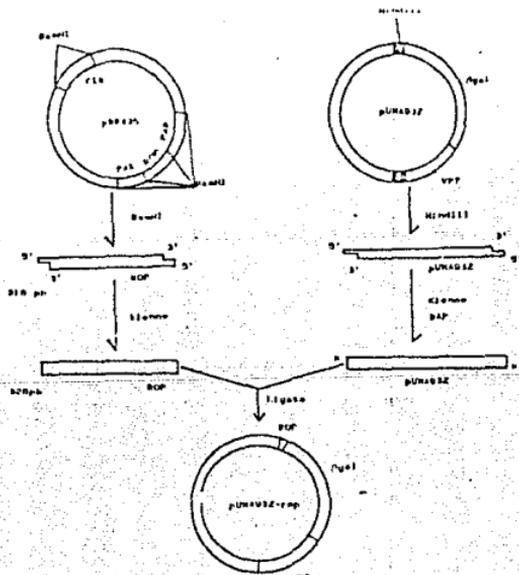


Figura 6.- Estrategia de clonación de *rop* en *pUMA93Z*

OBJETIVOS.

El objetivo general del presente trabajo es obtener la síntesis de la proteína híbrida VP7-βgalactosidasa en la cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* SL3261, y evaluar la capacidad de la bacteria recombinante para inducir anticuerpos contra la proteína viral. A partir de este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos particulares:

1. Expresar en *Salmonella typhimurium* SL3261 la proteína híbrida VP7-βgal.

2. Cuantificar *in vitro*, en SL3261 la estabilidad de los diferentes vectores construidos.

3. Determinar en las bacterias recombinantes, las diferencias en la producción de la proteína híbrida dirigida por los diferentes vectores de expresión.

4. Montar el método para determinar la persistencia de la bacteria SL3261 sola, así como de las bacterias recombinantes, en hígado y bazo de los ratones inmunizados.

5. Determinar la presencia de los plásmidos en las *Salmonella* recombinantes recuperadas de los ratones inoculados, para evaluar su estabilidad *in vivo*.

6. Cuantificar la producción de anticuerpos totales contra el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium*, contra la β-galactosidasa y contra la proteína VP7 del rotavirus SA11, en ratones inoculados con las bacterias recombinantes.

7. Determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el rotavirus SA11 en el suero de ratones inmunizados con las bacterias recombinantes.

8. Determinar si las bacterias recombinantes son capaces de sensibilizar el sistema inmune de ratones para una respuesta de anticuerpos neutralizantes, ante un contacto posterior con el virus completo.

MATERIALES Y METODOS.

VIRUS, BACTERIAS Y LINEAS CELULARES EUCARIONTES.

Se utilizó *Escherichia coli* MC1061, donada por el Dr. Bastarrachea, en el manejo primario de plásmidos y amplificación de estos para después ser tranfectados a *Salmonella*.

Salmonella typhimurium cepa SL3261, *hisG46 DEL407[aroA554::Tn10 (Tc-sens, nonrev)] Fus-res* (Smith *et al* 1984), derivada de la cepa SL1344 (Hoiseh and Stocker 1981). *Salmonella typhimurium* SL5283, *trpC2 metA22 H1-b H2-e,n,x nml (Fels2) fla-66 rpsL120 xyl-404 metE551 hsdL6 hsdSA29 hsdSB121 ilv-452 leu-3121 galE503* (Sanderson y Stocker 1987), y *rm^r* para los 3 sistemas de restricción-modificación. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 como control de bacteria protótrofa.

Se utilizó el fago P22, que es un fago de transducción generalizada para transducir plásmidos de la cepa SL5283 a la 3261. El Rotavirus de simio SA11, se usó en ensayos de ELISA, de inhibición de la hemaglutinación y de neutralización. Células eucariontes MA104 derivadas de riñón de mono rhesus, fueron utilizadas para los ensayos de neutralización de SA11 por reducción de placas.

MEDIOS DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS.

Las diferentes cepas bacterianas fueron crecidas en medio LB líquido o sólido para ensayos de estabilidad (Maniatis, *et al* 1985). Cada 30 minutos se añadió a los medios ampicilina 200 µg/ml para cultivos en medio líquido, y una sola vez para cultivos en medio sólido, como presión de selección de bacterias con plásmidos.

El medio M9 (Maniatis *et al* 1982) fue utilizado como control para cepas bacterianas con las diferentes auxotrofías. M9 complementado con de PABA (ácido p-amino benzoico)(50mg por caja petri con medio), DHB (ácido 2,3-dihidroxi benzoico) (50mg por caja petri de medio) y aminoácidos (fenilalanina 0.3 mM, tirosina 0.1 mM, triptofano 0.1 mM, treonina 0.3 mM, prolina 2 mM) para mutantes con bloqueos en la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos e histidina (0.1 mM) (Stocker, comunicacion personal y Davis, *et al* 1980), como medio mínimo para la identificación de la cepa *aroA hisG* SL3261.

PLASMIDOS.

El plásmido pUC8 es un vector de 2.8 kb con marcador de resistencia a ampicilina, derivado del pBR322, el cual contiene sitios de clonación múltiples, para la expresión de proteínas bajo el promotor *lac Z*, con los primeros 6 aminoácidos de β-galactosidasa (Vieira y Messing, 1982).

El pUMA93Z (Arias *et al* 1986) dirige la síntesis de la proteína híbrida VP7-βgal a partir del promotor *LacZ*. Este plásmido es derivado del vector pUC8, del pUMA931, del cual se deriva la secuencia de VP7, y de pMC-

1871, del cual se obtuvo el gen de β -galactosidasa (Arias *et al* 1986). El gen de β -lactamasa y el origen de duplicación son derivados de pUC8.

El pUMA93Z-ROP es un derivado de pUMA93Z en el cual se inserto el gen de *rop* (320 pb), en el sitio único Hind III del sitio de clonación múltiple o "polilinker" original del pUC8. El gen *rop* fue amablemente proporcionado por M. E. Munguía. Esta construcción la realizó Magda Plebański (1988, resultados sin publicar).

MANIPULACION DE ADN.

EXTRACCION DE PLASMIDOS.

Minipreparaciones por lisis alcalina. Para extracciones de *Salmonella*. (para *E. coli* se prescindia del paso de proteinasa K). Tomado y modificado de Silhary, *et al* 1984 y Kraft, *et al* 1988.

1. Matraces con 15 ml de LB líquido se inoculan con la cepa correspondiente, a partir de colonias aisladas de cajas petri con LB sólido, con ampicilina 100 mg/ml.

2. Del cultivo se transfieren 1.5 ml a tubos eppendorf de 1.5 ml (Brinkmann, Westbury, NY), se centrifugan 2 minutos en centrífuga Eppendorf (Brinkmann modelo 5414) a 14,000 rpm y el sobrenadante se remueve y se repite nuevamente este paso.

3. El botón de bacterias se resuspende en 100 ml de solución de lisozima (lisozima 5 mg/ml, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH8.0) se agita con vortex y se deja 5 minutos en hielo.

4. Se añaden 200 μ l de solución NaOH-SDS (NaOH 0.2 N, SDS 1%). Se mezcla por inversión de los tubos y se incuba en hielo 5 minutos.

5. Se añaden 150 μ l de solución de acetato de potasio (el stock se prepara 60 ml de acetato de potasio 5M, 28.5 ml de ácido acético, 11.5 ml agua, ph 4.8) y se mezcla suavemente con vortex.

6. Los tubos se dejan en un baño de hielo seco-etanol durante 5 minutos y se descongelan a temperatura ambiente.

7. Después de centrifugar a 4°C durante 15 minutos en centrífuga eppendorf, a 14,000 rpm, el sobrenadante (750 ml aproximadamente) se transfiere a tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos.

8. Al sobrenadante se le añaden 25 μ l de solución de proteinasa K (de un stock de 10 mg/ml) y 75 μ l de solución de EDTA (0.5 M, pH 9.0). Se incuba durante 3 horas a 50° C.

9. Se añade un volumen igual de fenol-cloroformo, se mezcla con vortex y se centrifuga a 14,000 rpm en centrífuga eppendorf durante 2 minutos. Se transfiere la fase acuosa superior a un tubo de 1.5 ml nuevo.

10. Se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcla por inversión y se deja a -70°C de 10 a 30 minutos.

11. Las muestras se centrifugan 5 minutos a 14,000 rpm y se tira el sobrenadante.

12. El botón se lava en etanol al 70% frío y se tira nuevamente el sobrenadante.

13. Las muestras se secan al vacío, se resuspenden en agua bidestilada y se guardan a -20°C para su uso posterior.

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y CONDICIONES DE REACCIÓN.

Para el análisis de plásmidos por patrones de restricción se realizó el protocolo siguiente (endonucleasas de New England Bio Labs, Beverly, Massachusetts):

Se digirió 1 ml (0.3 mg/ml) de muestra de los plásmidos pUMA93Z o pUMA93Z-ROP con 1 ml de Bgl I (5u) , 1ml de pstI (10u). 2ml de buffer de alta sal 10X (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.5, MgCl₂ 100 mM ,DTT 10 mM) y 15ml de agua bidestilada estéril, en un volumen final de 20ml. La mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 1.5 horas y posteriormente a 65°C por 3 horas.

Se mezcló 1ml (0.5mg)de pBR435 con 1ml de BamHI (10u), 1ml de buffer de alta sal (10X) y 7ml de agua bidestilada. Se incubó a 37°C durante hora y media.

Se mezcló 1ml de pBR322 (1mg) se mezcló con 1ml de HinfI (8u), 1 ml de buffer media sal 10 X (NaCl 50 mM,Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100mM, DTT 10 mM) y 7ml de agua bidestilada y se incubó a 37°C por 3 horas.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Para el análisis de los plásmidos , así como para digestiones de estos con enzimas de restricción, se utilizaron minigeles de agarosa (Sea Kem FMC Corp. Rockland, MD, USA) al 0.8% (P/V) en buffer E 1X (0.04M NaAc, 0.002M EDTA, 0.04M Tris pH7.4 , en agua bidestilada). Un volumen de muestra de plásmido se mezcla con uno de buffer de corrida para ADN (glicerina 10%, azul de bromofenol 0.01%, naranja G0.01%, en amortiguador E 1X) y se corren los geles en amortiguador E 1X a 100 volts, hasta que el colorante azul de bromofenol llegue al borde opuesto del gel. El ADN se tiñó con bromuro de etidio (1mg/ml)(ver mas abajo) y se observaron las muestras con luz UV.

ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.

Otro tipo de geles que se utilizó para el análisis de los patrones de restricción de plásmidos, fueron los geles de poliacrilamida. Se mezclaron con 7 ml de agua destilada con 1ml de buffer TBE (10X), 1.66 ml de solución acrilamida-bisacrilamida (30%:0.8% P/V), y se le añadieron 90ml de persulfato de amonio al 10% (BIO-RAD Richmond, California, USA) y 3.8ml de TEMED (BIO-RAD), se vertió la mezcla en los vidrios para que se formara el gel. Se pusieron las muestras en amortiguador de corrida y se aplicó una corriente de 100 volts hasta que el colorante azul de bromofenol saliera del gel. EL ADN se tiñó con bromuro de etidio o por la tecnica de plata (Ver abajo).

TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO.

Para analizar el ADN, los geles de agarosa o de poliacrilamida, se sumergen en una solución de bromuro de etidio (0.5mg/ml) (SIGMA) de 15 a 30 minutos, y se lavan en agua destilada para quitar el exceso de colorante. EL ADN se observa con luz UV y se fotografía en una cámara Polaroid con filtro anaranjado Kodak (Wratten # 23A), en placas Kodak pancromático. (Ausubel et al 1988).

TINCION CON PLATA.

Sólo los geles de acrilamida se tiñeron con la técnica de plata.

1. Los geles se ponen en solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 0.5%) de 20 a 30 minutos.
2. Se transfieren a la solución de plata (0.18% p/v de nitrato de plata en agua bidestilada) de 20 a 30 minutos.
3. Se lavan 2 veces en agua bidestilada.
4. Se pone el gel en solución reveladora (7.5 ml de NaOH 10M, 0.8 ml de formaldehído, se afora a 1 litro con agua bidestilada) hasta que se vean claramente las bandas correspondientes a ADN.
5. Se lavan en agua bidestilada 2 veces.
6. Se da un lavado en ácido acético al 3% (p/v) y se guarda el gel en agua bidestilada.

TRANSFECCION BACTERIANA.

- 1) La cepa que se quiere transfectar se crece durante 12 horas en 2ml de LB a 37°C.
- 2) Con los 2ml crecidos se inoculan 30 ml de LB.
- 3) Se deja que crezcan a 37°C con agitación, hasta una DO_{550nm} entre 0.4 y 0.6. El crecimiento se detiene al poner el matraz en hielo.
- 4) Se pasa lo crecido a un tubo estéril de 50ml, para centrifuga.
- 5) Se centrifuga 8 minutos a 3,000rpm en una centrifuga Beckman de mesa TJ-6. Se tira el sobrenadante.
- 6) El botón bacteriano se resuspende con cuidado en 15 ml de $CaCl_2$ 0.1mM/Tris 10mM pH 7.5 en frío.
- 7) Se incuba 10 a 15 minutos en hielo.
- 8) Se repite el paso 5.
- 9) Se resuspende el botón en 2 ml de $CaCl_2$ 0.1 mM/Tris 10 mM pH7.5. Se deja 30 minutos en hielo.
- 10) Se pasan 200 μ l a tubos eppendorf de 1.5 ml y se les añade la cantidad deseada de plásmido (300 ng) a cada tubo. Se deja 30 minutos en hielo.
- 11) Se da un choque térmico a 42°C por un minuto e inmediatamente se pone en hielo por 1 minuto.
- 12) Se añaden 800ml de LB a temperatura ambiente a cada tubo.
- 13) Se incuban los tubos a 37°C, en agitación, durante 45 a 90 minutos.
- 14) Se plaquean varias diluciones de las células transformadas en cajas de LB sólido con ampicilina 100 μ g/ml.
- 15) Se incuban las cajas toda la noche a 37°C y se observan las colonias

recuperadas.

