



10 11261
24

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Estudio de la Inmunogenicidad de
Porinas de *Salmonella typhi*.
Identificación y clonación de sus
genes codificantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
- I N M U N O L O G I A -
ROSANA PELAYO CAMACHO

MEXICO, D. F. 1991



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 está 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

I.	RESUMEN	10
II.	GENERALIDADES	11
III.	OBJETIVOS	22
IV.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
V.	MATERIAL Y METODOS	24
1.	Cepas bacterianas	24
2.	Ratones	24
3.	Cultivo de bacterias	24
4.	Determinación de Dosis Letal Media	25
5.	Obtención y purificación de porinas de <i>Salmonella typhi</i>	26
6.	Cuantificación de proteínas	27
7.	Cuantificación de lipopolisacárido	27
8.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	28
9.	Electroforesis bidimensional	29
10.	Inmuno-electrotransferencia	29
11.	Modelo murino de protección activa con porinas de <i>S. typhi</i> 9,12,V1:d	30
12.	Obtención de DNA de <i>Salmonella typhi</i>	31
13.	Purificación de DNA de <i>Salmonella typhi</i>	32
14.	Cuantificación de DNA	33
15.	Fraccionamiento del DNA	33
16.	Preparación de una sonda constituida de DNA de ompC de <i>E. coli</i>	34
16.1	Extracción de DNA plasmídico pTU-ompC	34

16.2 Obtención del gen <i>ompC</i> de <i>E. coli</i>	36
16.3 Radiomarcaje de DNA por el método de marcaje azaroso (Random primer)	37
16.4 Separación del DNA marcado radiacti- vamente de los deoxinucleótidos no incorporados	37
17. Detección de secuencias específicas en fragmentos de DNA separados por electrofo- resis en gel de agarosa (Southern)	38
18. Preparación de los vectores de clonación pUR 290-292	40
18.1 Extracción y purificación de plásmidos	40
18.2 Linearización y desfosforilación del DNA plasmídico	41
19. Preparación del inserto	42
19.1 Extracción y purificación	42
20. Preparación de células competentes DH5 α	42
21. Clonación del DNA bacteriano. Ensayos de ligación	43
22. Transformación de células competentes DH5 α	44
23. Tamizaje de la genoteca de DNA de <i>S. typhi</i> contra sondas de oligo- nucleótidos específicos	45
24. Detección de los plásmidos que contienen secuencias de <i>S. typhi</i>	46

VI. RESULTADOS 48

1. Preparación de porinas de *S. typhi* 48
2. Estudios de protección activa 49
3. Aislamiento y caracterización del DNA de *S. typhi* 59
4. Localización de secuencias homólogas al gen ompC de *E. coli* en *S. typhi* 59
5. Construcción de un banco de DNA 63
6. Rastreo del banco de genes con sondas de oligonucleótidos 65
7. Detección de los plásmidos que contienen secuencias de *S. typhi* 65
8. Detección del fragmento que contiene secuencias homólogas a ompC de *E. coli* 66

VII. DISCUSION 76

VIII. BIBLIOGRAFIA 84

PRINCIPALES ABREVIATURAS.

APS	persulfato de amonio
ATP	adenosin trifosfato
cpm	cuentas por minuto
dATP	deoxiadenosina trifosfato
dCTP	deoxicitosina trifosfato
dGTP	deoxiguanosina trifosfato
DL50	dosis letal al 50%
DNAasa	desoxirribonucleasa
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl) 1-piperazin- etano-sulfónico
i. p.	intraperitoneal
IPTG	isopropil-B-D-tiogalactósido
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
KDO	ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulónico
LPS	lipopolisacarido
Omp	proteínas de membrana externa
omp	genes que codifican para proteínas de membrana externa
PBS	amortiguador de fosfatos-salina
Pho E	Omp inducible a concentraciones bajas de fosfatos
PME	proteínas de membrana externa
PNC	papel de nitrocelulosa
RNAsa	ribonucleasa

SDS dodecil sulfato de sodio

SUS-PAGE electroforesis en geles de poliacrilamida
 con dodecil sulfato de sodio

SSC sal y citrato de sodio

STE sal-tris-EDTA

TE tris-EDTA

TBE tris-boratos-EDTA

TEMED N, N, N', N'-tetrametiletilen diamino

Tris tris-(hidroximetil)-aminometano

u. v. ultravioleta

INDICE DE FIGURAS

- Fig 1. Envoltura celular de las bacterias gram-negativas. 19
- Fig 2. Perfil cromatografico de exclusion molecular de
proteinas de membrana externa de *S. typhi*. 31
- Fig 3. Analisis electroforetico de preparaciones de
porinas de *S. typhi*. 52
- Fig 4. Electroforesis en segunda dimension de porinas
de membrana externa. 53
- Fig 5. Reactividad de suero de conejo inmune anti-PME
de *S. typhi* hacia porinas. 54
- Fig 6. Proteccion activa en ratones NIH inmunizados con
porinas de *S. typhi* 9,12,VI:d al reto con
la cepa homologa. 55
- Fig 7. Proteccion activa en ratones NIH inmunizados con
porinas de *S. typhi* 9,12,VI:d al reto con
S. typhimurium. 56
- Fig 8. Cinetica de sobrevivencia al reto con 20 DL₅₀ y
500 DL₅₀ de *S. typhi*. 57
- Fig 9. Cinetica de sobrevivencia al reto con 20 DL₅₀ y
500 DL₅₀ de *S. typhimurium*. 58
- Fig 10. Patrones electroforeticos de restriccion de DNA
genomico de *S. typhi* 9,12,VI:d. 60
- Fig 11. Liberacion del gen *ompC* de *E. coli* del
plasmido pTU-*ompC*. 61
- Fig 12. Analisis tipo Southern para la deteccion del
gen de *OmpC* de *S. typhi*. 62

- Fig 13. Localización y extracción del inserto de DNA de *S. typhi* a clonar en plásmidos. 67
- Fig 14. Electroforesis en gel de agarosa de los vectores de clonación plasmídicos. 68
- Fig 15. Mapa físico de los plásmidos pUR 290-pUR 292. 69
- Fig 16. Tamizaje de la genoteca de DNA de *S. typhi* contra oligonucleótidos homólogos. 70
- Fig 17. Hibridación de plásmidos del banco de genes con DNA total de *S. typhi*. 71
- Fig 18. Detección de plásmidos que contienen secuencias de *S. typhi*. 72
- Fig 19. Selección del candidato del gen "putativo" de OmpC de *S. typhi*. 73
- Fig 20. Detección del fragmento que contiene secuencias homólogas a ompC de *E. coli* en la clona candidato. 74
- Fig 21. Hibridación del plásmido candidato con el oligonucleótido de 37 bases de *S. typhi*. 75

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Construcción del banco de DNA de *S. typhi*. Transformantes obtenidas. 64

RESUMEN

La participación de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d en el desencadenamiento de una respuesta inmune fue evaluada *in vivo*. Las porinas se extrajeron de la membrana externa de la bacteria y se utilizaron en ensayos de protección activa empleando un modelo murino.

La inmunización de ratones NIH con dosis de 5 µg de porinas indujo protección hasta del 80% al reto con 500 DL₅₀ de *S. typhi* 9,12,Vi:d.

Con el propósito de purificar cada una de las porinas, haciendo uso de tecnología de DNA recombinante, se procedió a detectar el gen que codifica para la porina OmpC. Para localizarlo en el genoma se realizaron ensayos tipo Southern utilizando como sonda el gen ompC de *E. coli*. La sonda reconoció un fragmento de aproximadamente 3 Kb en el DNA restringido con Bgl II, el cual fue utilizado para construir un banco de DNA en los vectores plasmídicos pUR 290, pUR 291 y pUR 292. Para aislar plásmidos recombinantes que pudieran contener el gen ompC se hizo uso de sondas de DNA total de *S. typhi* y el gen ompC de *E. coli*. Finalmente, el DNA de los "candidatos" se restringió y con un oligonucleótido sintético de ompC de *S. typhi* se localizó un fragmento de aproximadamente 2 Kb, que se piensa corresponde a un gen (o parte de él) que codifica para una porina de *S. typhi*.

GENERALIDADES

Las fiebres entéricas continúan causando una considerable morbilidad y mortalidad en naciones que aun no han conseguido un buen control microbiológico del agua potable (13,33). En estos países, la causa más frecuente y seria de fiebres entericas es *Salmonella typhi*, agente causal de la fiebre tifoidea (33). Los datos del último censo indican que se presentan aproximadamente 12.5 millones de casos de fiebre tifoidea al año en el mundo (excluyendo China), con una incidencia de 365 casos por cada 100,000 habitantes de la población total y 540 casos por cada 100,000 habitantes de la población de los países en vías de desarrollo. En México, la morbilidad es de 13 casos por cada 100,000 habitantes al año (13).

Los países que reportan casos de tifoidea severos comparten varias características: sus poblaciones y urbanización incrementan rápidamente, procesamiento inadecuado de los desechos humanos, deficiente abastecimiento de agua potable y un gran contacto entre los humanos, alimentos y agua contaminada. Es probable que estos factores permitan que un número considerable de personas se pongan en contacto con grandes inoculos de *S. typhi*, lo que da como resultado un incremento de casos con fiebre tifoidea.

La infección tifoidica se transmite por el agua, que se contamina por la eliminación fecal de *S. typhi* procedente de un enfermo o de un portador. No hay reservorios animales. La capacidad del bacilo tífico para permanecer viable en el suelo, en los depósitos de agua, en las corrientes de aguas contaminadas y en las aguas negras, permite que el agua de bebida, la utilizada para

el riego de hortalizas y la que desemboca en los bancos de mariscos y ostras (las cuales filtran hasta 35 litros de agua al día y concentran eficazmente las bacterias procedentes del drenaje canalizado al mar) conduzca a que las personas que beben esa agua o consumen tales alimentos se infecten con *S. typhi* (41).

Los portadores convalescientes y los crónicos constituyen una fuente importante de contagio, especialmente si son manejadores de alimentos. La eliminación fecal de *S. typhi* puede llegar a ser hasta de 10^{11} bacterias/g de heces. Esto, aunado a la facilidad para contaminar las manos después de la defecación, hacen que un portador pueda producir epidemias de centenares de casos (41).

S. typhi causa un espectro de padecimientos clínicos que incluyen fiebres entéricas, gastroenteritis aguda, ataque al estado general, lesiones ulcerativas del intestino y balance nitrogenado negativo que afectan seriamente al estado nutricional del individuo afectado (41).

La infección es adquirida por ingestión oral del microorganismo. El bacilo presente en los alimentos vence la barrera que supone el jugo gástrico debido a que parte de la acidez es neutralizada por los alimentos y la acción protectora de las secreciones disminuye. Después de atravesar el estómago, los organismos se replican en el intestino delgado y son capaces de penetrar la mucosa intestinal y diseminarse vía las placas de Peyer a la lámina propia y nódulos linfáticos regionales. La bacteremia distribuye al germen en todo el organismo y finalmente ocurre la colonización de las células del sistema retículo endotelial presentes en el bazo, hígado y pulmones. En el término de 24 horas *S. typhi* se encuentra localizada intracelularmente y es relati-

vamente insensible a los antibióticos. Esta capacidad de *S. typhi* para sobrevivir y replicarse intracelularmente parece esencial en su patogénesis (7, 34, 52).

Aunque el curso natural de la infección por *Salmonella* es entendido, muy poco se conoce acerca de las bases moleculares de la patogénesis y virulencia; y su estudio se ha visto limitado debido a que *S. typhi* solo infecta humanos. Esto ha llevado al uso de ratones infectados con *S. typhimurium* como un modelo animal de fiebre tifoidea.

Las investigaciones de la última década se han dirigido primordialmente a dilucidar los factores presentes en el cromosoma o en plásmidos, que permiten la penetración intracelular de *Salmonella* y la sobrevivencia y crecimiento de esta dentro del fagolisosoma del macrófago.

En varias especies de *Salmonella* se ha demostrado que existe un plásmido necesario para causar la infección más allá de las placas de Peyer del intestino, en los nodulos linfáticos mesentéricos y en el bazo (25). Hasta la fecha este tipo de plásmidos no se han estudiado en *S. typhi*.

Algunos genes de virulencia y regiones homólogas han sido localizados en diferentes plásmidos y se ha identificado una región común de virulencia en varias cepas. Gulig y cols (27) clonaron el plásmido en *S. typhimurium* curada de plásmidos e identificaron una región de 14 Kb productora de una proteína de 28 KDa que aumenta la virulencia de la bacteria en ratones, en términos de infección esplénica, después de la inoculación oral (26).

Kawahara y col (40) mostraron que en *S. choleraesuis* la

presencia de un plásmido de 50 Kb esta relacionada a su capacidad de causar bacteremia en ratones, e identificaron como responsable a una región de 6.2 Kb contenida en dicho plásmido.

Jones y col (37) han propuesto que los plásmidos de virulencia están involucrados en la adherencia e invasión de las células de mamíferos, y que estos plásmidos pueden integrarse en el cromosoma bacteriano, lo que evita la expresión del fenotipo de virulencia. Cuando los plásmidos se escinden del cromosoma, se presenta de nuevo la virulencia bacteriana.

Los mecanismos de esta infección invasiva mediada por plásmidos aún no han sido identificados, pero suponen una interacción compleja en la relación hospedero-patógeno. Probablemente el análisis combinado de patogénesis y genética asociada a plásmidos de virulencia identificara nuevos sistemas de virulencia de *Salmonella* (25).

Por otro lado, Jones y col (38) en experimentos de invasividad de *S. typhimurium* a células HeLa encontraron que usando mutantes sin motilidad no se establecía el contacto entre los dos tipos de células; sin embargo, cuando las células HeLa se centrifugaron con las cepas mutantes, se produjo la invasión. Cuando estos experimentos se hicieron con *S. typhi* y células de riñón de perro MDCK no se obtuvo el mismo resultado, lo que sugirió que esta especie bacteriana requiere de motilidad intrínseca para invadir células epiteliales, y que esta no puede ser sustituida por fuerzas mecánicas (46).

