

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

7
Sij

**PAPEL DE LA PORINA Omp C EN LA
INMUNOGENICIDAD DE CEPAS ATENUADAS
DE *Salmonella typhi***

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
LORENA IVETTE GONZALEZ CARREÑO

DIRECTOR: Q.F.B. JOSE ANTONIO GARCIA MACIAS

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. César Raúl González Bonilla, M. en C. Mario Israel Vega Paredes y Q.F.B. José Antonio García M.

Dedico este trabajo a:

DIOS

Gracias te doy, por aceptarme como soy, por liberarme de la ignorancia, y transformarme en un ser útil, por sembrar con positividad mi camino, y lo más importante por que siempre estuviste a mi lado.

A mis Padres.

Por todos los valores que me inculcaron, por darme su amor, apoyo, comprensión, optimismo, consejos, por su preocupación, por los desvelos compartidos y ayuda en todo momento, por que sin ustedes simplemente yo no existiría, ni habría podido lograr este proyecto. Los quiero mucho

A mi Abuelita.

Con especial respeto y cariño, te agradezco por que siempre estuviste a mi lado compartiendo tu alegría, preocupándote y animándome. A quien le hubiera gustado ver este trabajo terminado.
Siempre estarás en mi corazón y en mi mente.

A mi Hermano.

Por tu comprensión, buenos deseos, disposición en ayudarme, y por hacerme divertidas las desveladas. Por todas las cosas que compartimos juntos. Te agradezco y te admiro por ser quien eres, amigo y hermano a la vez.
Te quiero mucho

A José Alberto Díaz Quiñones.

Gracias a una persona tan especial para mi, por brindarme el más noble y sencillo de los sentimientos, el amor, por su comprensión, consejos, apoyo, por que conociendo mis errores, los acepta y me ayuda a corregirlos, por la dicha de hacerme sentir entusiasmada, acompañada, y bien cuidada por alguien.
Por todo esto. Te amo

A mis Primos y Tíos:
Con cariño,
por su apoyo y sus buenos deseos.

A Ceci, Erika y Margarita:
Les agradezco de corazón, por todas las cosas que compartimos juntas, (tristezas y alegrías), por la amistad que hemos cultivado con detalles, ternura y cariño. A su ayuda apoyo disposición y buenos consejos.
Simplemente por ser mis amigas, por ser como son.
Siempre estarán en mí.

A Rosina, María Luisa, Oscar, Anabel,
Vero, Sandino, Juan José, Raquel.
Por todos los momentos que compartimos juntos en la carrera..

A todos mis profesores de Carrera:
Con cariño por sus enseñanzas y buenos consejos, por aquellos que dejaron en mí algo más que una relación alumno-profesor.
José Antonio García, Lupita Morales, Enrique Calderón, Mariano Ramírez, Araceli Sanchez, Jorge García, Betsabé, Ma. De Jesús Ramírez, Martha Mustre, Gabriel Cuevas, Ohannes Bulbulian, Ma. Teresa Estrada, Elías García, Leticia Linares, Gerardo Mugica, José Luis González, Miguel Ortego, Blanca Contreras. Gracias por todo

A Dr. Cesar Gonzalez Bonilla:
Gracias por su enseñanza, exigencia, supervisión, amistad y sus buenos consejos,
Por la oportunidad que me brindó para poder realizar una de mis principales metas, la realización de éste proyecto.

A Dr. Armando Isibasi A.

Con profundo agradecimiento, por permitir realizar este proyecto, en su laboratorio. Por compartir sus conocimientos, su buena disposición, su gran paciencia, y por dejar que perfeccionara mis habilidades.

A M. C. Mario Vega Paredes y M. C. Sara Huerta Yépez.

Por su amistad, apoyo, confianza, y sobre todo por su ayuda, enseñanza y buenos consejos, para lograr terminar, este trabajo.

Mil gracias

Dr. Vianney Ortiz Navarrete y Dr. Jorge Paniagua Solís

Gracias por sus enseñanzas, sus buenos deseos y sobre todo por su disposición y cooperación en el desarrollo de este trabajo.

A Compañeros y Amigos del laboratorio

Con mucho cariño ya que gracias a ustedes, el tiempo fue corto y el trabajo menos pesado. Gracias por la ayuda que siempre me brindaron además, de su buen humor, y buenos deseos.

Dra. Marcela, M en C. Mario Vega, Sara Huerta,

M.en C. Alberto Díaz, Erika Bayardo. Dr. Manuel Carrera,

M. en C. Roberto Zenteno, M. en C. Araceli Machuca, M. en C. Rebeca

Alvarez, Lupita, Roberto, Fernando, Ivette Martha, Araceli, Olivia,

Ernesto, Irma, Genaro, Penelope, Victor, Gabita.