OBTENCION DE FAGO TRANSDUCTANTE P22

1) Las células SL5283 que contienen el plásmido de interés, se crecen toda la noche a 37°C, en LB complementado con 0.1% de glucosa, 0.1% de galactosa y con el antibiótico adecuado.

2) A 30 ml del crecimiento anterior se le añaden 100 µl de lisado, que contiene aproximadamente 10⁴ fagos P22.

3) Se incuba de 14 a 18 horas con agitación a 37°C.

4) Se centrifuga en tubos de 50 ml, a 5,000 rpm, durante 5 minutos en un rotor JA20 de la centrifuga Beckman.

5) Se recupera el sobrenadante en tubos de vidrio estériles y se añade cloroformo a una concentración final aproximada del 10%, se mezcla.

6) Se deja durante 12 horas a temperatura ambiente, se mezcla cada hora.

7) Se toma el sobrenadante y se pasa a tubos estériles. Este sobrenadante contiene el fago transductante.

8) Se guarda a 4°C.

TRANSDUCCION DE LA CEPA SL3261.

1) Se crece toda la noche la cepa SL3261 en 2 ml de LB, a 37°C con agitación.

2) Se añade 100 µl del crecimiento a 2ml de LB/CaCl₂ 1mM, Tris 0.1 mM pH7.5 y se crece hasta una DO_{550nm} de 0.4 a 0.6.

3) Se vierte el crecimiento sobre cajas con antibiótico, hasta que cubra toda la superficie, tirar el exceso de líquido.

4) Se deja secar la caja junto a un mechero.

5) Se hacen diluciones del fago transductante (1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000) en LB/CaCl₂ 1 mM, Tris 0.1 mM pH7.5.

6) Se ponen 20 µl de cada dilución sobre el césped de bacterias (que todavía no se observa).

7) Se dejan secar a temperatura ambiente las cajas cerradas.

8) Se incuban a 37°C toda la noche.

9) Las transductantes obtenidas se estrían sobre medio LB sólido con 100mg de ampicilina/ml.

Como control se hacen diluciones del fago sobre cajas sin césped bacteriano, para verificar que el lisado de fagos no está contaminado con bacterias.

EXPRESION DE VP7-βGAL EN S typhimurium.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Para el análisis electroforético de las proteínas producidas por las diferentes cepas bacterianas, se utilizó la técnica de Laemmli (1970):

	Gel inferior	superior
Acrilamida-Bisacrilamida (30%-0.8%)	11ml.	2ml.
Tris base 2M pH 8.8	6ml.	0
Tris base 2M pH 6.8	0	0.65ml.
SDS 10%	0.3ml.	0.1ml.
Agua	12ml.	12ml.
Persulfato de amonio al 10%	90µl.	150µl.
TEMED	30µl.	10µl.

Las muestras de proteínas se mezclan en "Magic Mix" (SDS 1%, β-mercaptoetanol 1%, EDTA 0.074%, glicerol 10%, tris-HCl 0.05M pH6.8 y granitos de azul de bromofenol) se hierven 3 minutos, y se centrifugan 3 minutos en eppendorf a 14,000 rpm, para quitar el material insoluble.

Se corre el gel con buffer tris-glicina 1X (Tris-base 12 g, glicina 57.6 g aforar a 1 litro), al cual se le añaden 8 ml de SDS al 10%.

La muestra en el gel superior se corre a 10 mA, al llegar el azul de bromofenol al límite entre el gel superior y el inferior se corre a 20 mA, hasta que el azul de bromofenol llega al extremo opuesto del gel.

TINCION CON COOMASSIE.

Solución de coomassie:	Metanol	3 volúmenes.
	Acido acético	1 volumen.
	Agua	6 volúmenes
	Coomassie	0.06%.

Antes de usar la solución de coomassie es recomendable filtrarla.

Se deja el gel en la solución tñidora de coomassie toda la noche, se destiñe en ácido acético al 10%.

DENSITOMETRIA DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Los geles tñidos por la técnica de coomassie, se fotografiaron y se imprimieron en acetatos. La densitometría se realizó en un densitómetro laser de barrido, Zeineh modelo SLR-2D/1D, que pasa el haz de luz uv sobre el carril, y abarca todo el grosor de éste, de proteínas del cual se desea conocer su perfil. Los calculos son realizados automaticamente por el densitómetro.

ACTIVIDAD DE β-GALACTOSIDASA.

Tomado y modificado de Miller 1972.

1) A 500 µl de crecimientos bacterianos se le añaden 50 µl de cloroformo y 25 µl de SDS al 0.1%. Se mezcla.

2) A 900 ml de amortiguador Z (Na_2HPO_4 0.06 M, NaH_2PO_4 0.04 M, KCl 0.01 M, MgSO_4 0.001 M, β -mercaptoetanol 0.05 M, pH 7) se le añaden 100ml de las bacterias tratadas con cloroformo.

3) Los tubos se ponen en un baño a 28°C y se deja que se calienten durante 5 minutos.

4) Se añaden 200 ml de ONPG (ortonitrofenil- β -D-galactosido) (4 mg/ml).

5) Se incuban hasta que se observe que los tubos se tornan amarillos, sin dejar que sea demasiado.

6) Se para la reacción con 500ml de Na_2CO_3 1M.

7) Se lee a 420 nm, en el espectrofotómetro.

Para el cálculo de número de unidades de β -galactosidasa (n) se utilizó la siguiente formula:

$$n = \frac{\text{OD}_{420\text{nm}}}{\text{Tiempo de reacción x volumen} \times 0.0045 \times \text{DO}_{550\text{nm}}}$$

en minutos en ml

n= nmoles de ONPG hidrolizados/minuto ml de lisado.

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE PLASMIDOS EN *S. typhimurium*, EN AUSENCIA DE PRESION DE SELECCION.

1) Se crecen las cepas en LB líquido, añadiendo 200 mg/ml de ampicilina cada 30 minutos, hasta alcanzar una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ de 1.25. Las bacterias así crecidas se plaquean por duplicado en LB sólido con o sin ampicilina (200mg/ml), para cuantificar el porcentaje de bacterias resistentes al antibiótico.

2) Se inoculan 50 ml de LB líquido, sin ampicilina, con 50 ml de una dilución 1/1000 del cultivo de bacterias.

3) Se crece a 37°C con agitación constante, hasta tener unas 20 generaciones aproximadamente. Se repite el paso 2 y las bacterias se crecen otras 20 generaciones aproximadamente.

4) El porcentaje de bacterias que todavía conservan el plásmido se determinó a las 20 y 40 generaciones, plaqueando por duplicado en cajas de LB con y sin ampicilina.

INMUNOLOGIA.

ANIMALES.

Se utilizaron ratones BALB/c de uno u otro sexo, de 9 a 12 semanas de edad en los experimentos de infectividad e inmunología. Los ratones fueron mantenidos en cuarentena, en el cuarto donde se ubicaron definitivamente, al menos durante una semana anterior a ser utilizados para los experimentos. Agua y alimento fueron proporcionados *ad libitum*.

CRECIMIENTOS DE INOCULOS.

La cepa SL3261 sola o con plásmido, se creció en LB o en LB con ampicilina (suplementada con 200mg/ml cada 30 minutos), respectivamente. Las bacterias se titularon plaqueando duplicados en LB y en LB con ampicilina 200 mg/ml.

Las células se centrifugaron a 14,000 rpm en centrifuga eppendorf durante 3 minutos a temperatura ambiente. El botón bacteriano se guardó en refrigeración a 4°C para esperar la titulación de los crecimientos y así calcular las diluciones a inocular, así como para verificar que el 100% de las bacterias llevaran los plásmidos.

INOCULACION DE LOS ANIMALES.

El botón de bacterias fue resuspendido en amortiguador de fosfatos (PBS) para ser inoculado por vía intravenosa, o bien en BSG (PBS + 0.1% de gelatina bacteriológica) para inoculaciones orales.

La inoculación intravenosa fue en la vena de la cola. El inóculo fue en un volumen total de 100 µl por ratón inoculado. En la inoculación por vía oral, los ratones fueron privados de agua y comida durante 6 horas, después de las cuales se les administró 30 µl de bicarbonato de sodio al 10%. Cinco minutos después se dio el inóculo de salmonelas en un volumen total de 20 µl. Se regresó la comida y el agua 30 minutos después del inóculo. Después de 5 semanas del inóculo inicial con salmonelas se dio un refuerzo, con la misma cantidad aproximada del inóculo inicial. A las siete semanas, en el experimento que denominamos # 7, fueron inoculados por vía subcutánea, partículas virales completas (7.7 mg por ratón) en adyuvante incompleto de Freund para observar si la *Salmonela* recombinante estimuló una respuesta inmune contra la VP7 viral por medio de la VP7 expresada en la bacteria. En el experimento # 8 la inoculación con virus fue a las 11 semanas.

TOMA DE SUEROS.

Los ratones fueron sangrados de la vena retroorbital, en los días (con respecto a la fecha de la primera inoculación) -1, 14, 21, 35, 49, 56, 63 y 70, en el experimento 7, y en los días -1, 21, 34, 49, 63, 70, 77 y 84, en el experimento 8. La sangre recuperada se dejó coagular a temperatura ambiente y después se guardó por 6 horas a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron en centrifuga eppendorf a 14,000rpm por 3 minutos, a temperatura ambiente y el complemento en el suero recuperado se inactivó a 56°C por 30 minutos. Los sueros fueron almacenados a -70°C para su análisis posterior.

RECUPERACION DE BACTERIAS DE HIGADO Y BAZO.

A los días 1, 7, 14, 35 y 49, para el experimento 7, y a los días 1, 7, 21, 35 y 49 en el experimento 8, se sacrificaron dos ratones de cada grupo (inoculados con SL3261 o SL3261/pUMA93Z-rop), de cada sexo. el hígado y bazo de los diferentes animales se homogeneizaron (se juntaron los órganos correspondientes de los dos ratones) en 10 ml de

agua destilada estéril, acorde a lo descrito por Hormaeche (1979). Se hicieron las diluciones adecuadas y las muestras fueron plaqueadas por duplicado en cajas con LB y cajas de LB+AMP 100 mg/ml o LB+20 µl X gal, para evaluar la permanencia de bacterias en el hígado y el bazo a diferentes tiempos postinoculación.

ENSAYO DE ELISA.

CONTRA β GALACTOSIDASA.

Dado que la β -galactosidasa comercial no estaba lo suficientemente limpia para ser usada en el ensayo de ELISA, primero se eliminaron las impurezas por cromatografía de afinidad como se indica a continuación (Tomado de Germino, *et al* 1983 y de Ullmann 1984).

1) Se prepara 1 mililitro de columna de PATG-Agarosa (p-aminobezil-1-tio- β -D-galactopiranosido) (Sigma).

2) Se resuspende 1 mg de b-galactosidasa (BRL) en amortiguador D (NaCl 0.25 M, Tris HCl 0.01 M, pH7.6 / MgCl₂ 0.01 M / 0.001 M EDTA / 2-mercaptoetanol 0.01 M, Triton X-100 0.1 %), y se pasa por la columna de PATG-agarosa.

3) Se lava con 20 ml de amortiguador D, y después con 10 ml de amortiguador D sin triton X-100.

4) La β -gal se eluye con 1.5 ml de borato de sodio 0.1M, pH 10.

5) El volumen eluido se precipita con 1.5 ml de sulfato de amonio al 80%, y se añade por goteo, en agitación constante y a 4°C.

6) Se centrifuga 15 minutos a 10,000 rpm en centrífuga eppendorf a 4°C.

7) Se desecha el sobrenadante y se resuspende en 2 ml de amortiguador fosfatos (0.1M pH 7.3). La β -gal así purificada se dializa contra amortiguador de fosfatos con 3 cambios cada 12 horas, a 4°C. Lo dializado se guardó a -20°C.

Se verificó la recuperación de β -galactosidasa por ensayo de actividad de la proteína y por geles de poliacrilamida-SDS. De la proteína purificada se hicieron alícuotas y de estas se tomo para el ensayo de ELISA contra β -gal, como se indica a continuación.

1) Colocar 50 µl de β gal (750 ng) en amortiguador de fosfatos 0.1 M (KH₂PO₄ 0.015 M, Na₂HPO₄ 0.08 M pH 7.3) por cada pozo de placas inmunolon 2 (Dynatech) e incubar 3 horas a 37°C y posteriormente a 4°C por 12 horas.

2) Lavar los pozos con PBS-T (Tween 20 0.05% en PBS) 3 veces, y agitar 1 minuto cada vez.

3) Bloquear los pozos con 250 µl de PBS-T-BSA 3% (Albúmina de suero bovino), incubar a 37°C por 2 horas.

4) Lavar 3 veces con PBS-T.

5) Añadir 100µl del suero problema de ratón, diluido 1/100 en PBS-T, e incubar a 37°C 3 horas.

6) Lavar 3 veces con PBS-T.

7) Añadir 100 µl de proteína A-peroxidasa (Amersham), diluida 1/500 en PBS-T, e incubar 2 horas a 37°C .