Galán y Curtiss III, usando un sistema *in vitro*, aislaron un locus genético, *inv*, que confiere a una cepa no invasiva de *S. typhimurium* la capacidad de penetrar células de cultivo de

tejidos. Así mismo, cepas altamente virulentas con mutaciones inv, fueron incapaces de penetrar las células (19). Estudios posteriores indicaron que la expresión de estos genes de invasión es afectada por cambios en el superenrollamiento del DNA, el cual a su vez es influenciado por la osmolaridad del medio, y sugirieron que esto probablemente represente un mecanismo de regulación de dichos genes (20).

Se han obtenido evidencias que apoyan la hipótesis de que la sobrevivencia de *Salmonella* en macrófagos es un factor primordial en la patogenia del microorganismo; una de ellas es que mutantes por inserción de transposón de *S. typhimurium* que no sobrevivieron intracelularmente en macrófagos cultivados tienen reducida virulencia en ratones (16).

Al respecto, en estudios simultáneos, los grupos de Mekalanos y Heffron demostraron que *S. typhimurium* con mutaciones en el locus regulador *phoP* (responsable de la síntesis de una fosfatasa ácida periplásmica) son avirulentas cuando se inyectan en ratones Balb/c, son incapaces de sobrevivir en macrófagos y extremadamente sensibles a péptidos con actividad antimicrobiana, tales como las defensinas derivadas del huésped. El locus *phoP* está compuesto de dos genes presentes en un operón: *phoP* y *phoQ*, y las secuencias de aminoácidos de los productos genéticos tienen alta homología con otros miembros de reguladores transcripcionales bacterianos de dos componentes que responden a estímulos ambientales, tales como *PhoB* y *OmpR*; por lo que se ha propuesto que existe en *Salmonella* un sistema regulador de 2 componentes *phoP/phoQ* que regula la expresión de genes involucrados en virulencia, que codifican para proteínas de superficie que participan en la resistencia del

microorganismo a factores microbicidas del ambiente (24,51).

Por otro lado, se ha establecido que el lipopolisacárido (LPS), componente importante de la membrana externa, es esencial para la virulencia de *Salmonella*, y que mutantes con defectos en LPS son mucho menos virulentas que sus padres de tipo silvestre.

Estructuralmente el LPS es un complejo macromolecular compuesto de 3 regiones: una región hidrofóbica o lípido A, la región distal, hidrofílica polisacáridica o antígeno O, la cual está expuesta al medio ambiente bacteriano, y la región central o core, que conecta las dos anteriores. Hay evidencias de que cepas mutantes *galE*, que carecen de Ag O pero lo sintetizan parcialmente en medio que contiene galactosa, despiertan una respuesta inmune específica y además son avirulentas (80). Sin embargo, otros hallazgos sugieren que el antígeno O no es esencial para la virulencia y que la respuesta inmune que provoca no es protectora a la infección con la bacteria. Algunas mutantes *galE* de *S. choleraesuis* permanecen tan virulentas como sus padres tipo silvestre (58), y se ha demostrado recientemente que una mutante *galE* de *S. typhi* fue capaz de causar tifoidea en humanos voluntarios (32).

En 1990, Nnalue y col (57) probaron la virulencia de 3 cepas de *S. choleraesuis* deficientes de Ag O inoculadas por varias rutas en ratones Balb/c. Todas ellas fueron tan virulentas como sus ancestros con Ag O cuando se inocularon por vías intraperitoneal e intravenosa, pero fueron avirulentas por la ruta oral. Esto ha llevado a pensar que probablemente el principal papel del LPS en la virulencia es facilitar la sobrevivencia en el tracto gas-

trointestinal.

Recientemente se han identificado proteínas de membrana externa (PME) involucradas en la patogénesis de ciertas bacterias. Las porinas (PHE) de *S. typhimurium* son tóxicas para macrófagos de ratón, y se ha demostrado que concentraciones subtóxicas de porinas reducen la fagocitosis y la muerte intracelular de las bacterias ingeridas (12,76).

Por otro lado, estas proteínas inducen la activación del complemento por la vía clásica y por la vía alterna (22); son capaces de unirse a leucocitos polimorfonucleares de humanos, afectando la integridad de sus membranas y su actividad funcional (77), y parecen tener relación con la adherencia e invasión de las bacterias a células epiteliales.

En 1990, Galdiero mostró que porinas de *S. typhimurium* inyectadas en el cojinete plantar de las ratas inducen un edema cuyo tamaño está en relación con la dosis inoculada (21). La inflamación producida por estas proteínas fue sensible a la acción de drogas antiinflamatorias como la dexametasona. En el mismo trabajo se demostró que las porinas, a concentraciones entre 1 y 10 µg/ml, son capaces de inducir la liberación de histamina en células epiteliales.

Por otro lado, Calderón y col (5) examinaron las propiedades liticas de dos porinas de *S. typhi* y probaron que suspensiones acuosas de agregados de porinas inducen lisis de eritrocitos humanos, efecto que es inhibido con suero anti-porinas, y son capaces de producir canales de permeabilidad iónica sobre membranas artificiales (44). lo cual ha sugerido un probable papel de las PHE como determinantes de patogenicidad.

Las proteínas de membrana externa, particularmente las porinas, son buenos inmunógenos. Dada su localización en la superficie bacteriana (48, 62) (Figura 1) recientemente se han considerado como factores importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora específica y han sido utilizadas en modelos animales para prevenir infecciones por *Haemophilus influenzae*, *S. typhimurium* y otras bacterias gram-negativas (1, 4, 23, 28, 42, 43, 78, 81).

Por lo que respecta al bacilo tífico, se ha demostrado en un modelo murino que las PHE de *S. typhi* inducen protección contra el reto de hasta 1000 dosis letales medias (DL₅₀) de la bacteria virulenta. Además, suero de conejo anti-PHE fue capaz de transferir pasivamente al ratón un estado protector al reto con *S. typhi*, efecto que desapareció cuando el suero fue absorbido con PHE (25). En experimentos de inmunoelectrotransferencia se demostró que este suero reacciona principalmente con las porinas. Por otro lado, los pacientes con fiebre tifoidea generan anticuerpos de clase IgG que reconocen principalmente porinas de *S. typhi*, determinado esto por inmunoelectrotransferencia (6, 61).

Estos resultados sugieren que también en la infección por *S. typhi*, las porinas son blanco importante de la respuesta inmune e indican que la inmunidad humoral dirigida contra porinas juega un papel esencial en la inmunidad contra *S. typhi*, aunque, de hecho, algunos otros mecanismos participan.

Las porinas son proteínas de membrana externa bacterianas, que son expresadas como homotrómeros unidos no covalentemente, capaces de formar poros que están involucrados en la permeabilidad

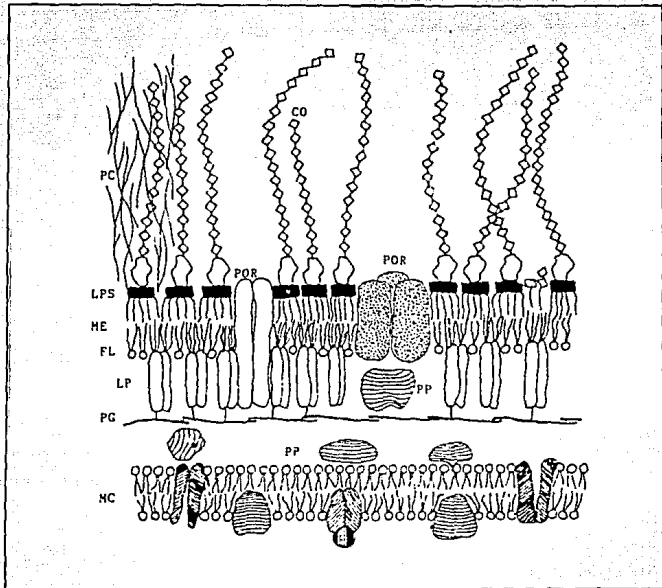


Figura 1. Envoltura celular de las bacterias Gram-negativas.

(ME):membrana externa, (LPS):lipopolisacárido, (FL):fosfolípidos,
 (POR):porinas, (PG):peptidoglicano, (LP):lipoproteína, (PP):
 proteínas periplásmicas, (MC):membrana citoplasmática,
 (PC):polisacárido capsular, (CO):cadenas "O".

de sustancias de bajo peso molecular de naturaleza hidrofílica (56). Estudios recientes hechos por Jap (36), han propuesto que las porinas son poros individuales que se asocian en trimeros, formando una unidad funcional de tres poros; esto se fundamenta en estudios de cristalografía electrónica de la porina PhoE de *E. coli*.

Algunos miembros de la familia de porinas (LamB) funcionan como receptores para fagos (72). Estudios bioquímicos y moleculares indican que hay una extensa homología entre las porinas de bacterias gram-negativas, aunque se han encontrado algunas secuencias de aminoácidos específicas de especie (17,53).

El análisis por espectrometría en la región de infrarrojo y por dicroísmo circular de las unidades monoméricas de porinas de *E. coli*, muestra que ellas tienen una estructura secundaria en forma de hoja β -plegada antiparalela, sin que se observen segmentos en α -hélice (69), por lo que se ha propuesto que deben cruzar varias veces la membrana externa para poder anclarse en ella. De acuerdo a este modelo, las secuencias de aminoácidos expuestas al medio externo deberán ser los receptores para fagos y colicinas (59), y probablemente también de las regiones menos conservadas entre las porinas de diferentes especies bacterianas.

Las porinas de la membrana externa de *E. coli* han sido las más caracterizadas; se han clonado y secuenciado los genes de las 3 porinas principales: OmpC, OmpF y PhoE. OmpF y OmpC son reguladas por la osmolaridad y temperatura del medio de cultivo. OmpC preferencialmente es expresada a alta osmolaridad (NaCl 100-300 mM), mientras que en estas condiciones los niveles de OmpF son muy bajos. PhoE es inducida a bajas concentraciones de iostato, y, en

contraste a los poros de OmpC y OmpF, los poros de PhoE son particularmente eficientes en la incorporación de fosfato inorgánico, compuestos fosforilados y algunos otros solutos cargados negativamente (53, 54, 63). OmpF es catión-selectivo; las propiedades de permeabilidad de OmpC son similares a las de OmpF, excepto que esta forma los poros más pequeños de las tres proteínas.

Además de una cuarta porina, OmpD, *S. typhimurium* contiene las proteínas OmpF, OmpC y PhoE similares a las de *E. coli*, aunque sus poros parecen ser de mayor tamaño (54).

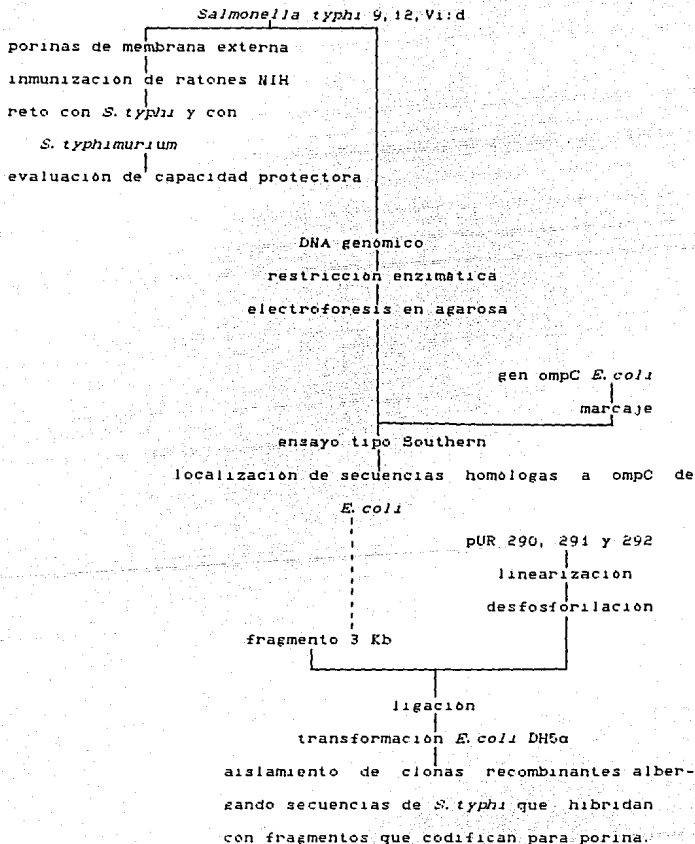
Aún no se ha reportado la caracterización de las propiedades de transporte fisiológico de las porinas de *S. typhi*. Se han aislado y purificado dos porinas, la OmpC y OmpF (5, 65); y en 1988 Venegas y col (79) reportaron la secuencia nucleotídica del gen ompC, el cual presentó una homología del 74% a la secuencia respectiva de *E. coli*, y un 77% de homología a nivel de secuencia de aminoácidos.

Con estos antecedentes, parece muy atractivo explorar en este trabajo el uso potencial de porinas de *S. typhi* en la inducción de inmunidad protectora a la fiebre tifoidea. Así mismo, basados en el hecho de que las bacterias G(-) contienen porinas con características similares a las encontradas en *E. coli*, se ha pretendido identificar y aislar genes de PHE de *S. typhi* haciendo uso de genes de porinas de *E. coli* como sondas heterólogas, para facilitar a futuro el estudio de la participación de estas proteínas recombinantes en la patogénesis de las infecciones por *S. typhi* y en la inducción de respuestas inmunológicas.

OBJETIVOS

1. Evaluar la capacidad de las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d para inducir inmunidad protectora *in vivo* ante el reto de la bacteria homóloga.
2. Detectar en el genoma de *S. typhi* el gen que codifica para la porina de membrana externa OmpC.
3. Aislar el gen ompC de un banco de DNA de *S. typhi* construido en vectores de expresión plasmídicos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y METODOS.

1. CEPAS BACTERIANAS

Salmonella typhimurium: donada por el Instituto Nacional de Higiene.

Salmonella typhi 9,12,V1:d : aislada de un paciente con diagnostico clinico y bacteriológico de fiebre tifoidea.

2. RATONES

Ratones de la cepa abierta NIH, obtenidos de National Institutes of Health, Bethesda; reproducidos y mantenidos en el Instituto Nacional de Higiene.

3. CULTIVO DE BACTERIAS

Salmonella typhi (empleada para la obtención de proteínas de membrana externa y DNA) se creció durante 8 h a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A (fosfato dibásico de potasio 7g/l, fosfato monobásico de potasio 3g/l, citrato de sodio 0.5g/l, sulfato de amonio 1g/l, sulfato de magnesio 0.1g/l) suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon, en fase de crecimiento logarítmico, por centrifugación a 1650 x g durante 15 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

Las cepas bacterianas utilizadas en la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) (*S. typhi* y *S. typhimurium*) se crecieron durante 18 h a 37°C en agar BHI seguido de una resiembra en el mismo medio, las bacterias se cosecharon a las 8 h de cultivo (fase de crecimiento logaritmico).

4. DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA

Los cultivos bacterianos cosechados en la fase de crecimiento logaritmico se ajustaron a una concentración de 10⁹ bacterias/ml (0.6 de D.O. a 540 nm); empleando un factor de dilución constante, a partir de esta suspensión se prepararon las siguientes concentraciones:

<i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d	<i>S. typhimurium</i>
8 000 000 bact/ml	200 000 bact/ml
1 600 000	40 000
320 000	8 000
64 000	1 600
12 800	320
2 560	64

0.5 ml de las bacterias resuspendidas en mucina [mucina gastrica de cerdo (Sigma Co.) al 5% en solución salina esteril] se inocularon por via intraperitoneal a grupos de 10 ratones NIH de 18 a 20 g de peso. Como grupo testigo se emplearon ratones inyectados con 0.5 ml de mucina.

La sobrevivencia de *S. typhi* 9,12,Vi:d se registro tres dias despues de la administracion del inoculo bacteriano, mientras que para *S. typhimurium* se hizo al decimo dia; y la DL₅₀ se determino de acuerdo al metodo de Reed y Muench (68), segun la siguiente formula:

$\text{Log DL}_{50} = \text{log dil } <50\% - (\text{D.P.}) \times \text{log factor de dilucion.}$

en donde:

Log dil <50% = logaritmo de la dilucion inmediata inferior a la dilucion que mata al 50% de la poblacion.

50% - <50%

D. P. = distancia proporcional = -----

>50% - <50%

50% = dilucion de la concentracion que mata al 50% de la poblacion.

<50% = dilucion inmediata inferior a la dilucion que mata al 50% de la poblacion.

>50% = dilucion inmediata superior a la dilucion que mata al 50% de la poblacion.

5. OBTENCION Y PURIFICACION DE PORINAS DE *S. typhi*

La obtencion de porinas se efectuó empleando el metodo descrito por NiKaido (55). Las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logaritmico se ajustaron a una densidad optica de 1.0 a 660 nm. A la suspension bacteriana se le adicionó DNasa y RNasa (20 µl/ml) y dos gotas de MgCl₂ por cada 10 ml. Posteriormente las celulas se rompieron por sonicacion (Lab line Ultratip Lab-sonic system sonicator) en periodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad optica a 0.3. Seguido a la eli-

minación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 g, 15 min. la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 100 000 g, 30 min a 20°C, esta se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de SDS al 2%, se incubó 30 min a 32°C y se ultracentrifugo nuevamente. El sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente y por ultracentrifugación se obtuvo la peptidoglicana, las proteínas unidas a ella se extrajeron incubando dos horas a 37°C en Tris 50 mM, pH 7.7, adicionado de SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y β -mercaptoetanol al 0.05%. Después de ultracentrifugar a 100 000 g, 30 min a 25°C, el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 40 ml/h. Se recuperó la fracción que eluye inmediatamente después del volumen de exclusión (V_0), detectada por absorbancia a 280 nm.

6. CUANTIFICACION DE PROTEINAS

La determinación del contenido de proteínas en las preparaciones de porinas se realizó de acuerdo al método de Lowry (47) que consiste en hacer reaccionar a la proteína con el cobre en medio alcalino formando un complejo colorido, cuya intensidad de incremento al agregarse el reactivo de Folin-Ciocalteau. Como proteína de referencia se empleó albumina serica bovina (Sigma Co.).

7. CUANTIFICACION DE LIPOPOLISACARIDO

La cantidad de LPS contenido en las preparaciones de porinas se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de

ácido 2-ceto-3-manooctulónico (KDO) de acuerdo al método de Karhanis (39), empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.). El método consiste en el tratamiento de la muestra problema con ácido sulfúrico 0.2 N a 100°C durante 30 minutos para liberar el LPS, posteriormente se hace reaccionar con ácido peryódico, arsenito de sodio y ácido tiobarbitúrico. El compuesto colorido (rojo-café) que se forma se mantiene a temperatura ambiente y en solución agregando dimetilsulfoxido. La intensidad del color se determina a 548 nm.

8. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en cámaras verticales con geles de 16 x 14 cm (LKB Instruments), en presencia de dodecil sulfato de sodio, en condiciones reductoras y sistema de amortiguador discontinuo, según la técnica descrita por Laemmli (45). El gel introductor contenía una concentración final de 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8; el gel separador contenía una concentración de 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en Tris-HCl 0.35 M a pH 8.8. Previo al análisis electroforético, las muestras de proteínas se precipitaron durante 12 horas a -20°C con acetona (1 volumen de proteína + 6 volúmenes de acetona), posteriormente se centrifugaron a 420 g por 30 min, y el precipitado se resuspendió en amortiguador de muestra (Tris 0.125M pH6.8, SDS al 2%, βmercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%), se calentó a 96°C durante 5 minutos y se procedió al corrimiento electroforético a 20 miliamperes por placa durante 6 horas a una temperatura de 10°C, empleando como amortiguador de

corrimento Tris 0.025M pH 8.3, glicina 0.192M, SDS al 0.1%. Concluida la electroforesis, los geles se fijaron 30 minutos y se tñieron durante una hora con azul de Coomassie R 250 al 0.25% en metanol-ac. acetico-agua 45:10:45. La decoloracion (metanol-ac. acetico-agua 5:10:85) se efectuó hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas.

9. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional para analisis de la preparacion de porinas se realizo de acuerdo al metodo descrito por O'Farrell (60). Los geles en primera dimension (resolucion de proteinas en base a la carga neta) se precorrieron durante 15 min a 200 V, 30 min a 300 V y 60 min a 400 V, en un equipo BRL Life Technologies, despues de lo cual las muestras de porinas se colocaron (1 mg/gel) y los geles se corrieron a 400 V durante 20 horas, con un gradiente de pH de 3 a 10. Una vez terminada la corrida, un gel en tubo se colocó horizontalmente sobre la region introductora de un gel para electroforesis vertical previamente preparado y se corrio, (2a. dimension, resolucion en base a peso molecular) a 50 V el gel concentrador y a 100 V el gel separador. Finalmente, el gel se sometio a tincion con azul de Coomassie R 250.

10. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

La electrotransferencia de porinas de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC) se llevo a cabo durante 1 h a 400 mA en un equipo Transphor (LKB Instruments). Se empleo como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 20%

en Tris 20 mM pH 8.3, según lo descrito por Towbin (75). Transcurrido este tiempo y para comprobar que la transferencia se llevo a cabo, el PNC se tiñó con rojo de Ponceau al 0.1%. Después de lavar con PBS-Tween 0.1% hasta que desaparecieron las bandas, el papel se introdujo en solución de bloqueo (gelatina al 1.5% en PBS (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M pH 7.2)) durante 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS), el PNC se incubó 3 h a temperatura ambiente con suero de conejo anti-PME o con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-porina de *S. typhi*; se lavó 4 veces con PBS-T y se incubó 1.5 h a temperatura ambiente con la dilución óptima de antisuero de cabra conjugado a peroxidasa (anti-Ig(s) de conejo o anti-Ig(s) de ratón (Cappel Lab.)). Una vez pasado el tiempo de incubación, se lavó dos veces con PBS-T y 2 veces con PBS para finalmente colocarlo durante 20 min en la solución del sustrato (4-cloro-2-naftol 2mM, H₂O₂ al 0.04% en PBS), eliminándose el exceso con agua destilada.

11. MODELO MURINO DE PROTECCION ACTIVA CON PORINAS DE *Salmonella typhi* 9, 12, VI: d

Para evaluar la capacidad de las porinas para inducir inmunidad activa en el modelo experimental murino (74), se emplearon grupos de 10 ratones NIH de 13 a 15 g de peso, los cuales se inmunizaron y retaron por vía i. p., de acuerdo al siguiente esquema:

Dia	Inmunizacion porinas (μ g)	*Reto DL50
0	2.5, 5, 10, 30	
15	2.5, 5, 10, 30	
25		20,500

* Cepas de reto : *S. typhi* 9,12,Vi:d y *S. typhimurium*, resuspendidas en mucina al 5% en solución salina estéril.

Grupos testigo: ratones inmunizados con mucina al 5% en solución salina estéril y Tris 50mM-EDTA 5mM pH 7.4

El grado de protección se evaluó como la sobrevivencia a los 10 días del reto.

12. OBTENCION DE DNA DE *Salmonella typhi*

El DNA cromosomal de *S. typhi* se extrajo siguiendo el metodo descrito por Owen (64).

Se obtuvo una pastilla celular de *S. typhi* por centrifugación del caldo nutritivo en óptimas condiciones de crecimiento (8 horas); se hizo un lavado a esta pastilla con SE IX (NaCl 150 mM, EDTA 100 mM) pH 8, despues del cual se resuspendió en STE (NaCl 150 mM, EDTA 15 mM, Tris-Cl 60 mM pH 8.3), se agregó RNAasa a una concentración final de 50 μ g/ml y SDE a una concentración final del 1%. La mezcla se incubo a 37°C durante 30 minutos. En

seguida se añadió Proteinasa K a una concentración de 50 µg/ml con agitación suave y se reincubó 30 minutos a 37°C. El DNA se extrajo agregando a la suspensión un volumen equivalente de cloroformo. Después de mezclar perfectamente la muestra se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. Se tomó la fase superior acuosa y se mezcló con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNA, el cual se recuperó en forma de hilos con un gancho de vidrio, se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó reposar por un lapso de 5 minutos y finalmente se resuspendió en un volumen de TE (Tris-Cl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

13. PURIFICACION DE DNA DE *Salmonella typhi*

El DNA se purificó utilizando gradientes de cloruro de cesio en rotores verticales (82) y se visualizó utilizando como colorante fluorescente Hoeschst 33258 (50), el protocolo utilizado fue: a 3 ml de DNA disuelto en TE se le añadieron 3 g de cloruro de cesio, se resuspendió bien y se añadieron 150 µl de una solución de colorante Hoeschst (200 µg/ml en agua); los tubos se equilibraron en balanza semianalítica con cloruro de cesio 1 mg/ml y se centrifugaron en el rotor vertical 50 Ti a 40000 rpm durante 30 horas. Al término de la corrida se visualizó el DNA utilizando luz UV y se extrajo con una aguja. El colorante fue eliminado del DNA mediante varias extracciones con volúmenes iguales de butanol saturado con TE y la fase acuosa se dializó contra TE durante 24 horas a 4°C. Finalmente se recuperó el DNA de las bolsas de diálisis y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.5 volumen de acetato de amonio, se lavó con etanol al 70%, se resuspendió en TE y se cuantificó.

14. CUANTIFICACION DE DNA

La cuantificación del DNA se hizo a través de determinaciones espectrofotométricas. Las lecturas a 260 nm permiten calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una densidad óptica de 1 correlaciona aproximadamente con 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de doble cadena, 40 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de cadena simple y RNA y 20 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótidos. La proporción entre las lecturas a 260 nm y 280 nm da un estimado de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de DNA tienen D.O. 260/D.O. 280 de 1.8 (49), garantizándose así que las enzimas específicas que se usan en la manipulación del DNA, tales como las de restricción, las ligasas, etc. puedan actuar eficientemente sobre él.

15. FRACCIONAMIENTO DEL DNA

El DNA de *S. typhi* purificado y cuantificado se fracciona con diversas enzimas de restricción, según el siguiente protocolo:

DNA	Enzima	Buffer, 10X	Agua dest.	Vol. final
3 μg , 10 μl	EcoRI 20U	#2, 3 μl	16 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	HindIII 20U	#2, 3 μl	16 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	KpnI 20U	#1, 3 μl	13 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	Sau3A 20U	#2, 3 μl	12 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	BglII 20U	#2, 3 μl	15 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	PstI 20U	#2, 3 μl	16 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	SalI 20U	#3, 3 μl	15 μl	30 μl
3 μg , 10 μl	SmaI 20U	#1, 3 μl	15 μl	30 μl

en donde el buffer de reacción:

- #1: Tris 6mM pH 7.5, MgCl₂ 6mM
 #2: NaCl 100mM, Tris 10mM pH 7.4, MgCl₂ 10mM
 #3: NaCl 150mM, Tris 6mM pH 7.9, MgCl₂ 6mM

Todas las restricciones se llevaron a cabo a 37°C, durante un tiempo aproximado de 4 horas, excepto la digestión con Sau3A, que fue de 3 minutos. Al término de este tiempo las reacciones enzimáticas se detuvieron colocando los tubos viales sobre hielo y agregando a cada uno 3 µl de EDTA 0.5 M.

10 µl de cada mezcla de reacción se prepararon con buffer de muestra (glicerol al 2%, azul de bromofenol al 0.005%) y se corrieron en geles de agarosa al 0.85% en TBE (Tris-borato 0.09 M, EDTA 0.002 M), conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 20µg/100ml. Como testigo de corrimiento y marcador de tamaño se utilizó DNA de fago lambda digerido con HindIII.

El corrimiento se realizó a 100 V durante una hora en TBE, en un equipo de electroforesis horizontal Owl Scientific Plastics, Inc. Después de ello, los fragmentos de DNA se visualizaron bajo luz U.V., ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases de la molécula del DNA y da a éste una fluorescencia naranja cuando se irradia con una fuente de luz UV de longitud de onda corta.