INDICE

CAPITULO	PAGINA
I. ABREVIATURAS	7
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCION	10
III.3 Generalidades	10
III.2 Respuesta Inmune en Contra de <i>Salmonella typhi</i>	13
III.3 Proteínas de membrana externa	16
III.4 Inmunogenicidad de las Porinas de <i>Salmonella typhi</i>	22
III.5 <i>Salmonella typhi</i> Como Acarreador Vivo de Antigenos	24
III.6 <i>Salmonella typhi</i> CVD908	26
III.7 Regulación de las Porinas	29
III.8 Sistema <i>PhoP/PhoQ</i>	32
IV. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	33
V. OBJETIVO	34
VI. HIPOTESIS	34
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	35
A). BACTERIOLÓGICOS	35
A.1 Cepas bacterianas	35
A.2 Cultivo de bacterias	35
A.3 Determinación de dosis letal al 50%	36
B). ANIMALES DE LABORATORIO	37
C). OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO CONTRA LA PROTEINA OmpC RECOMBINANTE DE <i>Salmonella typhi</i> .	37
D). ANALITICOS	38
D.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	38
D.2 Inmunoelectrotransferencia	39
D.3 Citometria de Flujo (FACS)	40

CAPITULO	PAGINA
D.4 Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA)	40
E). INGENIERIA GENETICA	41
E.1 Extracción de DNA genómico	41
E.2 Cuantificación de DNA	42
E.3 Detección del gen por la técnica de Southern Blot	42
E.4 Extracción de mRNA	43
E.5 Detección de mRNA por la técnica de Northern Blot	44
F). METODOS INMUNOLOGICOS	45
F.1 Esquema de inmunización	45
F.2 Ensayos de Protección	45
F.3 Ensayos de Proliferación	46
VIII.RESULTADOS	47
IX. DISCUSION Y CONCLUSIONES	60
X. REFERENCIAS	65

I. ABREVIATURAS.

LPS	Lipopolisacárido
OmpCr	Porina OmpC recombinante
PBS	Buffer salino de fosfatos
SFB	Suero fetal bovino
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
BHI	Infusión cerebro corazón
SDS	Dodecil sulfato de sodio
OmpC	Porina OmpC presente en bacterias gram negativas
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FACS	Citofluorometría de flujo
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
SSC	Amortiguador de transferencia
TAE	Buffer para electroforesis tris - acetato/EDTA
IgG	Inmunoglobulina G
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
OPD	Orto-fenilendiamina
PME	Proteínas de membrana externa
DL50	Dosis letal media
gp63	Glicoproteína principal del promastigote de <i>Leishmania mexicana</i>

c.p.m. Cuentas por minuto

UIMI Unidad de Investigación Médica
en Inmunoquímica

II. RESUMEN.

Las porinas son proteínas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que constituyen canales de difusión de compuestos de bajo peso molecular. Estas proteínas son capaces de inducir inmunidad protectora contra el reto con *Salmonella typhi* en ratones. *Salmonella typhi* CVD908 es una cepa $\Delta aroC \Delta aroD$, auxotrófica para aminoácidos aromáticos y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63 contiene integrado en el locus *aroC*, el gene que codifica para gp63 de *Leishmania mexicana*. El patrón electroforético de las proteínas de membrana externa de estas cepas es distinto, pues *Salmonella typhi* CVD908 expresa menor cantidad de OmpC. Por lo que la cepa mutada de *Salmonella typhi* CVD908 induce menores títulos de anticuerpos contra OmpC. *Salmonella typhi* CVD908 expresa en menor cantidad la porina OmpC en comparación a *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63. No se ha aclarado por qué al integrar en el cromosoma un gen heterólogo *Salmonella typhi* CVD908 recupera la expresión de OmpC pero probablemente se deba a la introducción de un promotor en la región *aroC*, lo que sugiere que existe un vínculo regulatorio entre *aroC* y OmpC.

III. INTRODUCCION.

III.1 Generalidades.

El género *Salmonella* comprende más de 2000 serotipos los cuales se agrupan en tres especies: *Salmonella choleraesuis* (con sólo un organismo), *Salmonella typhi* (constituido sólo por el bacilo de la tifoidea humana) y *Salmonella enteritidis* (a la cual pertenecen los demás serotipos). Las *Salmonellas* se pueden clasificar a través de la identificación serológica de los antígenos de superficie que presentan. *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhi* son microorganismos muy adaptados al cerdo y al hombre, respectivamente; sin embargo, ambos son capaces de infectar al ser humano. *Salmonella enteritidis* incluye serotipos adaptados y no adaptados a su hospedero, siendo estos últimos los causantes de la infección sistémica de muchos animales y de la diarrea en el hombre (53). Como ejemplos de las especies de *Salmonella* adaptadas al hospedero se puede mencionar a *Salmonella typhimurium* que causa salmonelosis murina, mientras que *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pollorum* causa salmonelosis aviar. En el humano, las *Salmonellas* no *typhi* son capaces de generar enfermedades invasivas en individuos muy jóvenes y en los de edad avanzada, así como en personas inmunosuprimidas. Los portadores asintomáticos de *Salmonella typhi* son el reservorio de la fiebre tifoidea humana. Algunas personas pueden convertirse en portadores temporales de otros serotipos de *Salmonella* y son los que generalmente ocasionan brotes de gastroenteritis a través de la contaminación de los alimentos, por lo que estas infecciones se consideran antropozoonosis (42).