8) Lavar 3 veces con PBS-T.

9) Añadir 100 µl de sustrato (27.5 ng de ABTS en 3 ml de amortiguador de ABTS, aforado a 50 ml con agua destilada), e incubar de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente.

10) Parar la reacción con 50 µl de ácido cítrico 0.1 M, Na₂SO₄ 0.01%.

11) Leer a 410 nm.

CONTRA LIPOPOLISACARIDO DE *S.typhimurium*.

1) Añadir 50 µl de LPS de *S.typhimurium* (10 mg/ml) (DIFCO) en amortiguador de carbonatos (NaCO₃ 0.015 M, NaHCO₃ 0.035 M pH 9.6) por pozo.

Repetir los pasos 2 a 11 del ELISA contra β-gal. Excepto que en el paso 7, en lugar de la proteína A-Peroxidasa se usa suero anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa, diluido 1/1500 en PBS-T.

CONTRA PARTICULAS VIRALES DE SA11.

1) En placas Immulon 1 (Dynatech) se añaden, por pozo, 50 µl de suero de cabra anti rotavirus D, a una dilución 1:5,000 en amortiguador de carbonatos. Incubar toda la noche a 4°C.

2) Lavar 3 veces con PBS-Tween al 1%. Bloquear sitios inespecíficos con 200 µl por pozo de albumina bovina al 3% en PBS-Tween. Incubar 2 horas a 37°C.

3) Lavar 3 veces con PBS-Tween. Añadir 50 µl por pozo de virus SA11 purificado (94 ng/ml) diluido 1:1250 en amortiguador de magnesio (NaCl 0.15 M, MgCl₂ 0.001 M, Tris-HCl 0.01 M, pH 8.2). Incubar 2 horas a 37°C.

4) Lavar 3 veces con PBS-Tween. Añadir sueros problema diluido 1:100 en PBS-Tween. Incubar 2 horas a 37°C.

5) Lavar 3 veces con PBS-Tween. Añadir 50 µl por pozo, de anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (ICN immunobiologicals, Lisle, IL.), diluido 1:250 en PBS-Tween. Incubar 2 horas a 37°C.

6) Lavar 3 veces con PBS-Tween. Añadir 50 µl por pozo de sustrato (1 tableta (5 mg) de Sigma 104 en 5 ml de amortiguador dietanolamina 1%, MgCl₂ 0.001 M, pH 9.8). Incubar 1 hora a 37°C.

7) Parar la reacción con NaOH 3 M.

8) Leer a 410 nm.

ENSAYO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de ratones inoculados con la *Salmonella* recombinante se determinaron por el procedimiento descrito por Shaw *et al* (1985) y Arias *et al* (1987).

1) A un volumen de SA11, en una dilución que produzca aproximadamente 500 células teñidas por pozo (activados antes de hacer la dilución, durante 30

minutos a 37°C, con tripsina (DIFCO 1/250), a una concentración final de 10 mg/ ml), se mezcla con un volumen de diluciones dobles seriadas de los sueros de los ratones inoculados, y se incuban por 1 hora a 37°C .

2) Las mezclas (50λ por pozo) se añaden a monocapas de células MA104 en placas con 96 pozos c/u. Las cajas se lavan previamente dos veces con PBS estéril.

3) El virus se adsorbe 1 hora a 37°C, y los inóculos se retiran, al añadir 200 ml de medio mínimo EAGLE a cada pozo.

4) Las células se incuban por 12 horas a 37°C .

5) Después de la incubación las células se lavan dos veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS).

6) Se fijan por 15 minutos con acetona al 80% en PBS.

7) Se lavan los pozos dos veces con PBS y se dejan secar a temperatura ambiente.

8) Se añaden 50λ por pozo de suero anti SA11 (obtenido del conejo 127) a una dilución 1:1500, en PBS, y se incuba durante 1 hora a 37°C.

9) Se lava dos veces con PBS.

10) Se añaden 50λ de proteína A-peroxidasa (Amersham) diluida 1:2500 en PBS y se incuba a 37°C por dos horas.

12) Se lavan 2 veces con PBS.

13) Se agregan 50 λ de sustrato fresco (stock 3.5 ml amortiguador de acetatos 0.05 M pH 5, 1.5 ml 9-aminoetil carbazole a 4 mg/ ml en dimetil formamida y 10ml de H₂O al 30%), preparado en oscuridad y filtrado previamente.

14) Se incuban de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

15) Se lavan 4 veces con agua bidestilada.

16) Las células se observan con un microscopio de contraste de fase, con un objetivo 20x (ocular 10x).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en una muestra de suero se definen como la dilución del suero más alta a la cual se observa una disminución de focos infecciosos de al menos el 60%, comparado con los controles en los que se utilizó PBS en lugar de suero.

ENSAYO DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

1) A 8.5 ml de sangre humana tipo O se le agregan en 1.5 ml de solución de Alsever (citrato de sodio 11.26 g, ácido cítrico 4g, glucosa 11g, en 500 ml de agua, se esteriliza en autoclave) y se guarda a 4°C.

2) La cantidad que se va a utilizar se centrifuga a 3,000 rpm, en centrífuga Beckman de mesa TJ-6.

3) Los eritrocitos se lavan 3 veces en PBS (pH 7.4).

4) Del paquete se hace una suspensión al 0.5% de eritrocitos en PBS-Albumina al 0.4 % final, pH 7.4.

5) Se incuban 25 ml de diferentes diluciones de los sueros de los ratones inoculados con *Salmonella* recombinante, durante 60 minutos a temperatura ambiente, con 25 λ del virus SA11 que representan 4 unidades hemaglutinantes.

6) En placas de 96 pozos, con fondo en "U", se agregan 50 λ de la suspensión de eritrocitos por pozo, mas 50 λ de la mezcla del virus y el suero.

7) Se agita y se deja a temperatura ambiente por 60 minutos.

8) Se lee cual fue la dilución mas alta del suero que inhibió la hemaglutinación del virus.

RESULTADOS.

PRESENCIA DE pUMA93Z Y pUMA93Z-ROP EN SL3261.

Los plásmidos pUMA93Z y pUMA93Z-rop, los cuales dirigen la síntesis de VP7-βgal en *E. coli*, fueron introducidos por transducción en *S. typhimurium* SL3261. El plásmido pUMA93Z-rop, construido previamente por Plebanski, no había sido caracterizado en cuanto a la presencia del gen *rop* y su orientación dentro del plásmido pUMA93Z. Por esta razón, se purificaron los plásmidos pUMA93Z y pUMA93Z-rop de la cepa SL3261, y se determinó su patrón de restricción, por medio de las enzimas BglI y pstI. Como marcadores de peso molecular se emplearon el plásmido pBR435 digerido con BamHI y el plásmido pBR322 digerido con HinfI. En la Figura 4 se muestran los patrones de restricción de pUMA93Z y de pUMA93Z-rop. El fragmento de 161 pb de pUMA93Z contiene un sitio único Hind III, en donde se clonó el gen de *rop* proveniente de pBR435 (Segmento de 316 pb Figura 6), por lo que en pUMA93Zrop el fragmento de 161 pb es remplazado por uno nuevo de 484 pb (Hay que recordar que al clonar *rop* se usó Klenow para generar extremos rasurados, lo que aumenta el número de pares de bases y explica la diferencia), (figura 4), se verificó la presencia del gen de *rop* en este plásmido.

La orientación del gen *rop* en pUMA93Z se determinó también por patrones de restricción. El gen *rop* presenta un sitio único para pvuII, el cual está localizado de manera asimétrica dentro del gen (ver Figura 7), lo cual permite, al cortar con esta enzima, determinar su orientación. Las orientaciones posibles y los mapas de restricción correspondientes, se muestran

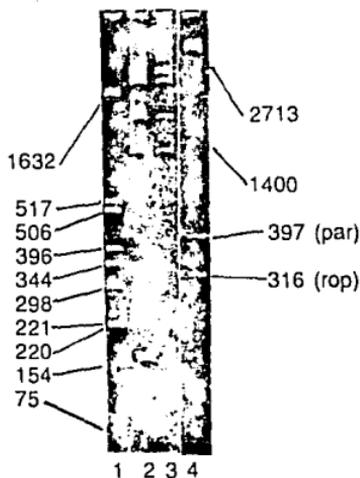
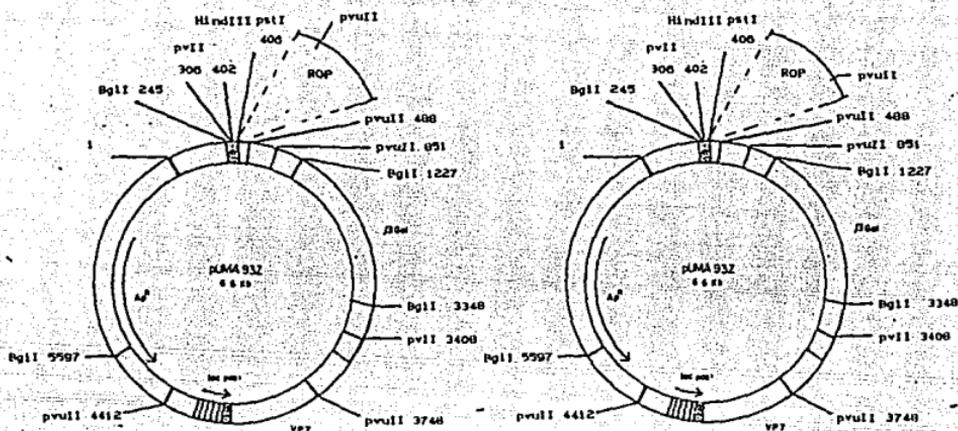


Figura 6.- Patrones de restricción de 1)pBR322/HinI, 2)pUMA93Z/BglI-pstI, 3)pUMA93Z-rop/BglI-pstI y 4)pBR435/BamHI. A los lados se muestra el número de pb para fragmentos de pBR322 y pBR435.

en las figuras 7 y 8. Como se puede observar en la figura 8A, la banda de 100 pb resultante de la digestión de pUMA93Z con *pvuII* y *pstI* (Fragmento en el que está contenido el sitio único de *Hind III*, donde se clonó el gen *rop*), sería remplazada por dos bandas, de 156 y de 267 pb (al digerir pUMA93Z-rop con estas dos enzimas) si el gen *rop* se encontrara en la orientación I (Figura 7), o en su caso por 2 bandas, de 76 y 347 pb si se encontrara en la orientación II (Figura 7). Como puede verse en la Figura 8B, al digerir pUMA93Z-rop con *pvuII* y *pstI*, se observó, la aparición de una banda de 76 pb. La presencia de la otra banda esperada, de 347 pb, no es evidente ya que queda oculta entre las bandas de 340 y 365 pb del vector (Figuras 8A y 8B).

Estos resultados indican que el gen de *rop* se encuentra en la orientación II de la Figura 7, con lo cual su transcripción es en el sentido de las manecillas del reloj (Cesareni, et al. 1982; O'Brien 1984).



I II
 Figura 8.- Posibles orientaciones del gen *rop* en pUMA93Z.

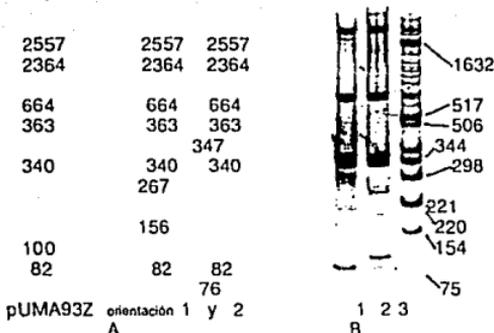


Figura 8.- A) Patrones de restricción teóricos de pUMA93Z, y de las dos posibles orientaciones de *rop* en pUMA93Z-*rop*, señaladas en la figura 6. B) Patrón de restricción de pUMA93Z-*rop* (1) y pUMA93Z (2) digeridos con *ps*I y *pvu*II y analizados en geles de poliacrilamida teñidos con plata. En el carril 3 se muestra a pBR322 digerido con *Hin*III (3), como marcador de PM.

EXPRESION DE VP7- β GAL EN SL3261.

La síntesis de la proteína híbrida VP7- β gal en *Salmonella* SL3261,

dirigida por los plásmidos pUMA93Z y pUMA93Z-rop, se determinó por el análisis de las proteínas bacterianas totales en geles de poliacrilamida-SDS (Laemmli 1970). En la figura 9 podemos observar los patrones de proteínas correspondientes a *Salmonella typhimurium* SL3261 transducida con pUMA93Z-rop (Carril 1), pUMA93Z (Carril 2), y la bacteria sin plásmido (Carril 3). En las dos cepas con plásmido se aprecia la aparición de tres bandas que no están en la cepa sola. Corresponden por analogía a las mismas tres proteínas que aparecen en lisados de *E.coli* transformadas con pUMA93Z, y donde fueron caracterizadas en detalle (Arias, *et al* 1986), estas bandas corresponden a la proteína híbrida VP7- β gal (Banda A), a un producto de inicio de traducción interno del gen quimera, el cual lleva exclusivamente secuencias de β -galactosidasa (Banda C) y a un tercer producto polipeptídico de naturaleza desconocida, codificado por el plásmido (Banda B).