16. PREPARACION DE UNA SONDA CONSTITUIDA DE DNA DE *ompC* DE *E.*

coli

16.1 EXTRACCION DE DNA PLASMIDICO pTU-ompC

Una colonia de *E. coli* M15F, que alberga el plásmido pMY111 (53), en el cual ha sido clonado el gen *ompC* de *E. coli* (donado por el Dr. Ulf Henning y llamado pTU-ompC), se creció en 5

ml de medio Luria (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7.0), 16 horas a 37°C, enseguida se inocularon 2.5 ml de este cultivo en 250 ml de medio, después de 8 horas de crecimiento a 37°C se añadieron 625 µl de Cloramfenicol (68 mg/ml) y se incubó el cultivo 15 horas más a 37°C para inducir la replicación del plásmido. El cultivo se centrifugó a 10000 rpm, 10 minutos a 4°C en un rotor SS34 Sorvall y la pastilla obtenida se resuspendió en 10 ml de una solución que contenía glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8 y una concentración final de lisozima de 5 mg/ml, y se incubó 5 min en hielo para permitir la degradación de la pared celular; después de esto se añadieron 20 ml de una solución que contenía NaOH 0.2 M y 1% de SDS y se incubó 5 min en hielo hasta lograr una solución clara que indica la lisis de los protoplastos. La precipitación del DNA celular se indujo con 16 ml de acetato de potasio 5M pH 4.7-5.0, se incubó 15 min en hielo y se centrifugó a 10000 rpm, durante 20 min, a 4°C; el sobrenadante se decantó a través de un filtro de gasa y la pastilla con el DNA celular se desechó. Al sobrenadante filtrado, que contiene el DNA plasmídico, se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó en hielo seco-etanol durante 15 min, se centrifugó a 12000 rpm a 4°C, 30 minutos, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla al vacío, la cual se resuspendió en 3 ml de TE. A este volumen se añadieron 150 µl de RNasaA (1mg/ml) y 7.5 µl de proteinasa K (20mg/ml), incubándose 2 horas a 37°C, después de lo cual el DNA se precipitó con 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol; finalmente se le hicieron 2 lavados con etanol al 70%. Una vez seca la pastilla, se resuspendió en 600 µl de TE y se cuantificó.

16.2 OBTENCION DEL GEN *ompC* DE *E. coli*

Debido a que el fragmento de DNA que contiene el gen *ompC* de *E. coli*, el cual sera utilizado como sonda para localizar el gen del mismo nombre en el genoma de *S. typhi*, se encuentra flanqueado en el vector pMY111 por los sitios de restriccion Kpn I y Hind III, 10 µg de DNA plasmidico fueron digeridos con 30 U de la enzima Kpn I toda la noche a 37°C y posteriormente con 30 U de la enzima Hind III, 3 horas, a 37°C. El DNA plasmidico se separo del inserto en un gel horizontal de agarosa al 0.8% (que contenia bromuro de etidio al 0.01%). La electroforesis se corrio a 40 volts durante 3 horas y al terminar, el segmento de DNA de aproximadamente 1.2 Kb fue extraido del gel de la siguiente manera: se hizo una incision con una navaja arriba de la banda a extraer y otra incision justo bajo la banda. Se colocaron 2 cuadritos de papel de DEAE-celulosa NA-41 en las incisiones, procurando sacar cualquier burbuja y pegando firmemente el gel. El papel NA-41 previamente se habia tratado 10 min con EDTA 10mM pH 7.6 y 5 min con NaOH 0.5 M, se habia lavado 10 veces con agua hasta la neutralidad y permanecia almacenado en TE 1X.

Se reinicio la corrida hasta que la banda ingreso en el papel inferior. Se recupero el trozo de papel y se lavo con agua bidestilada fria, se colocó en un tubo y se eluyó el DNA con 400-700 µl de Tris-HCl 20mM pH 7.5, EDTA 1mM, NaCl 1.5 M, incubando a 37°C, 2 horas, con agitacion ocasional. Al DNA se le hizo una extraccion fenolica, una con fenol-cloroformo 1:1 y una con cloroformo. Finalmente se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto frio. La mezcla se enfrió en hielo 20 min y se centrifugó en frio durante 15 minutos. El botón se lavo

con etanol al 70% dos veces, se secó, se resuspendió en un pequeño volumen de TE, se marcó con ^{32}P y fue utilizado como sonda en los ensayos tipo Southern.

16.3 RADIOMARCAJE DE DNA POR EL METODO DE MARCAJE AL AZAR (RANDOM PRIMER)

Feinberg y Vogelstein (15) introdujeron el método de marcaje de fragmentos de DNA utilizando hexanucleótidos de secuencias al azar que se unen al DNA desnaturalizado para iniciar a partir de este punto la síntesis de la nueva cadena de DNA. Este método utiliza el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I para incorporar los nucleótidos marcados en la nueva cadena de DNA. El protocolo que se utilizó para marcar el gene *ompC* de *E. coli* que se usaría como sonda fue: 25 a 50 ng de DNA purificado se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 10 minutos. Al término de este tiempo se le añadieron los deoxinucleótidos dATP, dGTP y dTTP a una concentración final de 10mM, hexadeoxiribonucleótidos en solución, 5 μl de dCTP marcado con ^{32}P (50 μCi), y agua destilada hasta 49 μl . Finalmente se adicionó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa y la reacción se incubó a 37°C durante 3 horas.

Este protocolo también fue utilizado para marcar radiativamente DNA total de *S. typhi* y oligonucleótidos sintéticos de *ompC* de *S. typhi* utilizados como sondas para rastrear el banco de genes.

16.4 SEPARACION DEL DNA MARCADO RADIATIVAMENTE DE LOS DEOXINUCLEOTIDOS NO INCORPORADOS

La eliminación de precursores radiativos ayuda a reducir

problemas de unión inespecífica en experimentos de hibridación. La técnica más comúnmente empleada es filtración en gel, la cual separa DNA y dNTPs de acuerdo a su peso molecular. Una jeringa de un ml se cargó con un ml de resina Sephadex G-50; la resina se equilibró lavando 3 veces con 100 μ l de solución amortiguadora STE (Tris-Cl 10 mM pH 7.8, EDTA 1 mM, NaCl 0.1M) a 3000 rpm durante 3 minutos. La muestra de DNA radiactivo se llevó a un volumen final de 150 μ l y se pasó a través de esta columna. El DNA marcado fue recuperado en un tubo eppendorf y los nucleótidos no incorporados quedaron retenidos en la columna. La cantidad de cpm en un μ l de DNA eluido fue estimada en un contador de radiaciones β .

El mismo protocolo fue utilizado en la separación de DNA total de *S. typhi* marcado. Cuando oligonucleótidos de ompC de *S. typhi* fueron marcados, la separación de los deoxi-nucleótidos no incorporados se hizo a través de una columna de acrilamida Bio-gel P-2.

17. DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS EN FRAGMENTOS DE DNA SEPARADOS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (SOUTHERN)

Se digirieron 3 μ g de DNA total de *S. typhi* con las endonucleasas de restricción Eco RI, Hind III, Kpn I, Sau 3A, Bgl II, Pst I, Sal I y Sma I. Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa al 0.8 % como se ha descrito anteriormente. Después de tomar la fotografía del gel, este se trató con HCl 0.25 N durante 15 minutos, enseguida con una solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) durante una hora, cambiando la solución a los 30 min, y por último se le hicieron 3 lavados de 30 min con una solución neutralizante que contenía NaCl 1.5 M y Tris 1M pH 8. El gel

se lavó con agua y el DNA se transfirió a papel de nylon de acuerdo a la técnica descrita por Southern (73). Al término de 12 horas el gel se puso en contacto con bromuro de etidio 0.01% para verificar la transferencia y la membrana se horneó al vacío a 80°C durante dos horas. Las membranas se prehibridaron 24 horas con una solución que contenía SSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M) 6X, solución Denhardt's 5X, SDS 0.5%, formamida al 30% y DNA desnaturizado de esperma de salmón a una concentración final de 100 µg/ml. Posteriormente las membranas se hibridaron a 42°C durante 24 horas en un equipo de hibridación rotatoria (Bachofar Laboratories) con una solución que contenía SSC 6X, formamida al 30%, EDTA 0.01 M, dextran sulfato al 10%, solución Denhardt's 1X, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml y el gen *ompC* de *E. coli*, previamente marcado con ^{32}P -dCTP (2×10^6 cpm/ml de solución). El nylon se lavó dos veces con una solución de SSC 3X, SDS 0.1% a 42°C y dos veces con SSC 0.1X, SDS 0.1% a 65°C para eliminar la sonda que se unió inespecíficamente. Finalmente la membrana se puso en contacto con una placa autorradiográfica a -20°C durante 16 horas, al término de las cuales se reveló.

Cuando se utilizó como sonda el DNA total de *S. typhi* las condiciones del sistema fueron las mismas. Sin embargo, cuando el Southern se hizo utilizando como sondas oligonucleótidos de *ompC* de *S. typhi*, las condiciones ideales de hibridación fueron: 72 horas a 48°C y 3×10^6 cpm/ml de solución. Los lavados del papel nylon se hicieron para este caso a menor astringencia: 20 min con SSC 6X, SDS 0.1%, a temperatura ambiente, y 15 minutos a 37°C.

18. PREPARACION DE LOS VECTORES DE CLONACION pUR 290-292

18.1 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS PLASMIDOS

Los plásmidos pUR 290, pUR 291 y pUR 292 (5200pb) (70) son vectores de expresión de proteínas de fusión. Son miembros de una familia de plásmidos que contienen el gen *lacZ* transcrito por el promotor *lac UV5*. En una cepa *lac I^q*, la transcripción del gen *lacZ* del promotor *UV5* es reprimido, pero es dereprimido cuando se adicionan al medio lactosa o IPTG. Los fragmentos de DNA que contienen secuencias codificadoras pueden ser insertados en el multisito de clonación localizado al final del gen *lacZ*. La derepresión del promotor *UV5* causa expresión de la proteína de fusión resultante, la cual puede ser entonces purificada.

El DNA de los plásmidos pUR 290, pUR 291 y pUR 292 (utilizados como vectores de clonación del banco de genes de *S. typhi*) se extrajo de acuerdo a la técnica descrita anteriormente para pMY 111, es decir, a través de la propagación en presencia de clo-ramfenicol y la lisis alcalina. Una vez que el DNA estuvo resuspendido en TE, se le hizo una extracción fenólica (vol:vol), una con fenol-cloroformo 1:1 y una con cloroformo, se precipitó el DNA con etanol absoluto, se lavó con etanol al 70%, se resuspendió en TE y se pasó la muestra a través de una columna de Sepharosa 4B previamente equilibrada con STE, amortiguador que se utilizó también como eluyente. Se recolectaron fracciones de 300 µl en tubos y se corrieron electroforéticamente en agarosa al 0.8%. Las fracciones que contenían DNA se reunieron y se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol; se les dió 2 lavados con etanol al 70% y se cuantificó el DNA presente.

18.2 LINEARIZACION Y DESFOSFORILACION DEL DNA PLASMIDICO

Con el fin de prevenir la autoligación de los plásmidos después de que han sido linearizados, los fosfatos 5' terminales pueden ser liberados del DNA por tratamiento con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) o con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP), la cual tiene la ventaja considerable de que puede ser completamente inactivada por calentamiento a 68°C en SDS.

El DNA de los tres plásmidos PUR fue digerido totalmente con la endonucleasa de restricción Bam HI, para ello, 20 µg de cada plásmido se pusieron en contacto con 30 U de enzima BamHI, durante 3.5 horas a 37°C, en buffer de reacción #2 (descrito anteriormente). Enseguida se les hizo una extracción fenólica para eliminar la enzima y proteínas contaminantes, se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 1/10 volúmenes de acetato de amonio y se resuspendió en Tris-HCl 10 mM. 10 µg de cada plásmido se pusieron en contacto con 1 µl de la enzima CIP y amortiguador CIP 10X en un volumen de 50 µl, incubándose a 37°C por 30 min, al término de los cuales se adicionó una segunda alícuota de CIP y se continuó la incubación por 30 minutos más. Para inactivar la enzima, se adicionaron 40 µl de agua estéril tridestilada y desionizada, 10 µl de STE 10X y 5 µl de SDS al 10%, calentando la mezcla a 68°C por 15 minutos. Se hizo una extracción fenólica y se precipitó el DNA con etanol y acetato de amonio. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

19. PREPARACION DEL INSETO

19.1 EXTRACCION Y PURIFICACION

Se digirieron 20 μ g de DNA genómico de *S. typhi* con 100 U de la endonucleasa de restricción Bgl II durante 18 horas a 37°C. Al finalizar este tiempo, el DNA se corrió en un gel (repartido en varios orificios), que contenía EtBr al 0.01%. El DNA de aproximadamente 3 Kb, correspondiente al fragmento de DNA que hibridó con la sonda de ompC-³²P de *E. coli*, fue extraído del gel. Este fragmento se volvió a correr en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% en TBE. De ahí, la banda de DNA se cortó con una navaja, la agarosa se calentó en un tubo eppendorf a 68°C hasta fundir y se le añadieron 4 volúmenes de TE. La primera extracción del DNA se hizo con un volumen de fenol a temperatura ambiente, centrifugando la mezcla 15 minutos a 12000 rpm, en seguida se extrajo la fase acuosa con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1), centrifugándose 8 minutos a temperatura ambiente, 12000 rpm; la fase acuosa resultante se extrajo con un volumen igual de cloroformo, se centrifugó 3 minutos, a temperatura ambiente, 12000 rpm, al término de lo cual se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto frío; la mezcla se enfrió en hielo 20 minutos y se centrifugó en frío durante 15 min. El botón se lavó con etanol al 70% dos veces, se secó, se resuspendió en un pequeño volumen de TE y se cuantificó el DNA presente.

20. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES DH5 α

Las células que se utilizaron para albergar los plásmidos PUR fueron *E. coli* DH5 α . Esta es una cepa con una alta eficiencia

de transformación, carece de lac Z, y permite ser usada, con una recombinación deficiente, para el crecimiento de plásmidos y cósmidos (29).