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa causada por la ingestión e invasión masiva de *Salmonella typhi*.

Aunque la fisiopatología del padecimiento no está totalmente esclarecida, se sabe que gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de endotoxina la cual induce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (43). El cuadro clínico se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal, que frecuente mente se presentan con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen la hemorragia intestinal en el 2 al 8% de los casos y la perforación que se presenta en el 3 al 4%.

La tasa de letalidad es alrededor de 1%; sin embargo, en los casos complicados puede ascender hasta el 30%. Ya que este microorganismo afecta sólo al ser humano y no hay reservorios animales, el elemento más importante en la cadena de transmisión es el portador asintomático.

Actualmente no existe una vacuna de aceptación universal. Las vacunas parenterales de células muertas inducen inmunidad de corta duración y con frecuencia producen reacciones colaterales como fiebre, ataque al estado general o el dolor local, debido a la presencia de endotoxina. La vacuna oral de células atenuadas tiene una eficacia hasta del 67% (45).

Esta enfermedad continúa siendo un problema de salud en los países en vías de desarrollo y en algunos países industrializados, donde se presenta de manera endémica. Sin embargo, aún en los países con buena infraestructura sanitaria se pueden presentar brotes (11). Se estiman alrededor de 16 millones de casos anuales en el mundo, que causan mas de 600,000 muertes (78).

La incidencia en Africa y Asia es de 500 casos/100,000 habitantes. En la región de las Américas alrededor de 1990, se presentaron 89,591 casos aproximadamente, que representan una incidencia de 20.8 casos/100,000 habitantes; la incidencia a llegado a ser hasta de 150 casos/100,000 habitantes en Chile. En México se reportaron 11,078 casos en 1987, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes. El

grupo de edad más afectado por la enfermedad es el de los 15 a 44 años, donde se presentan aproximadamente el 58.62% de los casos, lo cual representa más de 500,000 días laborales perdidos. Hasta la semana 34 de 1996 se habían reportado ese año 4,351 casos, que comparados con 3,286 del año anterior, representan un incremento del 32% (18). Aunque se ha descrito que *Salmonella typhi* en todo el mundo constituye una sola clona con muy poca divergencia intraespecie (82,83) y algunos estudios muestran poca correlación entre las características genotípicas y la severidad de la enfermedad (26,38), otros autores sugieren que algunas diferencias genotípicas si pueden estar asociadas a la virulencia de algunas cepas (95).

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Salmonellae* y género *S. typhi*, gram-negativo, móvil, mide de 2 a 3 μm , es citofílico, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos. Tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno H o flagelar y el antígeno somático O que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica; de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D y comparte con las diferentes especies de ese grupo los antígenos somáticos 9,12; los flagelos contienen el antígeno d y en la superficie se encuentra el antígeno V i, el cual forma parte de la membrana externa y es indicador de virulencia.

Salmonella typhi penetra al organismo a través de la boca, se multiplica rápidamente en el intestino delgado, penetra la membrana basal intestinal sin causar daño importante en los tejidos, es fagocitada por macrófagos y transportada a los ganglios linfáticos regionales donde se multiplica activamente, tiene una fase de bacteremia, se distribuye en el sistema fagocítico mononuclear, donde se reproduce y es liberada nuevamente al sistema circulatorio.

III.2 Respuesta inmune en contra de *Salmonella typhi*.

Salmonella typhi no afecta de manera natural al ratón, pero la infección por *Salmonella typhimurium* tiene en este animal una patogenia semejante a la fiebre tifoidea en el humano, y por tanto se ha utilizado como modelo para estudiar las interacciones de la bacteria con el hospedero. Utilizando otros modelos, como la inoculación intraperitoneal de *Salmonella typhi* mezclada con mucina, es posible infectar macrófagos murinos (87).

La respuesta inmune que se genera en contra de *Salmonella* ha sido estudiada en los ratones, tanto resistentes como susceptibles a la infección por *Salmonella typhimurium* (108,62,17). En las cepas de ratones susceptibles (BALB/c) a la infección por *Leishmania*, los macrófagos no se activan eficientemente y probablemente no producen cantidades suficientes de IL-12, impidiendo la diferenciación de linfocitos CD4⁺ hacia el linaje Th1.

La bacteria ocasiona un proceso inflamatorio, en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, con muy escasa cantidad de polimorfonucleares y gran acumulación de mononucleares, en el interior de los cuales es capaz de proliferar (43).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas, las cuales no necesariamente correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones, a excepción de algunos estudios que sugieren que los anticuerpos contra el antígeno H son un indicador de resistencia a la fiebre tifoidea (100).

Se ha descrito que los anticuerpos secretorios (IgA) impiden la adherencia de *Salmonella typhi* a la pared intestinal; sin embargo, sólo son protectores ante inóculos pequeños de las bacterias.