La proporción relativa de estas tres proteínas con respecto de las proteínas totales se cuantificó por densitometría de los geles. En la figura 10 se muestran los perfiles de proteínas de la bacteria con pUMA93Z (A) o con pUMA93Z-rop (B), y de la bacteria sola. Sólo para SL3261 sin plásmido se muestra el patrón completo. A partir de estos perfiles (con el paquete de computación incluido en el densitómetro), se determinó el porcentaje que representan las proteínas codificadas por los plásmidos con respecto de la proteína total de la bacteria (Tabla 6), se encontró que la bacteria con el plásmido pUMA93Z produce aproximadamente el doble de la proteína recombinante.

Figura 9.-
Electroforésis
de proteínas en
geles de polia-
crilamida-SDS
(7.5%), teñidos
con azul de
coomassie.
SL3261/pUMA93Z-
rop (1),
SL3261/pUMA93Z
(2) y SL3261(3).

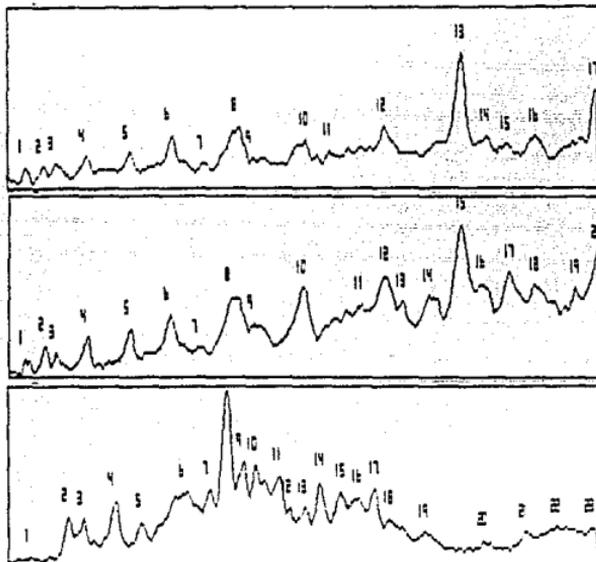
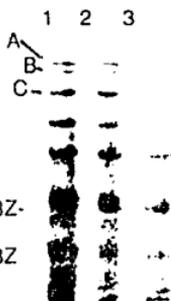


Figura 10.-Perfiles de densitometría de las proteínas del gel de la figura 8. A) SL3261/ pUMA93Z, B) SL3261/pUMA93Z-rop y C) SL3261. El pico 1 corresponde a VP7- β gal, el 2 a un producto desconocido, el tercero a β -gal (ver texto). En C) 1 representa la zona con 1,2 y 3 de los recuadros A y B, ya que en estos recuadros la densitometría se expandió para apreciar mejor las proteínas recombinantes.

En ambos la proteína VP7- β gal representa aproximadamente el 0.5% de la proteína total bacteriana (Tabla 6).

PROTEINA	%_EN_SL3261/pUMA93Z	%_EN_SL3261/pUM93Z-rop
VP7-BGAL	0.68	0.54
β -GALACTOSIDASA	2.1	1.08
PRODUCTO DESCONOCIDO	1.1	0.44
TOTAL	3.88	2.06

Tabla 6.- Porcentaje de las proteínas codificadas por los plásmidos con respecto de la proteína total de SL3261, obtenidos por densitometría de geles de poliacrilamida-SDS, teñidos con azul de coomassie.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA EN LISADOS BACTERIANOS.

Las proteínas recombinantes sintetizadas por los plásmidos pUMA93Z y pUMA93Z-rop tienen actividad de β -galactosidasa. Por lo tanto se cuantificó la actividad de esta enzima, como una manera de evaluar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes. Se determinó la actividad de β -galactosidasa, en lisados de las diferentes cepas bacterianas. Antes de cuantificar la actividad de la proteína se verificó que el 100% de las bacterias recombinantes fueran resistentes a ampicilina, como reflejo de la presencia del plásmido. Esto se hizo plateando un volumen conocido, por duplicado, en LB y en LB con ampicilina (100 mg/ml). En la Figura 11 se muestra el número de unidades de β -galactosidasa obtenidas con las diferentes cepas de *S. typhimurium* o *E. coli*.

En las bacterias que contenían plásmidos con el gen de *rop* (pUMA93Z-rop), se observó un número menor de unidades de β -gal que en los plásmidos controles (pUMA93Z), tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*. Comparativamente, el número de unidades fue mayor en las cepas recombinantes de *E. coli* que en las de *Salmonella* SL3261.

ESTABILIDAD IN VITRO DE pUMA93Z Y pUMA93Z-ROP EN SL3261.

Bacterias de *S. typhimurium* SL3261 recombinantes, que contenían alguno

de los plásmidos, pUMA93Z o pUMA93-rop, fueron crecidas en medio LB líquido con ampicilina hasta aproximadamente una $DO_{600} = 1$. Después del

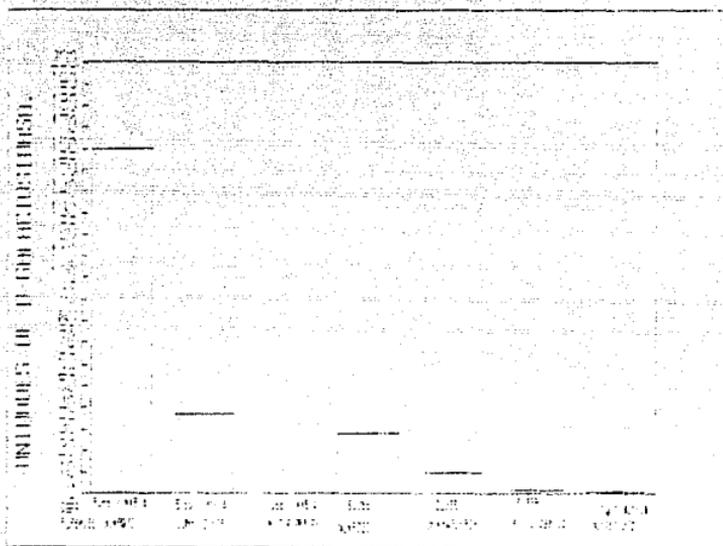


Figura 11. Unidades de β -galactosidasa (actividad de enzima que degrada 1nMol de ONPG por minuto a 28°C), en *E. coli* MX614 o en *S. typhimurium* SL3261 con o sin plásmido vector de expresión de VP7- β gal (pUMA93Z o pUMA93Z-rop) y en *S. typhimurium* prototrofa.

crecimiento se verificó que el 100% de las unidades formadoras de colonias (ufc) tuvieran el plásmido, determinado por la capacidad de éste para conferir a las bacterias resistencia a ampicilina y degradación de X-gal. Estas bacterias se crecieron posteriormente en LB, en ausencia del antibiótico, durante 40 generaciones, para cuantificar la estabilidad de los plásmidos sin presión selectiva (tomado de Curtis III *et al* 1988b). En la figura 12 se puede

observar que a las 40 generaciones aproximadamente el 75% de las bacterias que originalmente contenían pUMA93Z-rop mantuvieron el plásmido, mientras que en el caso de las que contenían el plásmido pUMA93Z aproximadamente el 95% la conservaron. El plásmido pUC8, vector del cual provienen los plásmidos anteriores, pero que carece de las regiones codificadoras de VP7 y de β -galactosidasa, tuvo una estabilidad del 95% a las 40 generaciones en SL3261 (Figura 12).

CRECIMIENTO Y PERSISTENCIA *IN VIVO* DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES.

Para verificar la persistencia *in vivo* de las diferentes cepas de *Salmonella* se inocularon ratones BALB/c por vía intravenosa, con 1.7×10^7 cfu de SL3261, 7.6×10^7 cfu de SL3261/pUMA93Z-rop o con 1.05×10^7 cfu SL3261/pUMA93Z. A diferentes tiempos se cuantificó el número de bacterias presentes en el hígado y bazo de los animales inoculados, y en la figura 13 se expresan como porcentaje recuperado, en relación al número de bacterias administradas originalmente para cada cepa. A las 24 horas postinoculación se recuperaron para SL3261 el 29.27 % en el bazo y el 63.39 % en el hígado, de las bacterias inoculadas; para SL3261/pUMA93Z-rop, el 16.33 % en el bazo y el 10.057 % en hígado; finalmente para SL3261/pUMA93Z, el 0.005 % en bazo y el 0.017 % en hígado. La diferencia en el porcentaje de bacterias recuperadas de hígado y bazo a las 24 horas postinoculación, entre las cepas estudiadas fue notoria.

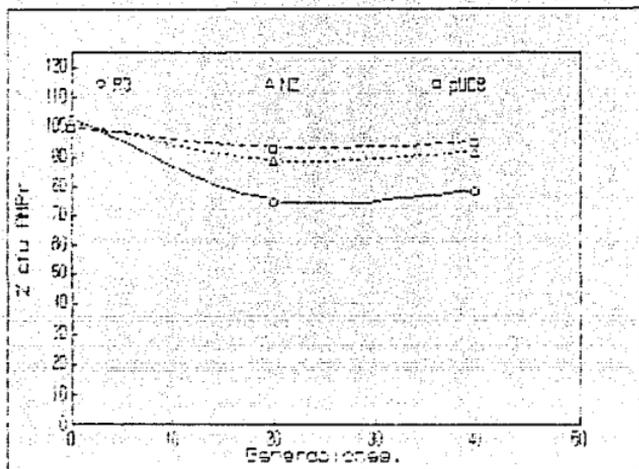


Figura 12 - Porcentaje de unidades formadoras de colonias resistentes a ampicilina (% cfu AMPr) a las 40 generaciones de crecimiento en LB líquido, sin presión selectiva. SL3261/ pUMA93Z-rop (R3), SL3261/pUMA93Z (NZ), SL3261/pUC8 (pUC8).

La recuperación a largo plazo (49 días) sólo fue seguida para SL3261 y para SL3261/pUMA93Z-rop (Figura 14). Se observó que el número de bacterias vivas recuperables incrementó durante la primera semana, post-inoculación (p.i.), tanto para la bacteria sola como para la que llevaba el plásmido; en el caso de SL3261, a los siete días el número de bacterias recuperadas llegó a exceder el número de bacterias inoculadas. El número de bacterias disminuyó en las siguientes 3 y media semanas, y se recuperaron menos de 60 ufc al día 35 p.i.; las bacterias SL3261/pUMA93Z-rop siguieron la misma tendencia. Al día 35 se dio un refuerzo de 1×10^6 o 5×10^6 bacterias de SL3261 o SL3261/pUMA93Zrop, respectivamente. Al día 49 p.i. primario (15 p.i. de refuerzo) se detectaron menos de 10 ufc, en ambos grupos. De las bacterias recuperadas de los ratones inoculados con SL3261/pUMA93Z-rop,

menos del 28 % mantuvieron el plásmido a los 35 días postinoculación.

En ambos grupos de ratones se observó un aumento notorio en el volumen del hígado y bazo, y solo en el caso de ratones inoculados con SL3261 se observó erizamiento del pelo durante varios días p.i. primaria.

INMUNOLOGIA.

ANTICUERPOS TOTALES CONTRA LPS, VIRUS SA11 Y β -GAL.

Los sueros de ratones obtenidos a diferentes tiempos después de inocular las cepas SL3261 o SL3261/pUMA93Z-rop, fueron analizados por ensayos de ELISA, para detectar anticuerpos contra lipopolisacárido (LPS) de *S. typhimurium*, contra la partícula viral completa y contra β -galactosidasa. Es importante recordar que 35 días después de la inoculación primaria, se dio un refuerzo con la bacteria correspondiente, y 15 días después del refuerzo, es decir, a los 49 días del inicio del protocolo, los ratones fueron inmunizados con una dosis de virus SA11 purificado (amablemente proporcionado por Pedro Romero).

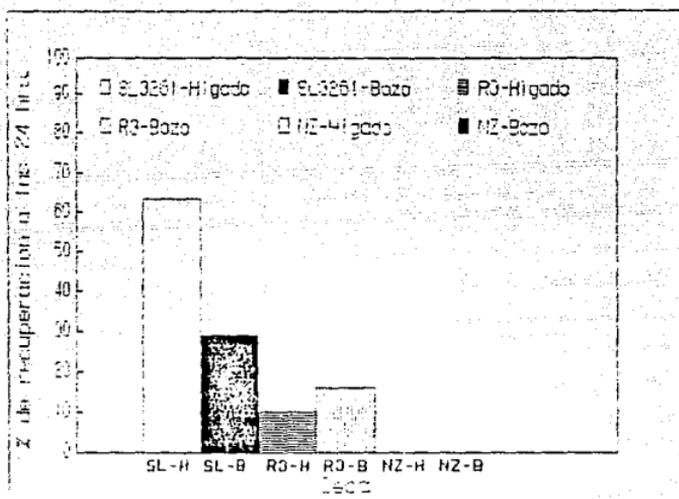
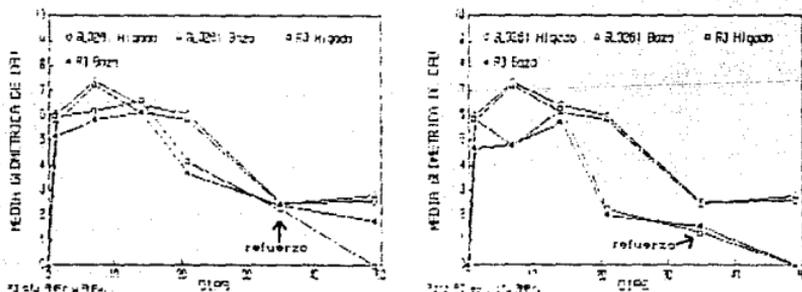


Figura 12.- Porcentaje de bacterias recuperadas con respecto al total de bacterias inoculadas, a las 24 horas postinoculación, para SL3261, SL3261/pUMA93Zrop y SL3261/pUMA93Z.