Se sembró una asada de *E. coli* DH5 α en una caja de Petri con medio ϕ -a (extracto de levadura 5 g/l, triptona 20 g/l, sulfato de magnesio 5 g/l, agar 14 g/l, pH 7.6), se incubó a 37°C toda la noche y una colonia se inoculó en un cultivo de 5 ml de medio ϕ -b (ϕ -a sin agar), el cultivo se incubó a 37°C hasta que presentó una densidad óptica de 0.3 a 550 nm. Posteriormente se hizo un subcultivo 1:20 en 100 ml de ϕ -b y se creció hasta que la densidad óptica se incrementó a 0.48. El cultivo se colocó en hielo 5 minutos y se centrifugó, 5 minutos, a 4°C, a 3500 rpm (Centrifuga Sorvall #10). Las células se resuspendieron en 40 ml de una solución Tfb 1 (KAc 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glicerol al 15%, pH 5.8) y se incubaron en hielo 5 minutos, se centrifugaron en las condiciones anteriores y se resuspendieron en 4 ml de solución Tfb 2 (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glicerol al 15%, pH 6.5), incubándolas en hielo por un lapso de 15 minutos. Finalmente se hicieron alícuotas de 250 μ l y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

21. CLONACION DEL DNA BACTERIANO. ENSAYOS DE LIGACION.

Una vez linearizados y desfosforilados los vectores independientemente, se hizo una mezcla de ellos en una proporción 1:1:1 y se prosiguió a un ensayo de ligación a los segmentos de DNA de *S. typhi* de 3 Kb provenientes de una digestión del DNA genómico con la endonucleasa Bgl II. En este ensayo se probaron varias proporciones vectores-inserto:

vectores-

BamHI-CIP (μ l)	2 (60ng)	2	2	2	2
inserto 3 Kb (μ l)	0	1 (50ng)	2	3	5
buffer ligasa 5X (μ l)	2	2	2	2	2
agua ddd (μ l)	5	4	3	2	0
T4-DNA-ligasa (μ l)	1 (3U)	1	1	1	1

Los tubos se incubaron a 22°C durante 24 horas y se utilizaron para transformar *E. coli* DH5 α . Se corrieron a la vez los siguientes controles de desfosforilación de vectores, efectividad de ligación y viabilidad de las células:

1. vectores-BamHI-CIP + buffer ligasa 5X + T4-DNA-ligasa
2. vectores-BamHI + buffer ligasa 5X + T4-DNA-ligasa
3. vectores-BamHI-CIP + buffer ligasa 5X
4. vectores-BamHI + buffer ligasa 5X
5. vectores superenrollados
6. *E. coli* DH5 α en Mac B sin ampicilina
7. *E. coli* DH5 α en Mac B-ampicilina

22. TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES DH5 α

Varias alícuotas de células competentes se descongelaron y se mantuvieron 10 minutos en hielo. La transformación fue hecha en tubos eppendorf previamente enfriados en hielo; a cada tubo se adicionaron 50 μ l de bacterias y en seguida el DNA de los tres plasmidos pUR en proporción 1:1:1, recombinado con el DNA de *S. typhi* (1-2 μ l máximo, que contenían alrededor de 25 ng de DNA); la mezcla se incubó en hielo 30 minutos, después de los cuales los

tubos se pasaron a un baño de agua a 42°C durante 90 segundos y se regresaron inmediatamente al hielo 2 minutos más (de acuerdo a la técnica modificada por Hanahan (30)), este choque térmico permitió la incorporación del plásmido al interior de la bacteria. Finalmente se agregaron a los tubos 200 µl de medio ρ -b a temperatura ambiente y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación, permitiendo a la célula ajustar los mecanismos de expresión del nuevo DNA. Estos cultivos se espatularon por duplicado en cajas de Petri con medio Mac B (peptona de gelatina 17 g/l, mezcla de peptonas 3 g/l, lactosa 10 g/l, sales biliares 1.5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 13.5 g/l, rojo neutro 0.03, cristal violeta 0.001, pH 7.1) con ampicilina a 50 µg/ml; en este medio de cultivo sólo aquellas células que sean transformadas crecerán (los plásmidos de la serie pUR contienen el gen de resistencia a ampicilina) y tanto las recombinantes como las no recombinantes producen colonias rojas, ya que en el proceso de recombinación en pUR el operón lac Z no se ve interrumpido (el sitio múltiple de clonación se encuentra al final de λ). A las 18 y 30 horas de cultivo las colonias crecidas se picaron y se ordenaron numericamente.

23. TANIZAJE DE LA GENOTECA DE DNA DE *S. typhi* CONTRA SONDAS DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS

Las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas se crecieron en placas de Mac B-ampicilina a 37°C, 12 horas; las placas se enfriaron a 4°C una hora y sobre las colonias se colocaron membranas de nitrocelulosa, marcando cuidadosamente su posición en la placa; las membranas se retiraron al minuto y se colocaron 3 minutos con las colonias "cara arriba" sobre un filtro Whatman 3MM

remojado en SDS al 10%, enseguida sobre un filtro con NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M durante 5 minutos y finalmente sobre un filtro con NaCl 1.5 M, Tris-Cl 0.5 M pH 8; de acuerdo a lo descrito por Maniatis (62). Después de secar las membranas al aire, se hornearon en vacío a 80°C durante 2 horas y fueron utilizadas para ensayos de hibridación con oligonucleótidos marcados radiactivamente.

Los oligonucleótidos específicos se diseñaron de la siguiente manera: se hizo un alineamiento en computadora de la secuencia nucleotídica del gen *ompC* de *E. coli* con la secuencia correspondiente al gen *ompC* de *S. typhi* y se encontró que las secuencias de las bases 807 a la 825 (19 bases) y 987 a 1023 (37 bases) del gen de *S. typhi* no se encontraban presentes en ese mismo sitio en *E. coli*; se sintetizaron estos 2 oligonucleótidos y se utilizaron como sondas para el rastreo del banco de genes.

24. DETECCIÓN DE LOS PLASMIDOS QUE CONTIENEN SECUENCIAS DE *S. typhi*

Las colonias DH5 α transformadas se crecieron por separado en tubos que contenían 3 ml de medio Luria-ampicilina, durante 12 horas a 37°C. Después de ello, se hicieron minipreparaciones plasmídicas siguiendo la técnica de lisis alcalina descrita por Maniatis (71). Los DNA plasmídicos se corrieron en geles de agarosa 0.85% en TBE, se les transfirió a papel (ensayo tipo Southern) y se hibridaron con una sonda de DNA total de *S. typhi* marcada, para localizar algunos "candidatos" recombinantes. Enseguida, algunos plasmidos fueron digeridos con la enzima EcoRI para liberar el posible inserto clonado, e hibridados contra el gen *ompC* de *E. coli*. Finalmente el candidato identificado se hibridó con

el oligonucleótido sintético de 37 bases del gen ompC de *S. typhi*.

RESULTADOS.

1. PREPARACION DE PORINAS

Las proteínas de membrana externa de *S. typhi* 9,12,V1:d solubles en amortiguador de fuerza iónica elevada fueron fraccionadas por filtración en gel. El perfil de elución es mostrado en la figura 2.

En la membrana, las porinas son expresadas como homotrimeros unidos no covalentemente. Estos polimeros fueron eluidos de la columna de Sephacryl S-200 despues de un volumen de amortiguador de 120 ml. Despues del tratamiento de las muestras con β -mercapto etanol y SDS las moléculas del polimero se disociaron en sus monómeros, como se muestra en el corrimiento electroforético (Figura 3), en el cual pueden apreciarse dos bandas dominantes con pesos moleculares alrededor de 36-40 KDa. La contaminación con otras proteínas de membrana externa fué insignificante. Asi mismo, las porinas purificadas estuvieron libres de LPS (cuantificado a través del contenido de KDO).

Una preparación de PHEs enriquecida en porinas se sometió a electroforesis bidimensional (Figura 4). Las porinas presentaron puntos isoeléctricos semejantes, entre 4.5 y 5.0; y el corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida reveló dos manchas a la altura de 38 KDa.

El ensayo tipo Western con porinas purificadas transferidas a PNC y suero de conejo polivalente anti-PHEs, reveló el reconocimiento único de las proteínas de peso molecular alrededor de 38 KDa, lo cual aseguro que esta preparación se encontraba libre de otras proteínas de membrana (Figura 5).

2. ESTUDIOS DE PROTECCION ACTIVA

La DL₅₀ para *S. typhi* 9,12,Vi:d fue de 2×10^3 bacterias, mientras que para *S. typhimurium* fue de 1×10^2 bacterias.

Los resultados de protección activa inducida por la inmunización con dosis de porinas de *S. typhi* desde 2.5 µg hasta 30 µg son presentados en la figura 6. Puede apreciarse que la inmunización con 5 µg de porinas confiere una protección significativa contra el reto con 20 y 500 DL₅₀ de *S. typhi*, de 100% y 80%, respectivamente, existiendo un efecto dosis-respuesta; lo cual sugiere que existen determinantes antigenicos de porinas expuestos en la superficie de la membrana que son capaces de generar una respuesta inmune protectora contra la bacteria viva.

Cuando el reto fue hecho con *S. typhimurium*, dos dosis de 30 µg de porinas de *S. typhi* confirieron una protección parcial de alrededor del 40% contra 500 DL₅₀ (Figura 7). En ambos experimentos los ratones inoculados i.p. con amortiguador TE (testigos) murieron con 20 DL₅₀ en el mismo día del reto.

Las figuras 8 y 9 revelan las cinéticas de sobrevivencia durante 10 días, de ratones inmunizados con 5 µg de porinas de *S. typhi*. La protección dada por esta dosis de proteínas fue del 80% a 500 DL₅₀ de *S. typhi* y del 100% a un reto de 20 DL₅₀. Para *S. typhimurium*, la sobrevivencia fue del 100% solo durante el día del reto con 500 DL₅₀ y el primer día posterior al reto con 20 DL₅₀; al tercer día la sobrevivencia disminuyó al 0% y al 20% al reto con 500 DL₅₀ y 20 DL₅₀, respectivamente, permaneciendo con esos valores hasta el final del experimento. Estos resultados indican que las porinas contienen inmunogenos capaces de inducir una protección cruzada entre *S. typhi* y *S. typhimurium* en la

etapa temprana de la infección, sugiriendo que los determinantes no compartidos participan en el control de la infección en etapas posteriores.

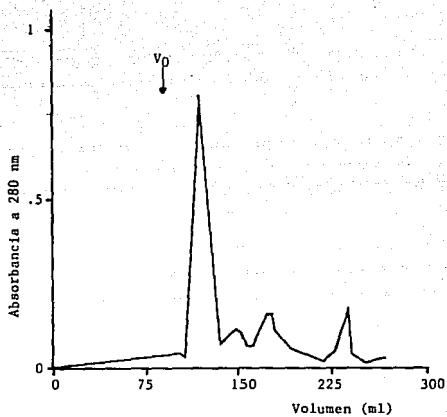


Figura 2. Cromatograma de exclusión molecular en columna de Sephacryl S-200 de PME de *S. typhi* 9, 12, Vi:d.

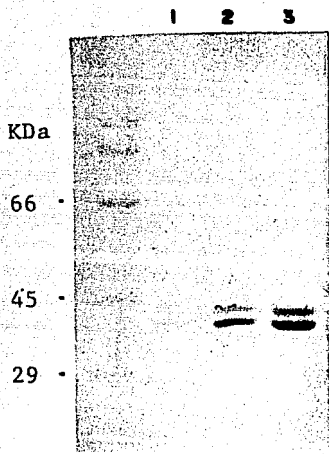


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de porinas de *S. typhi* 9, 12, Vi:d purificadas por cromatografía de exclusión molecular (carriles 1, 2 y 3: 5, 10 y 15 μ g, respectivamente). Tinción de proteínas con azul de Coomassie.

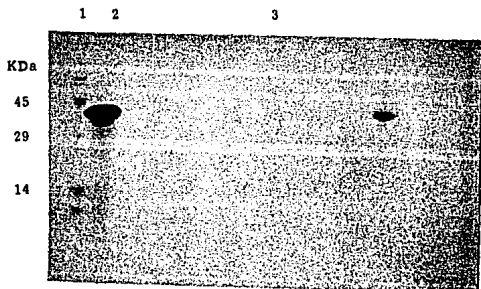


Figura 4. Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida-SDS. Tinción de proteínas con azul de Coomassie. 1 y 2: electroforesis 1-D de marcadores de peso molecular y porinas de *S. typhi*, respectivamente; 3: electroforesis 2-D de porinas de *S. typhi*.

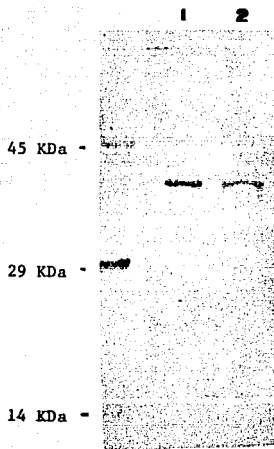


Figura 5. Reactividad de suero de conejo inmune anti-PME de *S. typhi* 9,12,Vi:d a porinas purificadas por exclusión molecular transferidas a PNC.

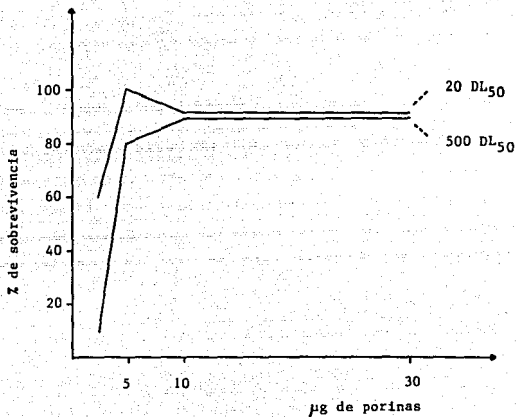


Figura 6. Protección activa en ratones NIH inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d al reto con *S. typhi* 9,12,Vi:d. Los resultados se expresan como el porcentaje de sobrevivencia en un periodo de observación de 10 días.

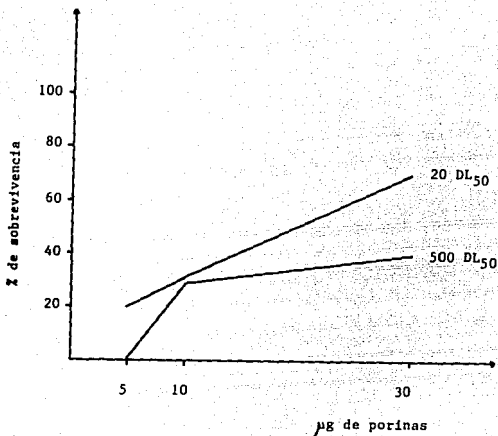


Figura 7. Protección activa en ratones NIH inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12,V1:d al reto con *S. typhimurium*. Los resultados se expresan como el porcentaje de sobrevivencia en un periodo de observación de 10 días.