Frente a la gran invasión por grandes cantidades de *Salmonella typhi*, los mecanismos de inmunidad celular, fundamentalmente la activación de macrófagos, son indispensables para el control de la infección (61).

Se ha estudiado la participación de las diferentes poblaciones de linfocitos T α / β ($CD4^+$ y $CD8^+$) y γ / δ así como de los factores solubles que éstas producen y la influencia de estos factores en la actividad microbicida del macrófago. Los linfocitos T $CD4^+$ participan en la activación de los macrófagos, en la estimulación para la producción de anticuerpos y en la inducción de hipersensibilidad retardada observada en los animales infectados con *Salmonella* (101,96). El papel de los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos es controversial. Mientras que algunos autores reportan evidencias de que ciertos antígenos recombinantes, expresados en bacterias pueden ser presentados en el contexto de moléculas de clase I y por lo tanto generar CTL. Otros no han logrado inducir este tipo de respuestas contra los antígenos acarreados por salmonella y otros más han demostrado que la inducción de CTL parece estar asociada con la cantidad de proteína recombinante que se produce y, con la estabilidad de los plásmidos.

En la búsqueda de los antígenos involucrados en la respuesta inmune contra *Salmonella typhi* se han analizado algunos de los componentes de la membrana externa como los son el lipopolisacárido (LPS) y las porinas. En el caso de *Salmonella typhimurium* se ha reportado que una mezcla de proteínas de la membrana externa (PME), o bien con porinas purificadas, son capaces de inducir un estado protector en los ratones (102,104).

El LPS también llamado endotoxina, es un componente importante de las paredes celulares de muchas bacterias gramnegativas, a concentraciones bajas el LPS estimula la producción de anticuerpos específicos. Se cree que un componente de la molécula del LPS se une a las células B y las activa directamente, es decir, que el antígeno proporciona la primera y segunda señal necesaria para la activación de las células B. Además el LPS es un activador de célula B policlonal en los ratones pero no en los seres humanos ni en la mayor parte de otras especies. En todas las especies el LPS es uno de los más potentes activadores conocidos de los macrófagos (1).

El LPS induce protección mediante el desarrollo de una respuesta de anticuerpos y aumentando la respuesta celular dirigida contra las porinas (69).

La inoculación de porinas de *Salmonella typhimurium*, en el cojinete plantar de ratones inmunizados con dosis subletales de la misma bacteria, son capaces de generar una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) (103), la cual se considera una manifestación *in vivo* de la inmunidad celular. Algunos autores consideran que hay una correlación directa entre inmunidad protectora y el desarrollo de la DTH, sin embargo, en otros trabajos se ha encontrado que no en todos los casos hay correlación entre estos dos fenómenos, e inclusive se ha reportado que hay protección en ausencia de DTH (54).

Por otro lado en humanos el LPS y las porinas inducen la producción de Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), Interleucina-1 α (IL-1 α) e IL-6 por monocitos, e IL-4 e interferón gamma (INF- γ) (28).

Tanto las PME de *Salmonella typhi* (45), las porinas purificadas (46), así como la OmpC recombinante (44), inducen protección en ratones al reto con *Salmonella typhi*. En la protección observada participa la respuesta de anticuerpos, ya que el suero hiperinmune de conejo anti-PME protege pasivamente a ratones al reto con 100 DL₅₀ de *Salmonella typhi* Ty2, al igual que los anticuerpos monoclonales anti-porinas (47), mientras que los anticuerpos monoclonales anti-LPS no tienen ningún efecto (79). En el humano se ha encontrado que los pacientes convalecientes de fiebre tifoidea producen IgG contra las porinas de *Salmonella typhi* (75). Por otro lado, las porinas también inducen inmunidad mediada por células, ya que activan específicamente linfocitos T en humanos y ratones (5,33) y promueven la activación de macrófagos.

En relación a la respuesta inmune contra *Salmonella typhi*, se puede concluir que para el control de la infección es necesario un efecto sinérgico entre la actividad del macrófago, los anticuerpos y los linfocitos T. Sin embargo, todavía no se ha aclarado completamente el papel que juegan cada uno de los componentes de la

respuesta celular en la infección causada por *Salmonella typhi*; aunque la función de los linfocitos T CD8⁺ es el menos claro, es evidente que estas células participan en el control de infecciones por microorganismos intracelulares como es el caso de *Listeria*, *Mycobacterium*, *Chlamidia* y *Brucella* (77).

III.3 Proteínas de Membrana Externa (PME)

Al menos la mitad de la masa de la membrana externa son proteínas. Las proteínas constituyentes de la membrana externa son proteínas porínicas y no porínicas. Las proteínas principales se dividen en :

- a) Proteínas matrices o porinas que participan en el transporte pasivo de moléculas de bajo peso molecular a través de la membrana.
- b) Proteína modificable por calor (OmpA) relacionada con los procesos de conjugación y que actúa como receptor de algunos fagos y colicinas, su peso molecular es de 33 KDa.
- c) Lipoproteínas de Braun la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

Con respecto a las proteínas menores se ha demostrado que intervienen como acarreadoras en el transporte de moléculas de alto peso molecular, además de estar relacionadas con la replicación celular (44).