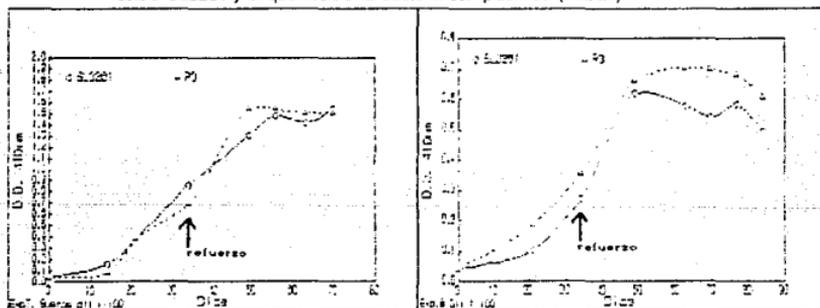


A B
Figura 13.- Permanencia de *S. typhimurium* A) Número de bacterias totales (Ampr + Amps) recuperadas de hígado y bazo de ratones inoculados con SL3261 o con SL3261/pUMA93Z-rop (R3). B) Número de bacterias resistentes

a ampicilina de ratones inoculados con SL3261 o con R3. Para comparación se muestra la curva de recuperación de bacterias SL3261 (sensibles a ampicilina) presentados en el panel A en el B.

En el ELISA contra LPS de *S. typhimurium* se observó un aumento de anticuerpos séricos contra este antígeno del día 14 hasta el día 35 (Figura 15A y B), se observó un incremento mayor a partir de la semana posterior al refuerzo (día 42). No hubo diferencia significativa en la inducción de anticuerpos contra LPS entre las dos cepas de bacterias.

Por otro lado, no se pudieron detectar los anticuerpos anti-rotavirus, aún en el día 49 p.i primaria (15 días p.i. del refuerzo) en ninguno de los dos grupos (Tabla 7). Como era de esperarse, una semana después de administrar el virus (Día 56) se detectaron fácilmente anticuerpos anti-rotavirus en ambos grupos, sin embargo no se observó diferencia entre el grupo que recibió SL3261 y el que recibió la bacteria con plásmido (Tabla7).



A B
Figura 16.- Ensayo de ELISA contra lipopolisacarido, de *S. typhimurium*, de los sueros recuperados de los experimentos 7 (A) y 8 (B).

En el ensayo de ELISA contra β -galactosidasa, se observó respuesta inmune humoral solo en 3 de los 6 ratones probados de los experimentos 7 y 8. La respuesta inmune comienza a presentarse al día 14 (Figura 16), y se incrementa al aplicar el refuerzo al día 35. Se observa un pico máximo al día 49 p.i. primaria, a partir del cual la respuesta comienza a disminuir de manera constante, en la figura 16 se muestra la cinética de la respuesta inmune sólo para los tres ratones en que se observó respuesta.

Sangrado(día)	SL3261	R3	Rat. hiperinmune
0	0.02	0.0014	1.695
49	0.054	0.026	
56	0.3317	0.3421	

Tabla 7.- Promedios de D.O. a 410 nm de ensayos de ELISA contra partículas virales completas, de sueros preinmunes (día 0), sueros del día anterior a la inoculación subcutánea con virus completo (día 49), y de una semana postinoculación con virus (día 56), de sueros recuperados del experimento 7 y 8. Con propósito comparativo se incluye la lectura de un suero hiperinmune contra rotavirus.

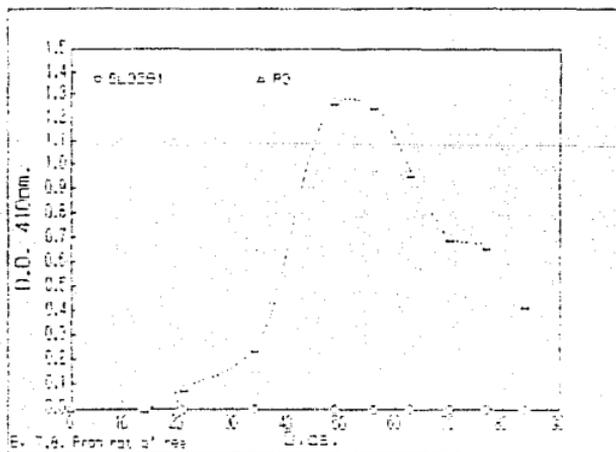


Figura 15.- Ensayo de ELISA contra β -galactosidasa. Se muestran los promedios de D.O. a 410nm solo de los sueros de ratones que montaron una respuesta inmune contra el antígeno.

ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE SA11.

Para el ensayo de neutralización de la infección de SA11 se utilizaron los sueros del día 49 (o día en que se administró el virus), día 56 y día 62. En la Tabla 8 se muestran los promedios de los títulos de anticuerpos neutralizantes por grupo experimental. Como se puede observar, no se encontraron diferencias en los títulos de neutralización entre el grupo control y los ratones inoculados con SL3261/pUMA93Z-rop.

Cepa inoculada	Títulos de neutralización		
	S5	S6	S7
R3	<100	1464	2167
SL3261	<100	1447	2533

Tabla 8.- Títulos de neutralización contra el rotavirus SA11. EL título de neutralización es la dilución del suero en la que se observo una reducción del numero de células infectadas en al menos un 60% con respecto al control, que fue virus sin neutralizar. Se muestra el promedio de los experimentos 7 y 8, de sueros recuperados 1 día antes de la inoculación subcutanea con SA11 (S5) y una (S6) y dos semanas después (S7).

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

Finalmente, se determinó la capacidad de los sueros de ratón para inhibir la hemaglutinación del rotavirus SA11, como otra manera de medir los anticuerpos anti-VP7. En la tabla 9 se muestran los resultados de este ensayo. En ésta se puede observar que las bacterias que producen la proteína híbrida VP7-βgal, no indujeron la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, al igual que la cepa SL3261 sola. En los dos sangrados posteriores a la inoculación con viriones de doble cápside (S6 y S7), se observa la aparición de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, pero el título de

anticuerpos es similar en los sueros de ambos grupos.

Sangrado	Exp7		Exp8	
	SL3261	R3	SL3261	R3
S5	166	183	<100	<100
S6	1333	1567	2667	3275
S7	1467	1300	3200	2200

Tabla 9.- Promedios de títulos de inhibición de la hemaglutinación
El título se define como la dilución más alta del suero que inhibe
4 unidades hemaglutinantes del rotavirus de simio SA11.

DISCUSION.

EXPRESION DE VP7- β GAL EN SL3261.

En el presente trabajo se demuestra la producción de la proteína VP7 del rotavirus SA11 como producto de fusión con β -galactosidasa, en la cepa *aro A* atenuada de *Salmonella typhimurium* SL3261. La producción de VP7- β gal dirigida por los plásmidos pUMA93Z y pUMA93Z-rop, representó alrededor del 0.68 % y el 0.54% de la proteína total, respectivamente.

EFFECTO DE ROP EN PLASMIDOS EN SALMONELLA.

Se sabe que cuando la proteína rop, es codificada por plásmidos de tipo ColE1 en *E. coli*, facilita la interacción entre el ARNI y ARNII evitando la maduración de el RNAlI necesaria para que se pueda dar el inicio de la replicación (Tomizawa y Som 1984, Wang y Polinsky 1985, Willetts 1985), lo que reduce su número de copias (Cesareni, *et al* 1982) (Figura 4). Se ha reportado que en el género *Salmonella* algunos plasmidos, mientras menor es el número de copias su estabilidad es mayor, por mecanismos aún desconocidos (Stougaard *et al* 1979). Para probar el posible efecto del número de copias de pUMA93Z sobre su estabilidad en *S. typhimurium* SL3261, se subclonó en este plásmido el gen rop en el sitio HindIII único, a partir del plasmido pBR435 (Figura 5).

El gen de VP7- β gal, en el plásmido pUMA93Z, se expresa bajo el promotor lac de manera constitutiva, debido a que el género *Salmonella* carece del operón de lactosa (Miller 1972, Adhya 1985), que incluye el gen de *lac I*, el cual

regula la expresión del operón completo. Debido a lo anterior, la cantidad de proteína híbrida producida es proporcional al número de copias del plásmido. Las evidencias aportada por los experimentos de densitometría de las proteínas bacterianas separadas en geles de poliacrilamida-SDS y por la diferencia de número de unidades de β -galactosidasa entre las dos cepas recombinantes, sugieren aunque de manera indirecta, que el plásmido pUMA93Z se encuentra en mayor número de copias que el pUMA93Z-rop, tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium* SL3261, lo que indica que la proteína rop parece actuar de manera similar en ambos géneros bacterianos.

Al verificar la estabilidad de los plásmidos recombinantes en la bacteria SL3261, se observó que a las 40 generaciones de crecimiento en medio líquido sin presión selectiva, el plásmido pUMA93Z fue ligeramente más estable (95%) que pUMA93Z-rop (75%). Si realmente pUMA93Z-rop en *Salmonella* SL3261, está en menor número de copias que pUMA93Z, los presentes datos difieren de lo reportado por Stougaard y colaboradores (1979). El tipo de segregación observada en el presente trabajo concuerda con la de plásmidos "multicopia", en los que su duplicación no está acoplada al genóforo del hospedero (Mungia 1987) y su herencia a las células resultantes de la división es aleatoria, y depende del número de copias (Meacock y Cohen 1980), por ello, mientras mayor es su número, mayor es la probabilidad de que ambas células hereden al menos una copia del plásmido.

Debido a la inestabilidad de los plásmidos recombinantes en *Salmonella*, se han seguido diversas estrategias para estabilizar la expresión de antígenos heterólogos en esta bacteria. Una de ellas es el uso de plásmidos que complementen alguna mutación letal en el genóforo, como la provocada por alguna auxotrofia, y que no pueda ser complementada por los metabolitos

presentes en los tejidos de mamíferos. Este es el caso del plásmido pYA248 que complementa la mutación letal *asd* en *Salmonella typhimurium galE* y *cya crp*, el cual tiene una estabilidad probada del 100 % a las 60 generaciones *in vitro*, sin necesidad de presión de selección (Nakayama, *et al* 1988 y Kaper 1988), a pesar de expresar el producto del gen *spaA* de *S. sobrinus* bajo un promotor fuerte (Nakayama *et al* 1988).

El uso de plásmidos para clonar diferentes antígenos, presenta grandes ventajas sobre otros sistemas, debido a que a) son fácilmente manipulables; b) en la actualidad existe un gran número de protocolos para su modificación y extracción a gran escala, y c) son fácilmente transferibles entre diferentes cepas bacterianas en el laboratorio. Los resultados del presente trabajo indican que la presencia de la proteína *rop*, en plásmidos en *Salmonella typhimurium* SL3261, tiene efectos comparables a los plásmidos en *E. coli*, lo que puede ser alentador para el uso en *Salmonella* de otras posibles formas de estabilizar plásmidos que hayan sido funcionales en *E. coli*. Una estrategia que se podría explotar, es el uso de *parB*, el cual posee al menos dos genes, el *hok* y el *sok*, que por mecanismos aún poco comprendidos provocan la muerte postsegregacional de las células que pierden el plásmido; este sistema funciona tanto en genes de bajo como de alto número de copias y con diferentes sistemas de duplicación (Gerdes *et al* 1986). Otra función que podría estabilizar plásmidos de tipo ColE1 en *Salmonella*, es *cer* el cual evita la formación de multímeros, que son muy comunes en plásmidos, como los que se observaron en pUMA93Z y pUMA93Z-*rop* (datos no mostrados). La inhibición de formación de multímeros aumenta la estabilidad de los plásmidos multicopia (Stirling, *et al* 1988).

Otro locus que puede usarse es *par*, el cual codifica para un producto polipeptídico no difusible, que se asocia al ADN del plásmido, y que muy probablemente permite su asociación con el genóforo de la bacteria para así asegurar su segregación a las células "hijas" durante la división (Meacock y Cohen 1980). Se ha reportado que algunas combinaciones entre *rop*, *cer* y *par* parecen aumentar la estabilidad proporcionada por alguna de las funciones, cuando se presentan de manera independiente (Mungia 1987).

Otro sistema para estabilizar la expresión de antígenos heterólogos, se basa en la clonación del gen que codifica la proteína de interés en el genóforo de *Salmonella*, por medio de doble recombinación. Este sistema ha sido probado en *S. typhimurium galE*, y estabiliza la expresión del antígeno K88 tanto *in vitro* como *in vivo*, en ratones inoculados por vía oral (Hone, *et al* 1988).

En *Salmonella* la inestabilidad reportada de plásmidos de alto número de copias (Stougaard, *et al* 1979), bien podría deberse en gran parte al tipo de proteínas que codifica, pues las proteínas que se sintetizan bajo la dirección de los plásmidos pueden tener efectos negativos en el metabolismo de la célula hospedera (Mungia 1987). La localización intracelular puede ser un factor determinante en el efecto negativo. Una posible solución a esto sería el añadirle a la proteína heteróloga la secuencia líder de proteínas que normalmente se exportan a través de la membrana (Randall *et al* 1987) o bien el acoplar la producción de la proteína heteróloga a la proteína completa que se exporta. En *Salmonella* la flagelina, que es proteína constitutiva de los flagelos, apéndices de locomoción en bacterias (Macnab 1987), recientemente se han utilizado para exportar antígenos de diversos patógenos de humanos, a través de la membrana, tales como de la hepatitis B, del virus del sida y otros

(Wu, *et al* 1989 y Newton, *et al* 1989), sin que estos afecten las funciones de locomoción de los flagelos. Otras proteínas para exportar antígenos que han dado buenos resultados en *E. coli*, y que podrían funcionar de manera adecuada en el sistema de *Salmonella*, como las porinas, que son proteínas transmembranales, cuya función normal es la de facilitar la difusión de solutos hidrofílicos (Benz 1988). Un ejemplo de esto es la porina LamB, que ha servido para exportar epítopes de poliovirus al espacio periplásmico de *E.coli* (Charbit, *et al* 1986).