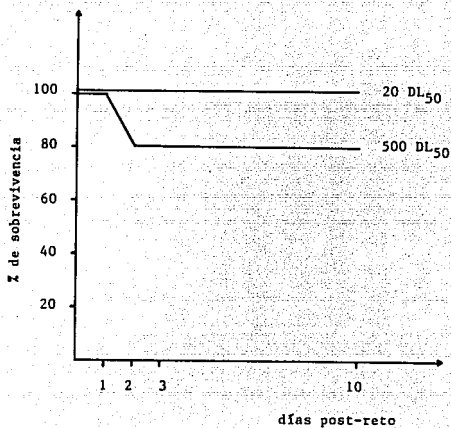


Figura 8. Cinética de sobrevivencia al reto con 20 DL₅₀ y 500 DL₅₀ de *S. typhi*, de ratones inmunizados con 5 µg de porinas de *S. typhi* 9, 12, V1:d.

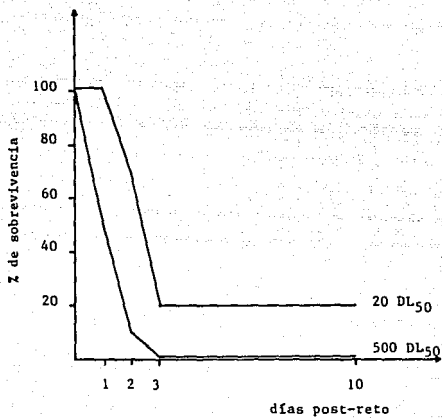


Figura 9. Cinética de sobrevivencia al reto con 20 DL₅₀ y 500 DL₅₀ de *S. typhimurium*, de ratones inmunizados con 5 µg de porinas de *S. typhi* 9.12.V1:d.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE DNA DE *S. typhi*

El DNA de *S. typhi* fue extraído utilizando el método de purificación en gradientes de cloruro de cesio. Las preparaciones tuvieron un alto grado de pureza, determinado por la relación de absorbancias 260/280 nm, que fue de 1.76.

La integridad del DNA obtenido por este método se verificó al correr una electroforesis en geles de agarosa al 0.85% utilizando como marcador DNA de λ /HindIII (Figuras 10a y 10b). Los patrones de restricción del DNA digerido parcialmente con las enzimas EcoRI, HindIII, KpnI, Sau3A, Bgl II, PstI, Sall y SmaI se muestran en las mismas figuras.

4. LOCALIZACION DE SECUENCIAS HOMOLOGAS AL GEN *ompC* DE *E. coli* EN *S. typhi*.

DNA de *S. typhi* transferido a papel nylon (Figuras 10a y 10b) se hibridó con una sonda de DNA de aproximadamente 1.2 Kb purificada del plasmido pTU-ompC, la cual contiene el gen que codifica para la porina OmpC de *E. coli* (Figura 11).

Se detectaron señales positivas de alto peso molecular y también bandas bien definidas en condiciones de alta astringencia (Figuras 12a y 12b) (de aproximadamente 800 y 1500 pb con KpnI, 1300 con EcoRI, 3 Kb con BglII, 3.3 Kb con PstI y 2 Kb con Sall) que contienen el gen o secuencias del gen *ompC*, o de un gen codificante para otra de las porinas. Es importante mencionar que no se obtuvo señal alguna en el carril de testigo negativo (λ /HindIII).

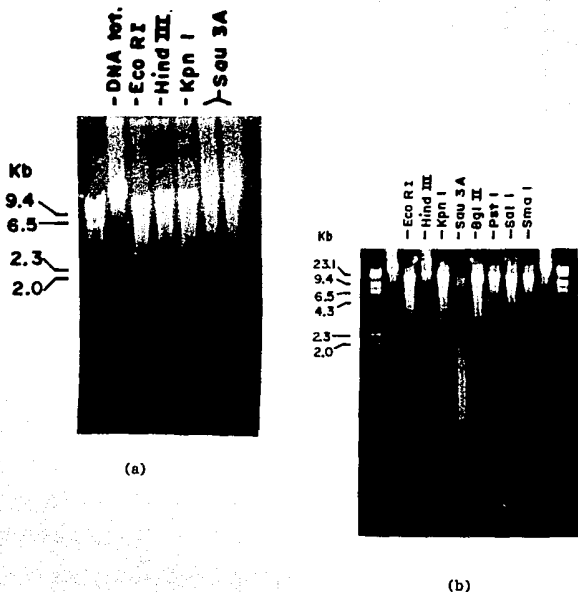
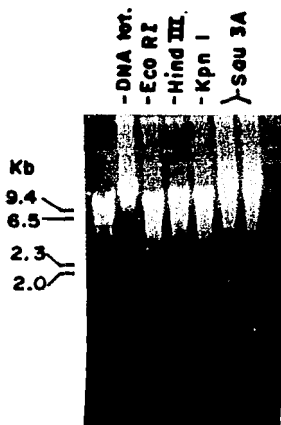
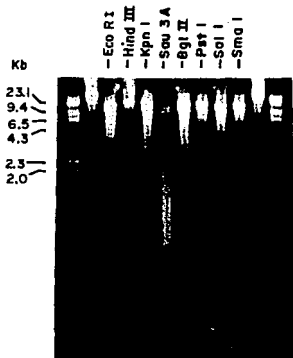


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.85% de (a) DNA de *S. typhi* sin digerir (carril 2) y digerido con varias enzimas (c. 3-7). c. 1: lambda/HindIII. (b) DNA de *S. typhi* sin digerir (c. 2 y 11) y digerido con varias enzimas (c. 3-10). c. 1 y 12: marcadores lambda/HindIII.



(a)



(b)

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.85% de (a) DNA de *S. typhi* sin digerir (carril 2) y digerido con varias enzimas (c. 3-7). c. 1: lambda/HindIII. (b) DNA de *S. typhi* sin digerir (c. 2 y 11) y digerido con varias enzimas (c. 3-10). c. 1 y 12: marcadores lambda/HindIII.

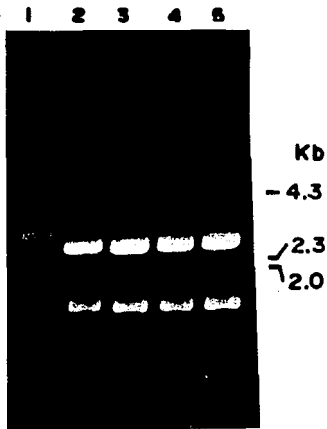
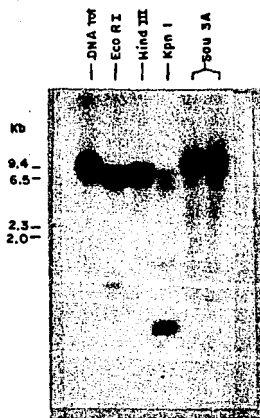
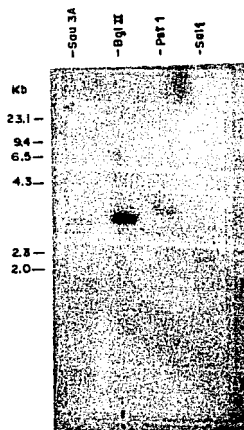


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.85% de DNA de pTU-ompC restringido con KpnI y HindIII (c. 2-5) y sin restringir (c. 1). El fragmento liberado (aprox 1.2 Kb) corresponde al gen ompC de *E. coli*, utilizado como sonda.



(a)



(b)

Figura 12. Hibridación de DNA de *S. typhi*, sin digerir y digerido con varias enzimas, con el gen *ompC* de *E. coli* marcado con ^{32}P . (a) electroforesis fig 10a, (b) electroforesis fig 10b.

5. CONSTRUCCION DE UN BANCO DE DNA

Ya que de la digestión de DNA genómico con la enzima Bgl II resulta un fragmento de 3 Kb que contiene el gen *ompC* completo, el cual tiene un tamaño aproximado de 1.3 Kb (79), se hizo una digestión total "a gran escala" con Bgl II al DNA de *S. typhi* (Figura 13a), se localizó la banda de 3 Kb que hibrida en condiciones de alta astringencia con *ompC* de *E. coli* (figura 13b), se extrajo y se purificó para ser clonada en los vectores plasmídicos pUR 290, pUR 291 y pUR 292, previamente propagados en *E. coli* y purificados como se describió en Materiales y Métodos (Figura 14).

Los plásmidos fueron linearizados por acción enzimática de BamHI en su sitio único de restricción (ver mapa físico plasmídico, Figura 15). Una vez linearizado el DNA se desfosforiló y se ligó al DNA de *S. typhi*, utilizando varias proporciones vectores-inserto. Posteriormente, 2 μ l del volumen de ligación se aplicaron a 50 μ l de la mezcla de bacterias competentes. Las células transformadas se sembraron en placas de Mac B-ampicilina. Aproximadamente a las 30 hs de incubación a 37°C, se contó el número de colonias. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Como se puede apreciar, la relación óptima vectores-inserto fue la de 60 ng-250 ng; con la cual se obtuvieron 229 colonias transformantes, con morfología típica de *E. coli*. Las 25 colonias resultantes de las otras proporciones vectores-inserto ensayadas, también se consideraron parte del banco de genes. Los valores obtenidos en los controles demuestran que hubo una desfosforilación efectiva de vectores, buena ligación y eficiente transformación de las células viables.

Condición de los vectores plasmí- dicos (60 ng).	Cantidad de inserto de <i>S. typhi</i> .	Número de colonias transformantes <i>E. coli</i> : DH5 α
desfosforilados	50 ng	2
desfosforilados	100 ng	10
desfosforilados	150 ng	13
desfosforilados	250 ng	229

controles:		

desfosforilados, sin ligasa	-	0
desfosforilados, con ligasa	-	1
fosforilados, sin ligasa	-	15
fosforilados, con ligasa	-	234
superenrollados	-	incontables
bacterias en MacB-ampicilina		0
bacterias en MacB		tapiz de colonias

Tabla 1. Construcción del banco de DNA de *Salmonella typhi*.

Transformantes obtenidas.

6. RASTREO DEL BANCO DE GENES CON SONDAS DE OLIGONUCLEOTIDOS

Las 254 colonias obtenidas se hibridaron contra los oligonucleótidos "específicos" de ompC de *S. typhi*, ya que, debido a la alta homología reportada entre los genes de porinas de *E. coli* y *S. typhi*, era necesario garantizar que las señales por obtener no fueran falsas positivas por una reacción cruzada. Como puede apreciarse en las figuras representativas 16a y 16b, el objetivo no se alcanzó a través de esta estrategia: todas las colonias dieron reacción positiva después de ser hibridadas a alta astringencia con los oligonucleótidos de 19 y 37 bases.

Tratando de explicar este resultado, se hizo una búsqueda de secuencias de DNA por computadora, y se encontró que algunos segmentos de estos oligonucleótidos estaban presentes en ompC de *E. coli* en posiciones diferentes a las encontradas en ompC de *S. typhi*, y ellos estaban hibridando con la sonda utilizada.

7. DETECCION DE LOS PLASMIDOS QUE CONTIENEN SECUENCIAS DE *S. typhi*.

La alternativa para la selección de candidatos portadores del gen de porina de *S. typhi* fue la búsqueda de insertos de DNA de *S. typhi* en el DNA plasmídico de las clonas bacterianas, de esta manera se descartó la interferencia por el DNA cromosomal de *E. coli*. Se purificaron los plásmidos de las bacterias transformadas y se hibridaron contra DNA total de *S. typhi* marcado con ^{32}P ; algunos de los que dieron señal positiva se muestran en la figura 17. La restricción de estos plásmidos con EcoRI permitió la liberación de alguna secuencia de DNA de *S. typhi* que hubiera sido clonada en el sitio Bam HI del plásmido (ver mapa

físico de los plásmidos).

Como se puede apreciar en la figura 18a, los plásmidos de la clona bacteriana 228 al ser digeridos con EcoRI liberaron un fragmento de DNA de entre 2 y 3 Kb, el cual hibridó, en condiciones de alta astringencia, con DNA total de *S. typhi* (Figura 18b).

B. DETECCIÓN DEL FRAGMENTO QUE CONTIENE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A ompC DE *E. coli*.

El plásmido candidato fue entonces hibridado con el gen ompC de *E. coli*, apreciándose una señal positiva en la región de migración del fragmento liberado después de la restricción con EcoRI (Figura 19).

Este experimento fue realizado varias veces con minipreparaciones plasmídicas de diferentes cultivos de la clona 228, y se obtuvo el mismo resultado (Figuras 20a y 20b), con lo cual se comprobó que el fragmento contenía secuencias homólogas a ompC de *E. coli*.

Finalmente, se ensayó la hibridación de la clona con el oligonucleótido de 37 bases de ompC de *S. typhi*, lo que reveló una franca alineación del DNA del inserto liberado con esta sonda (Figuras 21a y 21b).

Con esto se confirma que este banco de genes de *S. typhi* es funcional, y que al menos la clona bacteriana 228 alberga un plásmido en el que ha sido clonado un fragmento de DNA que contiene presumiblemente el gen de la porina ompC de *S. typhi*.

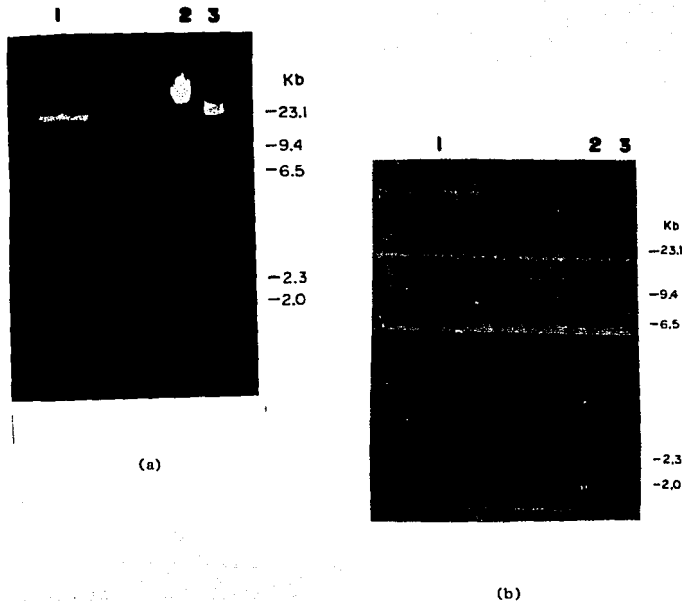


Figura 13: (a) electroforesis en agarosa de DNA de *S. typhi* digerido totalmente con Bgl II (carril 1 doble) y sin digerir (c. 2). c. 3: marcadores lambda/HindIII; (b) hibridacion con el gen *ompC* de *E. coli*.