Las porinas tienen un peso molecular de 31 a 42 Kda, su composición de aminoácidos proporciona una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad del 45%, tienen un punto isoeléctrico de 4.5-4.6 (71). Reciben el nombre de porinas porque se arreglan en trimeros que forman poros o canales que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa (72). Las porinas identificadas tanto en *Escherichia coli* en *Salmonella typhimurium* son OmpC, OmpF y PhoE; mientras que OmpD al parecer es exclusiva de

Salmonella typhimurium. Estas proteínas son muy semejantes entre sí y tan solo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos.

Las estructuras de las porinas presentan una gran estabilidad en presencia de detergentes como las sales biliares y el SDS, y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas. (71)

Dentro de la familia de porinas de los géneros *Escherichia* y *Salmonella*, las más estudiadas son OmpF y PhoE de *Escherichia coli*, pero debido a su gran homología (más del 60%), se considera que la estructura de las otras porinas es muy similar. Están formadas por tres monómeros idénticos de forma cilíndrica semejante a un barril (**Figura A**). La entrada del poro se encuentra delimitada por largas prolongaciones del cilindro que restringen su acceso al inclinarse hacia el centro del canal. A la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior. Esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones hasta el otro extremo, el cual desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria (12).



Figura A. Modelo de la estructura terciaria de la porina OmpF de *Escherichia coli*. (12)

El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio. Los estudios cristalográficos más recientes realizados en OmpF y PhoE, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril β formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras de β de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1 (71). En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal. La entrada del poro está restringida por las asas largas y disperejas que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 Å a 19 Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15 X 22 Å y está definida por las vueltas β . El mayor número de modificaciones en la secuencia protéica entre una y otra porina se localiza en estas asas y por tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros (71).

Las porinas se encuentran en la superficie de la bacteria en una cantidad relativamente elevada, (hasta 10^5 copias por célula), por lo que constituyen una de las proteínas más abundantes en la bacteria en términos de masa, pueden presentar hasta un 2% de la proteína total de la célula (40). Hasta el momento las porinas más estudiadas son las de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y sus principales características se muestran en la **Tabla 1**.

Las condiciones de crecimiento, como la actividad osmótica y la temperatura, regulan la expresión de las porinas. En un medio de cultivo común (que contenga fuentes de Carbono y Nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales) solo OmpF, OmpC y OmpD se producen; PhoE únicamente se expresa bajo condiciones de escasez de fosfatos.

La expresión de OmpF se reprime por la temperatura y la osmolaridad elevadas; por lo que algunas cepas prácticamente no sintetizan esta proteína a 37°C y en presencia de aproximadamente 0.9% de NaCl. Por el contrario, la expresión de OmpC, se ve favorecida con niveles elevados de sales (71).

OmpC y OmpF son proteínas muy semejantes funcional y estructuralmente; sus poros tienen tamaños de exclusión similares, y diámetros que varían entre 1.1 y 1.3 nm³. Se cree que estas dos proteínas y la porina PhoE evolucionaron de una proteína ancestral común, ya que las secuencias protéicas contienen un 63% de aminoácidos idénticos y que esta homología se incrementa hasta un 86% en el extremo carboxilo de ambas proteínas (76).

Al realizar estudios *in vitro* en los que se reconstituyen las porinas en membranas lipídicas, se ha demostrado que las porinas de *Escherichia coli* son permeables a trisacáridos y tetrapéptidos; lo cual implica que permiten el paso de nutrimentos y iones a través de la membrana externa de la bacteria. Además, la medición de la conductancia en estas membranas, ha permitido calcular el diámetro de los poros (4). No hay información que muestre la especificidad del poro hacia los solutos; sino que aparentemente son las propiedades fisicoquímicas de los solutos las que determinan su velocidad de difusión a través de la porina; siendo las principales el tamaño, la carga eléctrica y la hidrofobicidad del soluto.

PORINA	RECEPTOR A FAGOS O COLICINAS	PESO MOLECULAR (Kda)	DIAMETRO APROXIMADO (nm)	REGULACION DE LA SINTESIS
OmpF	a)Tul, T2, TP1, TP2	32.7	1.2	Reprimida por alta osmolaridad
	b)TP5, ColA	39.3	1.2	
OmpC	a) Tul, Mel, PA2, 434, SS1, TP2, TP5, TP6	36.0	1.1	Desreprimida por alta osmolaridad
	b) PH42, PH105, PH221	39.8	1.3	
OmpD	a)No tiene	No tiene	No tiene	Dependiente de AMPc
	b)PH31, PH42, PH51	38.0	1.3	
PhoE	a)TC23, TC45	36.8	1.2	Desreprimida por escasez de Pi
	b)No identificado	No identificado	No identificado	

TABLA (1). Características de las porinas de a) *Escherichia coli* y b) *Salmonella typhimurium*.