PERMANENCIA EN RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS RECOMBINANTES DE SALMONELLA.

Las dos cepas de *S.typhimurium* SL3261 que portan los plásmidos pUMA93Z y pUMA93Z-rop son capaces de permanecer en el hígado y bazo de ratones inoculados por vía intravenosa, como se muestra en las Figuras 13 y 14. Sin embargo, la recuperación de la bacteria recombinante a las 24 horas postinoculación, es mucho menor para la cepa SL3261/pUMA93Z (0.01% de de la bacteria inoculada originalmente) que para la cepa SL3261/pUMA93Z-rop (13% de recuperación). Como referencia a las 24 horas se recupera aproximadamente el 50 % de las bacterias inoculadas de la cepa SL3261 sin plásmido (Figura 13). Una posible explicación para la persistencia diferencial entre las dos cepas recombinantes es el nivel de síntesis de las proteínas codificada por el plásmido, de aproximadamente el 4% en la cepa pUMA93Z, al aproximadamente el 2% en pUMA93Z-rop.

Las bacterias con plásmido pUMA93Z-rop parecen ser eliminadas más rápidamente, tanto del hígado como del bazo de los ratones inoculados, que

la cepa sin plásmido (Figura 14B). Al día 21 la diferencia es ya notoria, y al día 35 se recuperan aproximadamente 1,000 ufc de la bacteria sola, mientras que solo de 10 a 100 de la bacteria recombinante. Dos semanas después de haber administrado el refuerzo con la bacteria correspondiente, no se recuperaron bacterias con plásmido, mientras que de la bacteria sola, todavía fueron fácilmente detectables (Figura 14B). Por otro lado, la recuperación de bacterias totales (bacterias resistentes mas bacterias sensibles a ampicilina) fue muy similar en los dos grupos de ratones (Figura 14a). Después del refuerzo del día 35, el número de bacterias no aumento hasta los niveles alcanzados en la inoculación primaria, lo que sugiere la existencia de inmunidad hacia *Salmonella typhimurium* inducida por la primera inoculación.

En ninguno de los trabajos reportados, en los que se clona algun antígeno heterólogo en *Salmonella* (Tabla 5), se han observado efectos detrimentales en la recuperación de las bacterias recombinantes *in vivo*. En el presente trabajo, se muestra cómo posiblemente la producción de proteínas ajenas a la bacteria pueden representar un factor determinante en la permanencia de estas *in vivo*.

Algunas especies del género *Salmonella* son parásitos intracelulares facultativos de macrófagos (Dougan, *et al* 1987, Calva, *et al* 1988). En las especies invasivas, como *S.typhimurium* en ratones, su internalización a macrófagos ocurre gracias a la fagocitosis clásica, además está mediada por mecanismos activos de la bacteria (Finlay y Falkow 1989), la cual activa una gran variedad de *loci* genómicos. Algunos de estos genes codifican para proteínas (Finlay, *et al* 1989; Galán y Curtiss III 1989; Elsinghorst, *et al* 1989), que son necesarias tanto para la translocación del lumen intestinal a la lamina propia y Placas de Peyer (Finlay, *et al* 1989, Finlay y Falkow 1989),

como para la internalización activa de las bacterias a los macrófagos (Finlay y Falkow 1989). Diversos estudios indican que la expresión de estos factores de virulencia inhiben la síntesis de otras proteínas bacterianas (Finlay, et al. 1989), lo que seguramente indica la prioridad y limitación de los precursores de los factores de virulencia. Ya dentro del macrófago, la bacteria debe evadir la actividad de diferentes proteínas como las defensinas, que son péptidos bactericidas (Groissman y Saier 1990), e hidrolasas (Moulder 1985) que produce el macrófago, para poder así la bacteria, subsistir e incluso multiplicarse dentro del fagocito (Finlay y Falkow 1989). La supervivencia en el interior del fagocito parece no ser mediada por evasión de la fusión del fagosoma con lisosomas del macrófago (Finlay y Falkow 1989), como ocurre en otros grupos de parásitos intracelulares como *Rickettsia* y algunas especies del género *Micobacterium* (Czuprynsky 1988), sino debido a que la bacteria presenta mecanismos que evitan su digestión por las enzimas del fagolisosoma (Moulder 1985).

El efecto observado en el presente trabajo, de la cantidad de proteína recombinante producida y/o el número de copias del plásmido, sobre la recuperación de bacterias del hígado y el bazo de ratones inoculados con estos organismos, podría deberse a que de alguna manera, la producción de las proteínas recombinantes altera la síntesis o la actividad de las proteínas que intervienen en la persistencia de la *Salmonella* atenuada, que afectarían la adherencia, la penetración o la supervivencia de la bacteria dentro de los macrófagos. Por otro lado la producción de proteínas recombinantes podría ser *in vivo* una carga metabólica importante, que afecte el metabolismo normal de la bacteria.

La recuperación de las bacterias con plásmidos es menor con respecto a la cepa sin plásmido, por lo que podría esperarse una disminución todavía mayor cuando la bacteria se administra por vía oral, ya que la cantidad de barreras que debe pasar son mayores.

SL3261 COMO ACARREADOR DE ANTIGENOS DE ROTAVIRUS AL SISTEMA INMUNE EN RATONES.

La producción de las proteínas recombinantes en SL3261 parece no disminuir la capacidad de esta cepa para estimular una respuesta humoral en contra del lipopolisacárido de *S.typhimurium* (Figura 15), y confirma la capacidad de esta cepa de estimular una respuesta inmune humoral en contra de la β -galactosidasa, como lo habían reportado anteriormente Brown y colaboradores (1987) (Figura 16). Para ambos antígenos (LPS y β -gal), se observó un efecto de potenciación en la respuesta inmune, al administrar un refuerzo de bacterias vivas al día 35 (Figuras 15 y 16). Por otro lado, no se detectó una respuesta inmune humoral en contra de la VP7 viral por ninguno de los ensayos realizados, incluido un ELISA contra la partícula viral completa (Tabla 7), en ensayos de neutralización de la infección del virus (Tabla 8), y en ensayo de inhibición de la hemaglutinación (Tabla 9).

La falta de respuesta observada contra VP7 puede deberse a diferentes razones: a) la manera en que VP7 se presenta en el sistema de *Salmonella* disminuye su inmunogenicidad; b) que la cantidad de VP7 producida no fuera lo suficientemente inmunogénica como para dar una respuesta medible por las técnicas descritas. Hone y colaboradores (1988), observaron que al integrar al genoma de *S.typhimurium* la secuencia codificadora del antígeno K88 de

E.coli, la estabilidad de la producción del antígeno aumentaba, tanto *in vitro* como *in vivo*, pero la producción del antígeno y su inmunogenicidad era menor, si se le comparaba con la producción e inmunogenicidad de la misma proteína sintetizada a partir de un plásmido, a pesar de ser el plásmido altamente inestable *in vivo*. En nuestro trabajo, VP7-βgal es producida a niveles muy bajos (<1%) en *Salmonella*, lo que en conjunción con la poca estabilidad del plásmido *in vivo*, hace que la proteína VP7-βgal producida posiblemente no sea suficiente para inducir una respuesta inmune detectable, dado que los tres ensayos que se utilizaron para medir la respuesta de anticuerpos contra la proteína VP7-βgal tienen como prerequisite el que estos anticuerpos reconozcan a la proteína tal y como se encuentra formando parte del virión completo, una tercera posibilidad es que el tipo de anticuerpos que se generan contra la proteína recombinante no reconozcan a la proteína en el virus. La porción de la proteína producida en *Salmonella*, a diferencia de la VP7 viral, está truncada, es un producto de fusión con β-galactosidasa y no está glucosilada, lo cual probablemente altera la conformación de los epítopes inmunogénicamente importantes de VP7.

La inmunogenicidad de VP7-βgal reportada por Arias y colaboradores (1986), cuando ésta proteína es administrada por vía subcutánea, fue demostrada por ensayos de neutralización, sin embargo, en el trabajo original (Arias, et al. 1986), no se midieron anticuerpos totales contra la VP7 viral, por lo que la inmunogenicidad real de la proteína sola administrada por vía subcutánea no es clara. Ensayos de inmunoelectrotransferencia contra VP7 de SA11, serán realizados con los sueros de los experimentos descritos en el presente trabajo, para verificar si por este método es posible encontrar algún tipo de anticuerpos no detectados por los métodos

descritos en la sección de resultados.

Finalmente, es importante agregar que la respuesta inmune celular, no fue estudiada. Para otros antígenos se ha reportado que puede darse una respuesta celular sin que se monte una de tipo humoral o secretoria, como se ha observado para antígenos del circunsporozoito de *P.berghei* (Sadoff, *et al.* 1988a). En este contexto es relevante el hecho de que la respuesta inmune celular ha sido implicada en la inducción de protección *in vivo* contra la infección por rotavirus. Aunque aparentemente la cepa recombinante SL3261/pUMA93Z-rop no fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en contra de los epítopes virales presentes en la proteína VP7- β gal, los resultados de este trabajo, indican cuales son las alternativas a seguir para lograr al construcción de una bacteria recombinante con mejores posibilidades de inducir una buena inmunogenicidad. Es claro que es necesario encontrar el nivel óptimo de expresión (nivel de síntesis) y mejorar la estabilidad (presencia) del gen heterólogo en la bacteria recombinante. En el caso particular de VP7, parecería adecuado el probar la síntesis de otras regiones de la proteína viral, ya sea sola o fusionada a β -galactosidasa o a otra proteína bacteriana.

Una alternativa es la expresión de diferentes regiones de VP4 (la otra proteína de cápside externa) en *Salmonella* atenuada. En este caso, dado que VP4 no sufre modificaciones postraduccionales, la proteína podría expresarse completa, sin fusionar o bien podrían expresarse regiones seleccionadas, que incluso buscaran el generar una inmunidad heterotípica, esto es contra varios serotipos de rotavirus.

El modelo de *Salmonella* como acarreador de antígenos heterólogos al sistema inmune es prometedor, con base en los grandes avances que se han

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

generado en un lapso de tiempo tan corto. Algunas cepas de *Salmonella* podrían llegar a ser evaluadas a mediano plazo en pruebas masivas de campo. Sin embargo es importante considerar otras alternativas para la generación de vacunas.

En caso de que el sistema de *Salmonella* pruebe ser en el futuro útil y costeable como vacuna polivalente, se debe contar con muchas alternativas de inmunización, ya que *Salmonella* tiene seguramente un límite de tolerancia en el número de antígenos que puede expresar, para seguir siendo invasiva e inmunogénica; por otro lado, es posible que la efectividad de *Salmonella* como vacuna heteróloga sea disminuida, si la persona a vacunar ha sufrido infecciones naturales previas con *Salmonella* (Dougan, *et al* 1987).

Hasta ahora el valor de las vacunas convencionales sigue siendo preponderante. Hasta ahora sólo existen dos vacunas generadas por ingeniería genética en el mercado, una en contra de *E.coli* enterotoxigénica, (Liew 1985) y otra en contra del virus de la hepatitis B; esta última ya es administrada en México a grupos de alto riesgo, pero a escala muy limitada.

Desafortunadamente, las vacunas convencionales, además de presentar por lo general efectos colaterales, funcionan de manera empírica, lo que hace lenta su velocidad de generación, y proporcionan poca información acerca de los factores inmunes que intervienen en la resistencia a la infección por el agente patógeno. Las ventajas de la tecnología recombinante en la generación de vacunas, incluyen a) la posibilidad de generar inmunógenos genéticamente definidos (Hoisey y Stocker 1981); b) el hecho de que estos se podrían generar con mayor rapidez; y c) aportan información valiosa sobre los mecanismos de patogenia del parásito, y del tipo de inmunidad que participa en la protección del hospedero en contra de la enfermedad. Este tipo

de vacunas probablemente se conseguirán a mediano o a largo plazo; y seguramente, a pesar del tiempo invertido, probarán ser herramientas valiosas por la información a nivel básico y aplicado que podrán aportar.

BIBLIOGRAFIA.