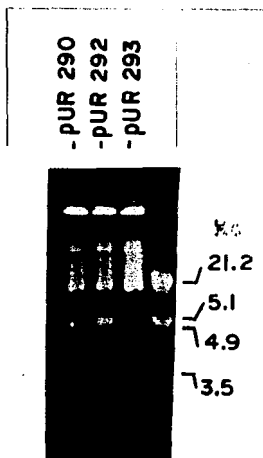


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de DNA purificado de vectores de clonación plasmidicos pUR 290 (c. 1), pUR 291 (c. 2) y pUR 292 (c. 3). c. 4: marcadores λ /HindIII.

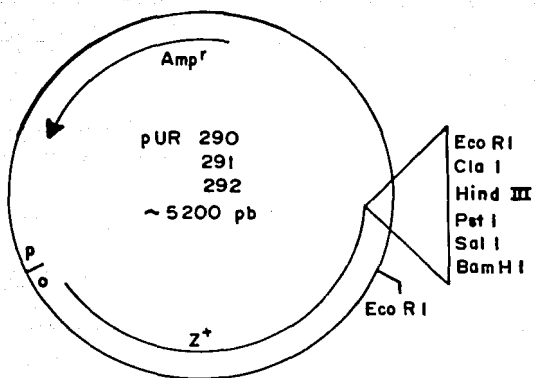
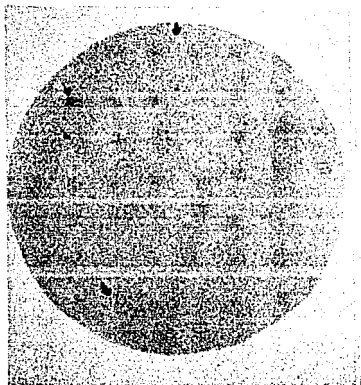
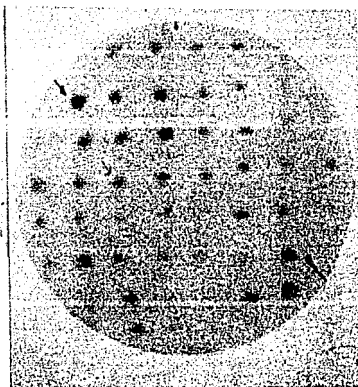


Figura 15. Mapa físico de los plásmidos pUR 290, pUR 291 y pUR 292.



(a)



(b)

Figura 16. Tamizaje de la genoteca de DNA de *S. typhi*.

(a) hibridación *in situ* con oligonucleótido de 19 bases. (b) hibridación *in situ* con oligonucleótido de 37 bases.

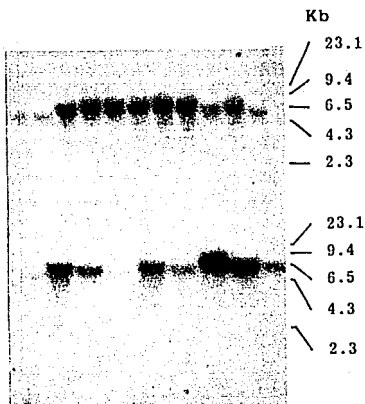
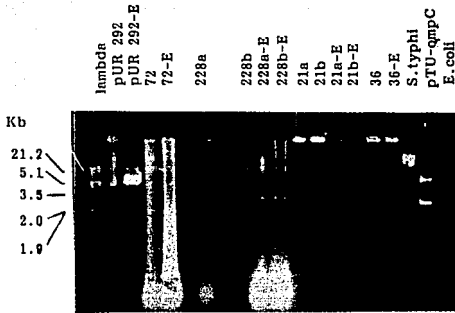
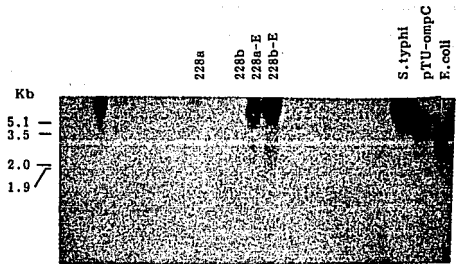


Figura 17. Hibridación de plásmidos del banco de genes con DNA total de *S. typhi*.



(a)



(b)

Figura 18. Detección de plásmidos que contienen secuencias de *S. typhi*. (a) electroforesis en gel de agarosa de plásmidos restringidos con EcoRI. (b) análisis tipo Southern con DNA total de *S. typhi*.^{32p}.

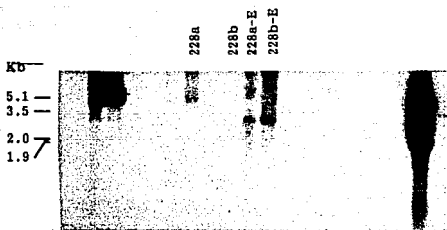
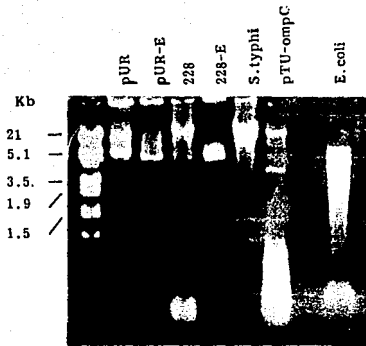
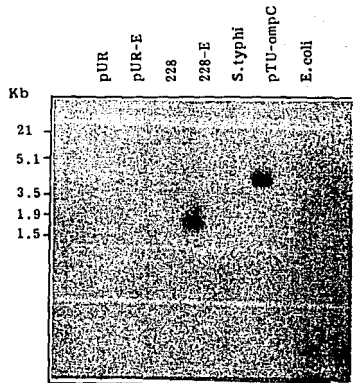


Figura 19. Selección del candidato del gen de OmpC de *S. typhi*.

Ensayo tipo Southern del gel fig. 18a con ^{32}P -ompC de *E. coli*.



(a)



(b)

Figura 20. (a) electroforesis en gel de agarosa de la clona candidato restringida con EcoRI. (b) hibridación con ^{32}P -ompC de *E. coli*.

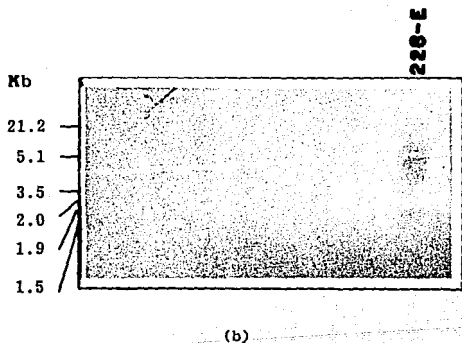
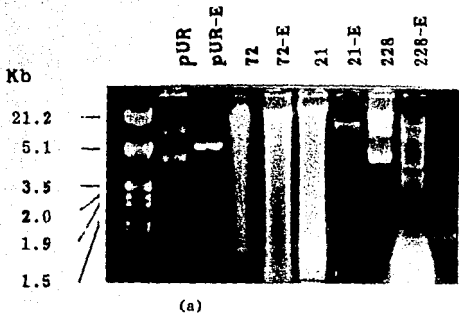


Figura 21. (a) electroforesis en gel de agarosa del plásmido candidato restringido con EcoRI. (b) hibridación con ^{32}P -oligonucleótido de 37 bases de *S. typhi*.

DISCUSION

Sin duda, en la actualidad muchas líneas de investigación científica están enfocadas a la generación de información que ayude a la resolución de algún problema relacionado con la salud. Estos enfoques han tenido un gran desarrollo gracias a la aparición de tecnologías modernas de la Biología Molecular, la cual ha tenido avances sin paralelo en la última década. El surgimiento de las metodologías de DNA recombinante ha permitido obtener adelantos en el estudio de determinantes esenciales de virulencia e inmunidad de microorganismos infecciosos. Así mismo, ha abierto la posibilidad de que estos determinantes puedan ser útiles, a través de la manipulación del gen que codifica para ellos o del producto mismo, en la generación de sistemas de detección y vacunación.

En nuestro laboratorio se ha tenido el interés de comenzar a generar este tipo de conocimientos en relación a la fiebre tifoidea, la cual es, como se ha mencionado, un grave problema de salud pública en México y en otros países del mundo, donde las condiciones sanitarias son precarias. El control epidemiológico de la enfermedad depende del mejoramiento de la infraestructura sanitaria, del saneamiento básico y de la vigilancia y control de portadores tifoídicos (10,66); para lo cual es necesario no sólo mejorar el nivel económico de la población, sino también elevar su nivel de educación. Debido al tiempo y dificultad que implica el logro de estos objetivos y a pesar de sus imperfecciones técnicas, las vacunas continúan siendo una buena alternativa para su prevención (3).

Para la profilaxis de la fiebre tifoidea en nuestro país, se

cuenta con una vacuna, la cual es elaborada con bacterias muertas por calor. Esta vacuna tiene sus limitaciones, ya que la protección que confiere está en función de la dosis infectante a la que el individuo inmunizado esté expuesto, la inmunidad es de corta duración y presenta efectos colaterales adversos, dados por la toxicidad del LPS (11).

Para lograr productos que generen una inmunidad efectiva, será importante comprender con profundidad los mecanismos patogénicos, así como la naturaleza de la respuesta inmune que se produce en contra del microorganismo responsable de la infección.

En los últimos años, el estudio de las PME de las bacterias gram-negativas ha cobrado mucha importancia, ya que se considera que son elementos clave tanto en la patogenia como en la protección contra enfermedades producidas por estas bacterias; por su naturaleza proteica y su localización habitualmente inducen anticuerpos de alta afinidad y favorecen una respuesta celular, la que genera una inmunidad prolongada, que es crucial en la defensa contra los patógenos intracelulares como *S. typhi*.

Tomando en cuenta el reporte previo de que las PME de *S. typhi* inducen protección contra la infección con *S. typhi* en ratones (35), y el hecho de que la identificación del o de los antígenos involucrados en la inducción de la inmunidad protectora en la fiebre tifoidea sería de gran utilidad no sólo para el control a través de la inmunoprofilaxis, sino también para lograr un mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad, se emprendió este trabajo, cuyos objetivos fueron determinar la participación de las porinas de *S. typhi* en la protección contra la infección, y, de ser relevante, la clonación y caracterización

iniciales de sus genes codificantes.

Las porinas fueron purificadas de una preparación de PME, por cromatografía de exclusión molecular. Estas proteínas en su forma nativa constituyen trimeros de alto peso molecular y pudieron ser encontradas en el primer pico al término del volumen de exclusión de la columna.

Bajo condiciones reductoras, las porinas mostraron pesos moleculares aproximados de 38 KDa y puntos isoelectriscos entre 4.5 y 5.0; valores similares a los reportados para las porinas de *S. typhimurium* (43).

Con el objeto de analizar si las bandas proteicas contenían una sola proteína, las porinas de *S. typhi* se sometieron a electroforesis en dos dimensiones, técnica que es capaz de resolver hasta 10000 diferentes proteínas presentes en una muestra (60). Los resultados de la segunda dimensión mostraron que estas proteínas contienen solamente una forma isomérica, pudiendo apreciarse en el gel dos manchas, situadas muy cercanamente, correspondientes a las dos porinas aisladas.

Para los ensayos de protección contra el reto de la bacteria, se empleó el modelo murino; un modelo que tiene el inconveniente de no ser el hospedero natural de la bacteria, ya que ésta es patógena exclusivamente para el hombre (18). Por esta razón, la suspensión de las bacterias para las dosis letales se realizó en mucina, una sustancia que retarda la acción fagocítica de los macrófagos, lo que permite evaluar de forma más efectiva la acción de *S. typhi* en el ratón (74).

La inmunización de ratones NIH con porinas purificadas confirió protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de bacterias vivas

en los 10 días siguientes al reto. De estos resultados, la posibilidad de que el LPS contaminante esté efectuando un papel protector relevante en los animales de experimentación es mínima, ya que las preparaciones de proteínas estuvieron prácticamente libres de él, lo cual fue verificado por métodos sensibles. Además, experimentos anteriores han demostrado que la inmunización con LPS no genera un estado inmune protector (31, 35).

El ligero efecto de protección cruzada observado con *S. typhimurium*, indica la probabilidad de que en nuestro modelo experimental de fiebre tifoidea el alto grado de protección sea provisto por epitopos de porinas especie-específicos. Por otro lado, quizás algunos determinantes antigenicos compartidos de gran importancia estén involucrados en el desarrollo de la inmunidad. Esto puede ser clarificado a través de un estudio en el cual sean utilizados péptidos derivados de las porinas, que contengan secuencias homólogas entre ambas bacterias, así como secuencias heterólogas; para esto, el desarrollo de un arsenal de anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes epitopos pudiera ser de gran utilidad en la investigación.

Es también importante dilucidar el papel de cada una de las porinas en particular en la protección, sin embargo, estos estudios han sido difíciles debido a la problemática que presenta la separación de este complejo proteico por técnicas bioquímicas tradicionales, de tal modo que la obtención de una porina recombinante, a través de la clonación y expresión en vectores de su gen codificante, representa la mejor alternativa para la realización de ensayos más finos.

Para que una secuencia de DNA, o un gen particular puedan ser

analizados deben ser aislados de la gran cantidad de genes que están presentes en el DNA de un organismo dado. Una vez separado el gen deseado del DNA total es posible obtenerlo en cantidades adecuadas para su estudio. Una estrategia para aislar un gen específico es la construcción de genotecas o bancos genómicos, los cuales están constituidos por una amplia colección de moléculas híbridas de DNA en la que es posible que todo el genoma celular se encuentre representado en forma fraccionada e independiente.

La obtención de fragmentos definidos de DNA procedentes de un organismo y el acoplamiento enzimático a un elemento genético autorreplicativo para constituir un vehículo o vector de clonación que pueda introducirse por transformación o por transfección en una bacteria, permite obtener "factorias celulares" que fabriquen un gran número de estas moléculas de DNA recombinante (8); en estos bancos es también factible inducir la expresión de proteínas, hormonas y otras moléculas biológicas, para ser producidas en grandes cantidades, aislandose a bajo costo y con un grado de alta pureza (14); mas aún, cuando resulta insatisfactoria la expresión de una proteína nativa, puede optarse por la expresión de proteínas o partes de proteínas como híbridos fusionados a polipeptidos de *E. coli* tales como la β -galactosidasa, los cuales pueden ser purificados por procedimientos cromatográficos, para su uso en estudios funcionales o como inmunógenos.