Las porinas son capaces de inducir inmunidad activa en ratones contra el reto de 500 DL₅₀ y que el suero hiperinmune de conejo contra PME induce protección pasiva y es capaz de reconocer al grupo de las porinas.

El gen que codifica para OmpC de *Salmonella typhi* ya fue aislado y secuenciado (2,106). La porina OmpS1 de *Salmonella typhi*, que se logró identificar utilizando como sonda una secuencia de OmpF de *Escherichia coli*, es mas grande que OmpC y OmpF pues tiene 41 KDa, y se expresa en tan baja concentración que no es visible en electroforesis en acrilamida (2). Algunas evidencias sugieren que la porina OmpA actúa como un receptor de bacteriocina y además juega un papel importante en

el mantenimiento de la morfología celular y en la integridad de la membrana externa, posiblemente por sus interacciones con las peptidoglicanas.

La función de la proteína **a** constituye un misterio, algunas evidencias sugieren que es probablemente una proteasa. La lipoproteína es un polipéptido que contribuye a la estabilización de la arquitectura del complejo membrana-peptidoglicana.

III.4 Inmunogenicidad de las porinas de *Salmonella typhi*.

Las porinas de *S. typhi* desempeñan un importante respuesta inmune contra la fiebre tifoidea (46). Se ha demostrado que estas proteínas estimulan mecanismos efectores humorales y celulares en modelos murinos y que son buenos inmunógenos para la inducción de un estado de protección contra la infección por la bacteria (45,46,47,79,75,5,33).

Las porinas de *S. typhi* son también inmunogénicas en el humano. Esto se demostró cuando, al evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes con fiebre tifoidea en fase convaleciente, se encontraron anticuerpos de clase IgG dirigidos contra las porinas (75). De igual modo, la administración de la vacuna antitifoidea oral indujo la producción de anticuerpos anti-porinas en las personas estudiadas (5).

Para entender la virulencia de *S. typhi*, y para poner en claro la respuesta inmune del hospedero, es importante determinar otras propiedades de *S. typhi* que son constantes entre las diferentes cepas (88). Incluidas en estas propiedades, está la presencia de genes que codifican para supuestos factores de virulencia y otros antígenos de superficie, dos de los genes son aquellos que codifican para las PME (6).

Estos hallazgos en torno a las porinas de *S. typhi* y su papel en la respuesta inmune, han motivado un estudio más profundo sobre su antigenicidad; es decir, sobre las regiones de la proteínas responsables de la inducción de protección.

La capacidad de las proteínas de membrana externa (PME) de *Salmonella typhi* de conferir protección contra el reto de la bacteria viva, se ha demostrado en el modelo murino. esto está dado por el reto en ratones con la administración oral o intraperitoneal de la bacteria (20).

Las ventajas de este modelo es que es muy similar a la enfermedad en humanos, ya que animales inmunizados con 30ug de una mezcla de PME y una contaminación con 4% de LPS fueron protegidos al 100% con dosis de hasta 1000 DL₅₀ (dosis letales al 50%). Suero de conejo inmune anti-Omp's reaccionó con más intensidad con las proteínas de 36-41 KDa que corresponden a las porinas. Lo que sugiere que las porinas son las proteínas responsables de la protección de los animales y que la rama humoral está directamente implicada. La presencia de inmunidad celular es evidente por la habilidad de estas proteínas para activar linfocitos T de ratones inmunizados con PME de *Salmonella typhi*.

Generalmente las porinas contienen cinco o más epitopos de superficie de 6 a 25 residuos (74), que son parcialmente encubridos por el LPS y completamente bloqueados por antígeno O (97). Estas proteínas tienen un papel potencial en ensayos de diagnóstico, resistencia a antibióticos, y como inmunógenos para vacunación (3).

La presencia de anticuerpos específicos hacia Omp's ha sido demostrado en pacientes con fiebre tifoidea (6,45); además se ha observado una respuesta inmune de células T contra Omp en pacientes con fiebre tifoidea comparado con individuos que recibieron una vacuna con cepas atenuadas vivas. Esta respuesta correlaciona con una respuesta humoral que no fue detectada en esos individuos que recibieron extractos celulares inactivados como una vacuna (107).

El aislamiento de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium* hizo posible exhibir el 91% de homología que tienen entre ellas. La región variable de *Salmonella typhimurium* corresponden en el 50 o 60 de los "loops" expuestos, que supuestamente han sido generados y caracterizados contra la porina de 36KDa OmpC de *Salmonella*

typhi (68). La variación en *Salmonella typhi* ha sido observada en genes ribosomales (70), de esta manera es concebible que los alelos observados tal como OmpC son involucrados en los procesos fisiológicos impuestos por la selectividad presionada contra el cambio.