- Adhya, S.1985. The Galactose Operon. In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Celular and Molecular Biology. (ed. Neidhart, FC). ASM. Washington,DC.
- Arias, C.F., López,S. and Espejo ,R. 1982. Gene Protein Products of SA11 Simian Rotavirus Genome. J. Virol. 47(1): 42-50.
- Arias, C.F., López, S., Bell, J.R. and Strauss J.H. 1984. Primary Structure of the Neutralization Antigen of Simian Rotavirus SA11 as Deduced from cDNA Sequence. J. Virol. 50:657-661.
- Arias, C.F, Ballado, T. and Plebański, M. 1986. Synthesis of the Outer-capsid Glicoprotein of the Simian Rotavirus SA11 in Escherichia coli. Gene.47:211-219.
- Arias, C.F., Lizano, M., and López S.. 1987. Synthesis in Escherichia coli and Immunological Characterization of a Polypeptide Containing the Cleavage Sites Associated with Trypsin Enhancement of Rotavirus SA11 Infectivity. J. gen. Virol. 68: 633-642.
- Arp L.H. 1988. Bacterial Infection of Mucosal Surfaces: An Overview of Cellular and Molecular Mechanisms. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens (ed. Roth J.). American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Assad F. 1987. World Health Organization Programme for Vaccine Development. In: Vaccines 87. (ed. Chanock RM, Lerner RA, Brown F and Ginsberg H). CSHL NY.
- Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Smith, JA, Seidman, JG and Stuhl K (ed). 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, N.Y.
- Benz,R. 1988. Structure and Function of Porins From Gram-Negative Bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 42:359-393.
- Bergmann, KC., and Walman, RH. 1988. Stimulation of Secretory Antibody Following Oral Administration of Antigen. Rev. Infec. Dis. 10(5): 938-950.
- Black, RE, Levine, MM, Clements, ML, Losonsky, G, Herrington, D, Berman, S and Formal, SB. 1987. Prevention of Shigellosis by a Salmonella typhi-Shigella sonnei Bivalent Vaccine. J. Infect. Dis. 155(6): 1260-1265.
- Bodhidatta, L., Taylor, D.N., Thisyakorn, U. and Echevernia, P. 1987. Control of Typhoid Fever in Bangkok, Thailand, by Annual Immunization of Schoolchildren with Parenteral Typhoid Vaccine. Rev. Infec. Dis. 9(4): 841-845.
- Brown, A, Hormaeche, CE, Demarco de Hormaeche, R, Winther, M, Dougan, G, Maskell, DJ and Stocker BAD. 1987. An Attenuated aroA Salmonella typhimurium Vaccine Elicits Humoral and Cellular Immunity to Cloned β -Galactosidase in Mice. J. Infect. Dis. 155:85-92.
- Calva, et al 1988.
- Carter, P.B. and Collins, F.M. 1974. The Route of Enteric Infection in Normal Mice. Jour. Exp. Med. 139:1189-1203.
- Cesareni, G, Muesing, MA and Polinsky, B. 1982. Control of ColE1 DNA Replication: The rop Gene Product Negatively Affects Transcription from the Replication Primer Promoter. Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 79:6313-6317.
- Clark, S.M., Roth, J.R., Clark, M.L., Barnett, B.B. and Spendlove, R.S. 1981. Trypsin Enhancement of Rotavirus Infectivity:Mechanism of Infection. J. Virol. 39: 816-822.
- Clements, J.D. 1988. Use of Attenuated Mutants of Salmonella as Carriers for Delivery of Heterologous Antigens to the Secretory Immune System. In: Modern Approaches to New Vaccines (ed. Chanock,R., Ginsberg, HZ.S., Lerner, R.A. and Brown, F.). CSHL, NY.
- Clements, J.D. and El-Morshidy, S. 1984. Construction of a Potential Live

Oral Bivalent Vaccine for Typhoid Fever and *Cholera-Escherichia coli*-Related Diarrheas. Infect. and Immun. 46(2):564-569.

-Collins FM. 1970. Immunity to Enteric Infection in Mice. Infect. Immun. 1: 243

-Collins FM. 1974. Vaccines and Cell Mediated Immunity. Bacteriol. Rev. 38(4): 371-402.

-Cuckor, G. and Blackglow, N. 1934 Human Viral Gastroenteritis. Microbiol. Rev. 48: 157-179.

-Curtis III, R. and Kelly, S.M. 1987. *Salmonella typhimurium* Deletion Mutants Lacking Adenylate Cyclase and Cyclic AMP Receptor Protein are Avirulent and Immunogenic. Infect. and Immun. 55(12): 3035-3043.

-Curtis, III R., Kelly, S.M., Gulig, P.A., Gentry-Weeks, C.R. and Galan, J.E. 1988a. Avirulent *Salmonella* Expressing Virulence Antigens from Other Pathogens for Use as Orally Administered Vaccines. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. (ed. Roth J.A.) American Society for Microbiology. Washington, D.C.

-Curtiss III, R, Goldschmidt, RM, Fletchall, NB and Kelly, SM. 1988b. Avirulent *Salmonella typhimurium* δ cya δ crp Oral Vaccine Strains Expressing a Streptococcal Colonization and Virulence Antigen. Vaccine 6: 155-160.

-Czuprynski, C.J. 1988. Bacterial Evasion of Cellular Defense Mechanisms: an Overview. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens (ed. Roth J.A.). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

-Chan, W, Penarada, MEm Crawford, SE and Estes, ML. 1986. Two Glycoproteins are Produced from the Rotavirus Neutralization Gene. Virology. 151: 243-252.

-Charbit, A., Boulain, J.C., Ryter, A. and Hofnung, M. 1986. Probing the Topology of a Bacterial Membrane Protein by Genetic Insertion of a Foreign Epitope; Expression at the Cell Surface. EMBO Jour. 5(11):3029-3037.

-Choppin et al. 1978. The Role of Viral Glycoprotein in Adsorption, Penetration and Pathogenicity of Viruses. Rev. Infect. Dis. 2: 41-61.

-Christensen, ML. 1989. Human Viral Gastroenteritis. Clin. Microbiol. Rev. 2(1): 51-89.

-Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, J.R. 1980. Advanced Bacterial Genetics CSHL, NY.

-Dougan, G, Hormaeche, CE and Maskell, DJ. 1987. Live Oral *Salmonella* Vaccines: Potential use of Attenuated Strains as Carriers of Heterologous antigens to the Immune System. Parasite Immunol. 9: 151-160.

-Dougan, G, Maskell, D, Sweeney, K, O'Callaghan, D, Fairweather, N, Brown, A, and Hormaeche, C. 1987. Live Attenuated *Salmonella* Vaccines as Carriers of Heterologous Antigens to the Immune System. Vaccines 87. CSHL: 279-282.

-Drasar, B.S and Barrow, P.A. 1985. Intestinal Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Dyall-Smith, M.L., Lazdins, I., Tregear, G.W. and Holmes I.H. 1986. Location of the Major Antigenic Sites Involved in Rotavirus Serotype-Specific Neutralization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 3465-3468.

-Elsinghorst, E.A., Baron, L.S. and Kopecko, D.J. 1989. Penetration of Human Intestinal Epithelial Cells by *Salmonella*: Molecular Cloning and Expression of *Salmonella typhi* Invasion Determinants in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5173-5177.

-Espejo, R. et al. 1978. Rotavirus Gastroenteritis in Hospitalized Infants and young Children in Mexico City. Lat. Amer. Microbiol. 20: 239-246.

-Espejo, R., Lopez, S. and Arias, C.F. 1981. Structural Polypeptides of Simian Rotavirus SA11 and the Effect of Trypsin. J. Virol. 37:156-160.

- Estes, MK, Graham, DY and Mason, BB. 1981. Proteolytic Enhancement of Rotavirus Infectivity: Molecular Mechanisms. J. Virol. 39: 879-888.
- Eydelloth, R.S., Vonderfecht, J.Z., Sheridan, J.F., Enders, L.D. and Yolken, R.H. 1984. Kinetics of Viral Replication and the Local and Systemic Immune Responses in Experimental Rotavirus Infection. J. Virol. 50(3): 947-950.
- Fang, Z., Glass, R.I., Penaranda, M., Dong, H., Monroe, S.S., Wen, L., Estes, M.K., Eiden, J., Yolken, R.H., Saif, L., Gouvea, V. and Hung, T. 1989. Purification and Characterization of Adult Diarrhea Rotavirus: Identification of Viral Structural Proteins. Jour. Virol. 63(5): 2191-2197.
- Finlay, B.B. and Falkow, S. 1989. *Salmonella* as an Intracellular Parasite. Mol. Microbiol. 3(12): 1833-1841.
- Finlay, B.B., Hefron, F. and Falkow, S. 1989. Epithelial Cell Surfaces Induce *Salmonella* Proteins Required for Bacterial Adherence and Invasion. Science 24:940-943.
- Formal, S.B., Baron, L.S., Kopecko, D.J., Washington, O., Powell, C. and Life, C.A. 1981. Construction of a Potential Bivalent Vaccine Strain: Introduction of *Shigella sonnei* Form I Antigen Genes into the *galE Salmonella typhi* Ty21a Typhoid Vaccine Strain. Infec. Immun. 34(3):746-750.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. and Konno, T. 1988. Role of VP3 in Human Rotavirus Internalization after Target Cell Attachment via VP7. Journ. Virol. 62(7):2209-2218.
- Galan, J.E. and Curtis, III R. 1989. Cloning and Molecular Characterization of Genes Whose Products Allow *Salmonella typhimurium* to Penetrate Tissue Culture Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6383-6387.
- Garcia, M. de L. 1985. *Salmonelosis: Revision de la Experiencia en el Instituto Nacional de la Nutricion Salvador Zubiran 1978-1984*. Tesis de Postgrado, Facultad de Medicina U.N.A.M.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B. and Molin, S. 1986. Unique Type of Plasmid Maintenance Function: Postsegregational Killing of Plasmid Free Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 3116-3120.
- Germino, J., Gray, J.G., Charbonneau, H., Vanaman, T. and Bastia, D. 1983. Use of Gene Fusions and Protein-Protein Interaction in the Isolation of a Biologically Active Regulatory Protein: The Replication Initiator Protein of Plasmid R6K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6848-6852.
- Germainer, and Furer. 1975. Isolation and Characterization of *galE* mutant Ty21A of *Salmonella typhi*: A Candidate Strain for a Live Oral Typhoid Vaccine. J. Infect. Dis. 151: 553.
- Gerna, G, Sarasini, A, Coulson, BS, Parea, M, Torsellini, M, Arbustini, E and Battaglia M. 1988. Comparative Sensitivities of Solid-Phase Immune Electron Microscopy and Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Serotyping of Human Rotavirus Strains with Neutralizing Monoclonal Antibodies. J. Clin. Microbiol. 26(7): 1383-1387.
- Green, K.Y., Hoshino, Y. and Ikegami, N. 1989. Sequence Analysis of the Gene Encoding the Serotype-Specific Glycoprotein (VP7) of two New Human Rotavirus Serotypes. Virology 168:429-434.
- Greenberg, HB, Valdesuso, J, Midthun, K, Walsh, M, McAuliffe, V, Wyatt, RG, Kalica, AR, Flores, J, and Hoshino, U. 1983. Production and Preliminary Characterization of Monoclonal Antibodies Directed at Two Surface Proteins of Rhesus Rotavirus. J. Virol. 47: 267-275.
- Grossman, E.A. and Saier, M.H. 1990. *Salmonella* Virulence: New Clues to Intramacrophage Survival. TIBS. :30-33.
- Gulig, P.A. and Curtiss III, R. 1987. Plasmid-Associated Virulence of *Salmonella typhimurium*. Infec. and Immun. 55(12): 2891-2901.

-Hale, T.L. and Formal, S.B. 1988. Virulence Mechanisms of Enteroinvasive Pathogens. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. (ed. Roth J.A.). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

-Hjelt, K, Grauballe, PC, Paerragaard, A, Nielsen, OH, and Krasilnikoff, PA. 1987. Protective Effect of Preexisting Rotavirus-Specific Immunoglobulin A Against Naturally Acquired Rotavirus Infection in Children. J. Med. Virol. 21: 39-47.

-Hoiseith, S.K. and Stocker, B.A.D. 1981 Aromatic-Dependent *Salmonella typhimurium* are non Virulent and Effective as Live Vaccines. Nature. 291:238-239.

-Hone, D, Altridge, S, Bosch, L. and Hackett, J. 1988. A Chromosomal Integration System for Stabilization of Heterologous Genes in *Salmonella* Based Vaccine Strains. Microbiol. Pathogenesis.5: 407-418.

-Hormaeche, CE. 1979. Natural Resistance to *Salmonella typhimurium* in Different Inbred Mouse Strains. Immunol. 37:311-318.

-Hoshino, Y., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Flores J. and Kapikian, A.Z. 1984. Serotypic Similarity and Diversity of Rotaviruses of Mammalian and Avian Origin as Studied by Plaque Reduction Neutralization. J. Infec. Dis. 149: 694-702.

-Jayashree, S, Bhan, MK, Kumar, R, Raj, P, Glass, R and Bhandari, N. 1988. Serum and Salivary Antibodies as Indicators of Rotavirus Infection in Neonates. J. Infec. Dis. 158(5): 1117-1119.

-Kabcenell, AK, and Atkinson, PH. 1985. Processing of the Rough Endoplasmic Reticulum membrane Glycoproteins of Rotavirus SA11. J. Cell Biol. 101: 1270-1280.

-Kalica, Ar, Greenberg, HB, Wyatt, Rg, Flores, J, Sereno, MM, Kapikian, Az and Chanock, RM. 1981. Genes of Human (Strain Wa) and Bovine (Strain UK) Rotaviruses That Code for Neutralization and Subgroup Antigens. Virology. 112:385-390.

-Kalica, AR, Flores, J, and Greenberg, HB. 1983. Identification of the Rotaviral Gene that Codes for Hemagglutination and Protease-Enhancement Plaque Formation. Virology. 125.:194-205.

-Kaper, JB. 1988. A major Advance in Live-Carrier Vaccines. Bio/Technology 6.

-Kapikian, Z.A. and Chanock, M.R. 1985. Rotaviruses. In : Virology (ed. Fields, B.N.). Raven Press, N.Y.

-Kapikian, Z.A., Greenberg, H.B., Wyat, R.G., Kalica, A.R., Kim, H.W., Brand, C.D., Rodriguez, W.J., Parrot, R.H. and Chanock, R.M. 1984. Viral Gastroenteritis. In: Viral Infections in Humans. (ed. Evans A.S.) Plenum Medical Book Co. N.Y.