En esta tesis se aisló de un minibanco de genes, un plásmido recombinante que contiene secuencias de DNA de *S. typhi* con alta homología para secuencias heterólogas de la porina OmpC, como lo demuestran los experimentos de hibridación del gen de porina de *E. coli* con el DNA tífico.

El minibanco de genes fue construido partiendo del hecho de que la banda de 3 Kb de DNA genómico de *S. typhi* digerido con Bgl II, hibridó fuertemente y en condiciones de alta astringencia con el gen de la porina OmpC de *E. coli* clonado en el vector pMY111, lo cual concordó con resultados obtenidos anteriormente por Puente y col (67). De esta manera se redujo para la clonación la cantidad de genes representados en el genoma de *S. typhi*, ampliándose la posibilidad de encontrar en las bacterias transformadas, plásmidos recombinados con el gen de la porina.

Por medio de la técnica de hibridación en gota se determinaron inicialmente las mejores condiciones para la hibridación tanto de la sonda heteróloga de porina con DNA de *S. typhi*, como de las sondas de oligonucleótidos sintéticos homólogos, lo que permitió realizar los siguientes experimentos de hibridación partiendo de los datos obtenidos y facilitando el trabajo.

Después de asegurar que el DNA de los vectores y de *S. typhi* se encontraban suficientemente puros y que la técnica de clonación fue eficiente, demostrado por los testigos de desfosforilación, ligación y transformación, se procedió a clonar el segmento de 3 Kb. Las colonias de bacterias transformadas tardaron en desarrollarse muchas horas más que las no transformadas, probablemente por algún mecanismo de adaptación o "sobrevivencia" al DNA extraño inoculado, como lo ha propuesto Hanahan (30), dando finalmente colonias típicas rojas, características de bacterias fermentadoras de lactosa, en ocasiones rodeadas de un precipitado opaco de sales biliares. En este momento, no fue posible detectar las clonas recombinantes, puesto que el proceso de inserción de DNA extraño a los plásmidos pUR no interfiere en su gen lac Z, de

modo que las colonias unicamente representaban transformantes de plásmidos resistentes a ampicilina.

El rastreo de clonas recombinantes por hibridación en placa con oligonucleótidos de *ompC* de *S. typhi* no funcionó debido a que, como se ha indicado, el DNA de *E. coli* hibridó fuertemente con las sondas. Esta extensa homología en las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para porinas de diferentes bacterias gram-negativas y dentro de la misma bacteria, ha llevado a algunos autores a proponer que estos genes provienen de un gen ancestral común, que se ha conservado durante la evolución (17). Debido a esto, para facilitar la búsqueda de genes de *Salmonella* en *E. coli* y para evitar el trabajo que supone el aislamiento de todos los plásmidos transformantes como se realizó en este estudio, existe la posibilidad de utilizar como bacteria receptora una cepa de *E. coli* mutante, carente de porinas de membrana (2,9).

A lo largo del proceso de escrutinio de los plásmidos, varias clonas transformantes del banco murieron, probablemente debido a la toxicidad que representa la sobreproducción de porinas en la bacteria hospedero (Henning, comunicación personal), lo cual puede disminuirse transitoriamente, una vez detectado el candidato, con la adición de glucosa al medio de cultivo; esto permite disminuir, por presencia de nutrientes, la expresión de *lac Z* y con ello, de la proteína.

El plásmido candidato seleccionado liberó un fragmento de DNA de alrededor de 2 Kb al ser restringido con la enzima *EcoRI*, dicho fragmento mostró ser DNA de *S. typhi* e hibridó francamente con la sonda del gen de porina de *E. coli*, ensayo que fue reprodu-

cible, y con el oligonucleótido homólogo, aunque estos ensayos preliminares no confirman que se trate de ompC debido a la similitud reportada entre porinas de una misma cepa; se considera que los experimentos realizados dan evidencias fuertes del hallazgo de un gen de porina en *S. typhi*, sin embargo, únicamente la secuenciación de este segmento de DNA daría una prueba final e incontrovertible.

BIBLIOGRAFIA

1. Adamus G, Mulczka M, Witkowska D, Romanowska E. 1980. Protection against Keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. Infect. Immun. 30:321
2. Agüero J, Mora G, Mroczenski-Willey MJ, Fernández-Beros ME, Aron L, Cabello FC. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 KDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. Microb Pathog 1987; 3:399
3. Bloom BR. 1989. Vaccines for the third world. Nature 342:115
4. Buchanan TM, Pearce WA, Schoolnick GK, Arko RJ. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pilli. J. Infect. Dis. 136(supl):132
5. Calderón I, Lobos S, Mora G. 1984. The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins. Eur. J. Biochem. 141:579
6. Calderon I, Lobos SR, Rojas HA, Palomino C, Rodriguez LH, Mora G. 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infections in humans. Infect Immun 52: 209
7. Carter PB, Collins FM. 1984. The route of enteric infection in normal mice. J. Exp. Med. 139:1189
8. Cohen SN. 1975. Manipulación de genes: la transferencia de información genética. Selecciones de Scientific American. Facetas de la Genética. H Blume Ed, Madrid 1978: 469
9. Cole ST, Sonntag I, Henning U. 1982. Cloning and expression in *E. coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 149:145
10. Cvjetanovic B, Grab B, Vemura K. 1978. Typhoid fever. An endemic disease with interhuman transmission. Dynamics of acute bacterial diseases. Bull. W. H. O. 56:45
11. Cvjetanovic B, Vemura K. 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull. W. H. O. 32:29
12. Di Donato A, Draetta G, Illiano G, Tufano M, Sommesse L, Galdiero F. 1986. Do porins inhibit macrophage phagocytosing activity by stimulating the adenylate-cyclase? J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 11:87
13. Edelman R, Levine MM. 1986. Summary of an international workshop on typhoid fever. Rev. Infect. Dis. 8:329

14. Farres A, Sanchez S. 1986. Evolucion y perspectivas de los sistemas de ingenieria genetica destinados a la produccion de proteinas de interes industrial. Boletin de educacion bioquimica. 5:24
15. Feinberg AP, Vogelstein B. 1984. A technique for labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 137: 266
16. Fields PI, Swanson R, Haidaris C, Heffron F. 1986. Mutants of *S. typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci USA 83:5189
17. Fujio Y. 1987. DNA and aminoacid sequences of outer membrane proteins and lipoproteins. In: M Inouye (ed). Bacterial outer membranes as model system. John Wiley and Sons. p.419
18. Gaines SA, Sprinz A, Tully J. 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological lesions. J Infect Dis 118:293
19. Galan J, Curtiss III R. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 86:6383
20. Galan J, Curtiss III R. 1990. Expression of *S. typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. Infect Immun 58:1879
21. Galdiero F, Tufano M, Galdiero M, Masiello S, Di Rosa M. 1990. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. Infect Immun 58:3183
22. Galdiero F, Tufano M, Sommese L, Folgore A, Tedesco F. 1984. Activation of complement system by porins extracted from *S. typhimurium*. Infect Immun 46:559
23. Gilleland HE, Parker MG, Matthews JW, Berg RD. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) prepatation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. Infect. Immun. 44:49
24. Groisman E, Chiao E, Lipps C, Heffron F. 1989. *S. typhimurium* phoP virulence gene is a transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci USA 86:7077
25. Gulig PA. 1990. Virulence plasmids of *Salmonella typhimurium* and other *Salmonellae*. Microb Pathog 8:3
26. Gulig PA, Chiodo VA. 1990. Genetic and DNA sequence analysis of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene encoding the 28000 MW protein. Infect Immun 58:2651

27. Gulig PA, Curtiss III R. 1988. Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100 Kb plasmid of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 56:3262
28. Gulig PA, McCracken GH, Frich CF, Johnston KH, Hansen EJ. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. Infect Immun 37:82
29. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166:557
30. Hanahan D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning: A practical approach (ed DM Glover) vol 1. IRL Press, Oxford.
31. Hernandez RM. 1985. Estudio de las Proteinas de membrana externa de *S. typhi*. Tesis de Doctorado, ENCB. IPN.
32. Hone DM, Attridge SK, Forrest B, Morona R, Daniels D, LaBrooy J, Bartholomeusz R, Shearman D, Hackett J. 1988. A gal E via (Vi antigen-negative) mutant of *S. typhi* Ty2 retains virulence in humans. Infect Immun 56:1326
33. Hornick RB. 1985. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XX. Typhoid fever. Rev Infect Dis 7:536
34. Hornick RB, Greisman SE, Woodward TE, DuPont HL, Dawkins AT, Snyder MJ. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunological control. N Engl J Med 283:686
35. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J, Kumate J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. Infect. Immun. 56:2953
36. Jap BK. 1989. Molecular design of phoE porin and its functional consequences. J Mol Biol 205:407
37. Jones GW, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *S. typhimurium* with autonomous 60 megadalton plasmid. Infect Immun 38:476
38. Jones GW, Richardson LA, Uhlman D. 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. J. Gen. Microbiol. 127:351
39. Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-Keto-3 deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. Anal. Biochem. 85:595

40. Kawahara K, Tsuchimoto M, Sudo K, Terakado N, Danbara H. 1990. Identification and mapping of mba regions of the *Salmonella choleraesuis* virulence plasmid pKDSC50 responsible for mouse bacteremia. *Microb Pathog* 8:13
41. Kumate J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: Manual de Infectologia. Kumate J, Gutierrez G (Eds.) Septima edicion. Ediciones Medicas del Hospital Infantil de Mexico. p. 45
42. Kussi N, Nurminen M, Saxen H, Makela PH. 1982. Immunization with major outer membrane protein (porin). Preparations in Experimental murine Salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. *Infect Immun* 34:328
43. Kussi N, Nurminen M, Saxen H, Valtonen M, Makela PH. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25:857-862.
44. Labarca P, Lobos SR, Calderon I, Mora G. 1986. Native and chemically modified porin channels from *Salmonella typhi* Ty2 in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* 197: 211
45. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680
46. Liu SL, Ezaki T, Miura H, Matsui K, Yabuuchi E. 1988. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect. Immun.* 56:1967
47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265
48. Lugtenberg B, Van Alphen L. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.* 737:51
49. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. En: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab Press USA
50. Manuelidis L. 1977. A simplified method for preparation of mouse satellite DNA. *Anal Biochem* 78: 561
51. Miller S, Kukral A, Mekalanos J. 1989. A two-component regulatory system (phoPphoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5054
52. Miller S, Mekalanos JJ. 1989. Strategies for the development of vaccines for typhoid fever, shigellosis and cholera. *Ann N Y Acad Sci* 569:145
53. Mizuno T, Choo MY, Inouye M. 1983. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated ompC gene.

- J. Biol. Chem. 258:6932
54. Nakae T. 1986. Outer membrane permeability of bacteria. CRC Crit Rev Microbiol 13:1
 55. Nikaïdo H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. Methods Enzymol. 97:85
 56. Nikaïdo H, Vaara M. 1985. Molecular Basic of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev. 49:1
 57. Nnalue NA, Lindberg AA. 1990. *Salmonella choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parenteral inoculation but are avirulent by oral administration. Infect Immun 58:2493
 58. Nnalue NA, Stocker B. 1986. Some gal E mutants of *Salmonella choleraesuis* retain virulence. Infect Immun 54:635
 59. Noyami T, Mizuno T, Mizushima S. 1985. Construction of a series of ompF-ompC chimeric genes by *in vivo* homologous recombination in *Escherichia coli* and characterization of the translation products. J. Bacteriol. 164:797
 60. O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250:4007
 61. Ortiz V, Isibasi A, Garcia-Ortigoza E, Kumate J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with Typhoid Fever. J Clin Microbiol. 27:1640
 62. Osborn MJ, Wu HC. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol 34:369
 63. Overbeeke N, Bergmans H, van Mansfeld F, Lugtenberg B. 1983. Complete nucleotide sequence of phoE, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *E. coli* K 12. J Mol Biol 163:513
 64. Owen RJ, Borman P. 1987. A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. Nucl Ac Res 15:3631
 65. Pelayo R, Isibasi A, Paniagua J, Ortiz V, Muiy M, Gonzalez C, Islas S, Kumate J. 1989. Elaboración de un inmunoadsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Arch. Invest. Med. (Mex.) 20:279.
 66. Perez Miravete A, Cabrera R. 1974. Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica. Rev Salud Publica de Mexico XV:165
 67. Puente JL, Flores V, Fernandez M, Fuchs Y, Calva E. 1987.

- Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *S. typhi*. Gene 61:75
68. Reed LJ, Muench HA. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27:493
 69. Rosenbusch JP. 1987. Tree-dimensional structure of membrane proteins. En: Bacterial outer membranes as model systems. Inouye, M. (Ed.). John Wiley and Sons. p. 141 U. S. A.
 70. Ruther U, Muller-Hill B. 1983. Easy identification of cDNA clones. EMBO J. 2:1791
 71. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. En: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab Press USA
 72. Schwartz M. 1983. Phage receptor (LamB protein) in *E. coli*. Methods Enzymol. 97:100
 73. Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503
 74. Spaun J. 1964. Studies on the influence of the immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay to typhoid vaccines. Bull WHO. 31:793.
 75. Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76:4350.
 76. Tufano M, Berlingieri M, Sonnese L, Galdiero F. 1984. Immune response in mice and effects on cells by outer membrane porins from *S. typhimurium*. Microbiologica 7:353
 77. Tufano M, Ianniello R, Galdiero M, De Martino L, Galdiero F. 1989. Effect of *S. typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. Microb Pathogen 7:337
 78. Udhayakumar V, Muthukkaruppan VR. 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect Immun 55:816
 79. Venegas A, Gomez I, Zaror I, Yudelevich A. 1988. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene. Nucl Ac Res 16:7721
 80. Wahdan MH, Serie C, Cerisier Y, Sallam S, Germanier R. 1982. Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: Three years results. J Infect Dis 145:292.
 81. Wang LI, Frash CE. 1984. Development of a *Neisseria meningi-*

tidis group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. Infect. Immun. 46:408

82. Wells JR, Brunk CF. 1979. Rapid CsCl gradients using a vertical rotor. Anal Biochem 97: 196