La secuencia de OmpC de *Salmonella typhi* contiene ocho regiones sobre las bases del modelo estructurado de porinas enterobacteriales (49,91) que corresponden hacia los dominios expuestos en la superficie de las porinas; éstas son buenos candidatos para vacunas contra infección por *Salmonella*. Además estos epitopos podrían proporcionar atractivos sitios de inserción y la expresión de genes extraños en cepas de *Salmonella* (7,35).

Se observó que dosis de porinas de *Salmonella typhi* de 10 o 30 μg indujeron el 90 % de protección al reto de 500 DL₅₀ de la bacteria (46).

Se identificó a la porina OmpC como una de las dos porinas responsables de tales resultados y su producción y utilización como inmunógeno de manera recombinante ha permitido analizar su papel en la inducción de la inmunidad protectora (44).

Por lo dicho anteriormente se considera a la porina OmpC de *Salmonella typhi* como un excelente candidato como agente vacunal contra fiebre tifoidea. Sin embargo los procedimientos bioquímicos de extracción y purificación de la proteína es el principal inconveniente para su desarrollo a escala industrial, además de que no se elimina completamente la contaminación del LPS.

III.5 *Salmonella* como acarreador vivo de antígenos.

Las regiones variables entre *Salmonella typhi* y *E. coli* en OmpC (80), son mostrados entre los *loops* 1 al 7, las regiones que corresponden a los "*loops*" 4 y 6 respectivamente pueden ser modificados para servir como acarreadores de epitopos

heterólogos. El reconocimiento de epitopos fue más efectivo en el cuarto "loop" que en el 6 probablemente debido a diferencias en la estructura secundaria en esta región.

Un nuevo candidato a vacunas de *Salmonella typhi* han sido atenuadas por mutaciones (93) auxotróficas. Los aminoácidos aromáticos auxotróficos causaron bacteremias en algunos estudios(93,94).

Hoiseth y Stocker (39) construyeron cepas de *Salmonella typhimurium* definidas como acarreadores, sin revertir la pérdida en el gene *aro A*, dando como resultado una construcción avirulenta, ya que esta *Salmonella typhi* dependía para su crecimiento de compuestos aromáticos que no son encontrados en el tejido del mamífero.

Encontraron que ésta protegía, y era efectivo en vacunas vivas para ratones; a la vez observaron que con una mutación en *aro* de *Salmonella typhi* actualmente son considerados para usarse como vacunas vivas en animales domésticos y humanos. Encontraron que pueden ser muy efectivas como vacunas recombinantes, como acarreadores de antígeno heterólogos derivados de bacteria, virus y parásitos (14,15).

Las cepas atenuadas de *Salmonella*, que acarrear determinantes antigénicos de otros organismos, son de gran interés como alternativa en el desarrollo de vacunas, pues la administración oral de *Salmonella* viva puede inducir respuesta inmune secretora, humoral y mediada por células contra *Salmonella* y contra los antígenos que acarrea y, consecuentemente, conferir protección en modelos animales.

Sin embargo, para que estas cepas atenuadas de *Salmonella* puedan ser empleadas como acarreadores, se deben introducir genes extraños que produzcan de manera estable la proteína recombinante, usualmente se utilizan plásmidos que confieren resistencia a antibióticos, facilitan su identificación y permiten la retención del plásmido por la bacteria; aunque estos plásmidos se retienen de manera adecuada *in vitro*, son muy inestables *in vivo* aún cuando la bacteria se encuentra bajo la presión

selectiva del antibiótico. Para resolver este problema se ha utilizado la integración del gene foráneo al cromosoma de la cepa acarreadora (40).

III.6 *Salmonella typhi* CVD908.

Algunas cepas atenuadas de *Salmonella* son de interés por que ellas confieren protección sólida en sistemas experimentales usadas en el modelo murino como vacunas orales (7).

Para la construcción de la cepa Ty21a (basada en la cepa *Salmonella typhi* Ty2), se tuvo que someter a mutaciones químicas. Las mutaciones en los genes que codifican para enzimas de la ruta biosintética del precorismato son atractivos candidatos a vacunas, desde mutaciones en varios genes *aro*, incluyendo *aroA*, *aroC* y *aroD*, solas o en combinación, dan cepas de *Salmonella* que son efectivas como vacunas en ratones y ganado vacuno (39,51)

Se ha descrito que la cepa Ty21a de *Salmonella typhi* es un prototipo que estimula la respuesta inmune protectora contra *Salmonella typhi* y se ha usado para expresión de antígenos enterotoxigénicos de *E.coli* (9).

Sin embargo encontraron que Ty21a requiere múltiples dosis para llevar a cabo una máxima inmunogenicidad.