-Kelly, M.T., Brenner, D.J. and Farmer III, J.J. 1985. Enterobacteriaceae. In: Manual of Clinical Microbiology. (ed. Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J. and Shadomy H.J.). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

-Korhonen,T.K., Leffler, H. and Eden,C.S. 1981. Binding Specificity of Piliated Strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to Epithelial Cells, *Saccharomyces cerevisiae* Cells, and Erythrocytes. Infec. Immun. 32(2): 796-804.

-Kraft, R., Tardiff, J., Krauter, K.S. and Leinwand, L.A. 1988. Using Mini-Prep Plasmid DNA for Sequencing Double Stranded Templates with Sequenase. BioTechniques. 6(6):544-547.

-Laemmli, UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

-Levine, M.N., Kaper, J.B. Black, R.E. and Clements, M.L.1983. New

Knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as Applied to Vaccine Development. Microbiol. Rev. 47(4):510-550.

-Levine, M.M., Herrington, D., Murphy, J.R., Morris, J.G., Losonsky, G., Tall, B., Lindberg, A.A., Svenson, S., Baqar, S., Edwards, M.F. and Stocker B.A.D. 1987. Safety, Infectivity, Immunogenicity, and In Vivo Stability of Two Attenuated Auxotrophic Mutant Strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543ty, as live Oral Vaccines in Humans. J. Clin. Invest. 79:888-902.

-Levine, M.M., Ferreccio, C., Black, R.E., Tacket, C.O., Germainer, R. and the Chilean Typhoid Committee. 1989. Progress in Vaccines Against Typhoid Fever. Rev. Infec. Dis. 11(supl 3): S552-S567.

-Liew, F.Y. 1985. New Aspects of Vaccine Development. Clin. Exp. Immunol. 62: 225-241.

-Liu, M. 1988. Identification of the Simian Rotavirus SA11 Genome Segment 3 Product. Virology 163: 26-32.

-Lopez, S, Arias, CF, Bell, JR, Strauss, JH and Espejo, RT. 1985. Primary Structure of the Cleavage Site as Associated With Trypsin Enhancement of the Rotavirus SA11 Infectivity. Virology 144: 11-19.

-Macnab R.M. 1987. Flagella. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. (ed. Neidhardt, F.C.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Mackow, ER, Shaw, RD, Matsui, SM, VO, PT, Dang, M, and Greenberg, HB. 1988. The Rhesus Rotavirus Gene Encoding VP3: Location of Aminoacids Involved in Homologous and Heterologous Rotavirus Neutralization and Identification of a putative Fusion Region. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 645-649.

-Maniatis, T, Fritsch, EF and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSHL, NY.

-Maskell, D., Liew, F.Y., Sweeney, K., Dougan, G. and Hormaeche, C. 1986. Attenuated *Salmonella typhimurium* as Live Oral Vaccines and Carriers for Delivering Antigens to the Secretory Immune System. In: Vaccines 86. CSHL, N.Y. 213-217.

-Matsuno, S, and Inouye, S . 1983. Purification of an outer capsid Glycoprotein of Neonatal Calf Diarrhea Virus and Preparation of its Antisera. Infect. and Immun. 39: 155-158.

-Meacock, P.A. y Cohen, N.C. 1980. Partitioning of Bacterial Plasmids During Cell Division: A Cis-Acting Locus That Accomplishes Stable Plasmid Inheritance. Cell 20:529-542.

-Miller, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. CSHL, N.Y.

-Moulder, J.W. 1985. Comparative Biology of Intracellular Parasitism. Microbiol. Rev. 49(3): 298-337.

-Mungia, M.E. 1987. Estudios Sobre Estabilidad y Replicacion Inducible en Plasmidos Tipo Col E1. Tesis de Licenciatura en Biologia. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Murphy, F.A. 1985. Virus Taxonomy. In: Virology (ed. Fields B.N.) Raven Press, N.Y.

-Nakayama, K., Kelly, S.M. and Curtis III, R. 1988. Construction of an ASD Expression-Cloning Vector: Stable Maintenance and High Level Expression of Cloned Genes in a *Salmonella* Vaccine Strain. Bio/Technology 6: 693-698.

-Newton, S.M.C., Jacob, C.O. and Stocker, B.A.D. 1989. Immune Response to Cholera Toxin Epitope Inserted in *Salmonella* Flagellin. Science 244: 70-72.

-O'Brien, S.J. (Ed.). 1984. Genetic Maps 1984. CSHL, N.Y.

- Offit, P.A. and Dudzid, K.I. 1988. Rotavirus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Cross-React with Target Cells Infected with Different Rotavirus Serotypes. J. Virol. 62(1):127-131.

- Offit, P.A., Shaw, R.D. and Greenberg, H.B. 1986. Passive protection Against Rotavirus-induced Diarrhea by Monoclonal Antibodies to Surface Proteins VP3 and VP7. Jour. Virol. 58(2):700-703.
- Osborne, M.P., Haddon, S.J., Spencer, A.J., Collins, J., Starkey, W.G., Wallis, T.S., Clarke, G.J., Worton, K.J., Candy, D.C.A. and Stephen, J. 1988. An Electron Microscopic Investigation of Time-Related Changes in the Intestine of neonatal Mice Infected with Murine Rotavirus. Jour. Ped. Gastroenterol. and Nutrition. 7:236-248.
- Poirier, T.P., Kehoe, M.A. and Beachey, E.H. Mucosal and Systemic Immunity Evoked by Attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* Expressing Cloned Streptococcal M Protein. Manuscript sin publicar.
- Puerto, F.I., Padilla-Noriega, L., Zamora-Chavez, A., Briceño, A., Puerto, M. and Arias, C.F. 1987. Prevalent Patterns of Serotype-Specific Seroconversion in Mexican Children Infected with Rotavirus. Jour. Clin. Microbiol. 25(5):960-963.
- Randall, L.L., Hardy, S.J.S. and Thom, J.R. 1987. Export of Protein: A Biochemical View. Ann. Rev. Microbiol. 41:507-541.
- Rao, V.C. and Melnick, J.L. 1986. Environmental Virology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Ruiz, A.M, Lopez, I.V., Lopez, S., Espejo, R.T. and Arias, C.F. 1988. Molecular and Antigenic Characterization of Porcine Rotavirus YM, a Possible New Serotype. Jour. Virol. 62(11):4331-4336.
- Sabara, M, Gilchrist, J.E, Hudson, GR, and Babiuk, LA.1985. Preliminary Characterization of an Epitope Involved in Neutralization and Cell Attachment that its Located in the Major Bovine Rotavirus Glycoprotein. J. Virol. 53: 58-66.
- Sadoff, J.C., Ballou, W.R., Baron, L.S., Majarian, W.R., Brey, R.N., Hockmeyer, W.T., Young, J.F., Cryz, S.J., Ou, J., Lowell, G.H. and Chulay, J.D. 1988. Oral *Salmonella typhimurium* Vaccine Expressing Circumsporozoite Protein Protects Against Malaria. Science. 240: 336-338.
- Sadoff, J.C, Ballou, R, Barron, LS, Ou, J., and Young, J.F.1988. Oral *Salmonella typhimurium* Circumsporozoite Recombinant Vaccines Protect Against Malaria. In: Modern Approaches to New Vaccines. (ed. Chanock R, Ginsberg HS, Lerner RA and Brown F), CSHL, NY.
- Sanderson, KE, and Stocker, BAD. 1987. *Salmonella typhimurium* Strains Used in genetic Analysis. In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology. (ed. Neidhart, FC). American Society for Microbiology. Washington , DC.
- Schodel, F, Enders, G and Will, H. 1988. Expression of LTB/ Viral Fusion Proteins in *Salmonella* for Oral Vaccination Against HBV. IN: Modern Approaches to New Vaccines. (ed. Chanock R, Ginsberg HS, Lerner RA y Brown F). CSHL, NY.
- Shaw, RD, Stoner-Ma, DL, Estes, MK and Greenberg, HB. 1985. Specific Enzyme-Linked Immunoassay for Rotavirus Serotypes 1 and 3. J. Clin. Microbiol. 22: 286-291.
- Silhary, Berman, ML and Enquist, LW. 1984. Experiments With Gene Fusions. CSHL, NY.
- Smith, BP, Reina-Guerra, M, Hoiseth, S, Stocker, BAD, Habasha, F, Johnson, E, and Merith, F. 1984. Aromatic Dependent *Salmonella typhimurium* as Modified Live Vaccines for Calves. Am. J. Vet Res 45(1): 59-66.
- Smith ,CC, Aurelian, L, Santosham and Sack, RB. 1983. Rotavirus--Associated Traveler's Diarrhea: Neutralizing Antibody in Asymptomatic Infections. Infect. and Immun. 41(2): 829-833.
- Sneller, M.C. and Strober, W. 1986. M Cells and Host Defense. Jour.

Infec. Dis. 154(5):737-741.

-Stevenson, G. and Manning, P.A. 1985. Galactose Epimeraseless (*GalE*) Mutant G30 of *Salmonella typhimurium* is a Good Potential Live Oral Vaccine Carrier For Fimbrial Antigens. FEMS Microbiol. Lett. 28:317-321.

-Stirling, C.J., Szatmari G., Stewart G., Smith M.C.M. y Sherratt D.J. 1988. The Arginine Repressor is Essential for PLasmid-Stabilizing Site-Specific Recombination at the ColE1 *cer* Locus. The EMBO Journal. 7(13):4389-4395.

-Stocker, B.A.D. 1988. Auxotrophic *Salmonella typhi* as Live Vaccine. Vaccine. 6: 141-145.

-Stougaard, P., Molin, S. and Nordstrom. 1979. Plasmid R1 in *Salmonella typhimurium*: Molecular Instability and Gene Dosage Effect. Plasmid. 2: 589-597.

-Taniguchi, K, Maloy, WL, Nishikawa, K, Green, K.Y., Hoshino Y, Urasawa, S, Kapikian, AZ, Chanock and Gorziglia, M. 1988a. Identification of Cross-Reactive and Serotype 2-Specific Neutralization Epitopes on VP3 of Human Rotavirus. J. Virol. 62(7): 2421-2426.

-Taniguchi, K, Hoshino, Y, Nishikawa, K, Green, KY, Maloy, WL, Morita, Y, Urasawa, S, Kapikian, AZ, Chanock, RM, and Gorziglia, M. 1988b. Cross-reactive and Serotype-Specific Neutralization Epitopes on VP7 of Human Rotavirus: Nucleotide Sequence Analysis of Antigenic Mutants Selected with Monoclonal-Antibodies. J. Virol. 62: 1870-1874.

-Tomizawa, J. and Som, T. 1984. Control of ColE1 Plasmid Replication: Enhancement of Binding of RNA I to the Primer Transcript by the Rom Protein. Cell. 38: 871-878.

-Ullmann, A. 1984. One Step Purification of Hybrid Proteins wich Have b-Galactosidase Activity. Gene 29: 27-31.

-Ushijima, H, Honma, H, Mukoyama, A, Shinozaki, T., Fujita, Y, Kobayashi, M, Ohseto, M, Morikawa, S and Kitamura, T. 1989. Detection of Group C Rotaviruses in Tokyo. J. Med. Virol. 27:299-303.

-Vieira, J, and Messing, J. 1982. The pUC Plasmids, an M13mp7-derived System for Insertion Mutagenesis and Sequencing with Synthetic Primers. Gene 19: 259-268.

-Ward, RL, Knowlton, DR, Schiff, GM, Hoshino, Y and Greenberg, HB. 1988. Relative Concentrations of Serum Neutralizing Antibody to VP3 and VP7 Proteins in Adults Infected with a Human Rotavirus. J. Virol. 62(5): 1543-1549.

-Ward, RL, Bernstein, DI, Shukla, R, Young, EC, Sherwood, JR, McNeal MM, Walker MC and Schiff GM. 1989. Effects of Antibody to Rotavirus on protection of Adults Challenged with Human Rotavirus. J. Infec. Dis. 159(1): 79-88.

-Warren, S.K. 1985. Great Neglected Diseases of the Developing World an their Possible Control by Vaccination. Vaccines 85 .CSHL, NY.

-Watanabe, T. and Ogata, Y. 1970. Genetic Stability of Various Resistance Factors in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 102: 363-368.

-Wang, EM and Polinsky, B. 1985. Alternative Conformations of the ColE1 Replication Primer Modulate its Interaction with RNA I. Cell. 42: 959-966.

-Wells, C.L., Maddaus, M.A. and Simmons, R.L. 1988. Proposed Mechanisms for the Translocation of Intestinal Bacteria. Rev. Infec. Dis. 10(5):958-979.

-Willets 1985. Plasmids. In: Genetics of Bacteria. (ed. Scaife J, Leal D and Galizzi A). Academic Press, Orlando.

-Wu, J.Y., Newton, S., Judd, A., Stocker, B.A.D. and Robinson, W.S. 1989. Expression of Immunogenic Epitopes of Hepatitis B Surface with Hybrid Flagellin

Proteins by a Vaccine Strain of *Salmonella* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4726-4730.

-Yolken, R, Arango-Jaramillo, S, Eiden, J. and Vonderfecht, S. 1988. Lack of Genomic Reassortment Following Infection of Infant Rats with Group A and Group B Rotaviruses. J. Infect. Dis. 158(5): 1120-1123.

-Zheng, B, Han, S, Yan, Y, Liang, X, Ma, G, Yang, Y and NG, M. 1988. Development of Neutralizing Antibodies and Group A Common Antibodies Against Natural Infections with Human Rotavirus. J. Clin. Microbiol. 26(8):1506--1512.