CVD908 es una nueva vacuna de *Salmonella typhi*, es una cepa atenuada e inactivada por recombinación homóloga a los genes *aroC* y *aroD* utilizando plásmidos suicidas. CVD908 tiene una dependencia nutricional por compuestos aromáticos tales como el ácido-para amino benzóico (PABA) y el 2,3- dehidroxibenzoato (DHB) que son disponibles en el tejido humano para su crecimiento, por lo que la cepa es incapaz de replicarse en los tejidos de los mamíferos porque en ellos no encuentra los metabolitos necesarios para la vía biosintética de compuestos aromáticos (39). (Figura B)

VIA METABOLICA DE LA BIOSINTESIS AROMATICA

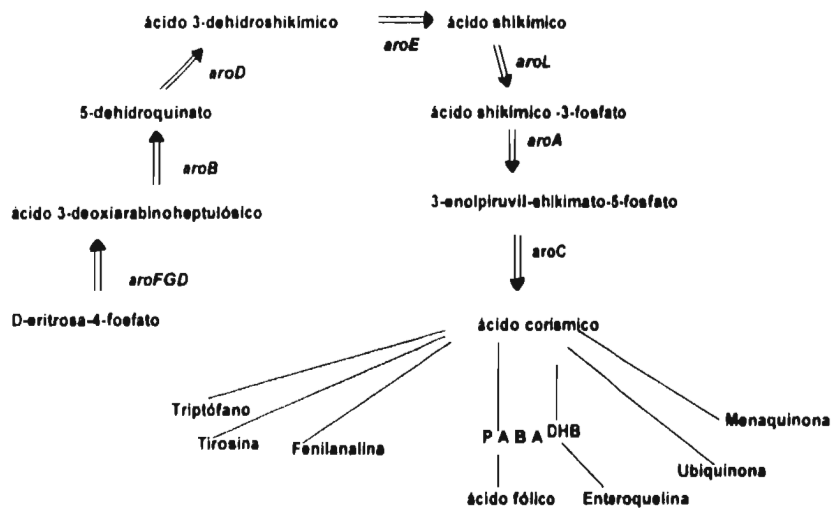


FIGURA B.

A diferencia de Ty21a, CVD908 es fácilmente manipulada por técnicas genéticas, además de que expresa el antígeno **O, H Vi**.

Existen hechos donde se reportan la seguridad y la fuerte inmunogenicidad a una baja dosis de CVD908 (5×10^4 c.f.u. o 5×10^5 c.f.u.), en un pequeño número de voluntarios humanos sanos a dosis orales altas y estimuló respuesta inmune de tipo sistémica y de mucosas (94). Con esto se pudo describir los estudios de la seguridad clínica y la inmunogenicidad de CVD908 dando por vía oral una dosis de 5×10^7 c.f.u. o tres dosis de 5×10^5 c.f.u.

La construcción de CVD908 con deleciones en *aro C* y *aro D* derivada de la cepa *Salmonella typhi* ISP1820 (recientemente aislada de *Salmonella typhi* de Chile.) y de la cepa Ty2 respectivamente (41).

En la fase I CVD908 estimuló una impresionante respuesta inmune, después de una dosis oral comparada con otras vacunas orales o candidatos a vacuna.

CVD908 es la primera cepa de *Salmonella typhi* que se caracterizó con mutaciones genéticas, que estuvieron lo suficientemente atenuadas en las pruebas de fase I, y ha sido considerada para usarse como cepa acarreadora en varios sistemas experimentales (57). Una cepa que expresa gp120 de HIV-1 fue capaz de evocar anticuerpos contra el virus al ser administrada a ratones BALB/C (25). *S. typhi* CVD908 fue empleada como acarreador de la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*. La administración oral de este candidato a vacuna en voluntarios humanos, dio como resultado una respuesta de anticuerpos a la CSP y, más importante, en algunos voluntarios se identificaron linfocitos T citotóxicos dirigidos contra la CSP (32).

III.7 Regulación de las porinas.

La expresión de las principales proteínas de membrana externa OmpF y OmpC en *E.coli* están reguladas a nivel transcripcional por los productos del operón OmpB, OmpR y EnvZ en respuesta hacia los cambios de osmolaridad en el medio (29,36). (TABLA 2).

EnvZ es una proteína de membrana interna, que tiene actividad fosfatasa (23,58) y está presente aproximadamente en 10 copias por célula (67), OmpR es una proteína que está unida a DNA que reconoce secuencias en la región del promotor de ambas porinas OmpF y OmpC (50,65,73) y está presente en 1000 copias por célula (110). Además de que puede ser fosforilada por EnvZ y la actividad de transcribir a las porinas OmpF y OmpC.

Previos datos sugieren que EnvZ funciona como un sensor que retrotransmite la información para la activación transcripcional de OmpR, que controla la expresión de ambas porinas (13,23)

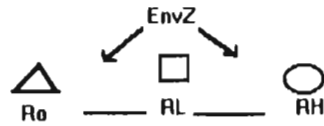
Se mostró que las funciones conocidas de EnvZ requiere OmpR (89). OmpF es preferencialmente expresado mediante baja osmolaridad, mientras que la expresión de OmpC es mediante el incremento de osmolaridad con una disminución de la producción de OmpF (105).La regulación diferencial está medida por varias formas o estados de OmpR una forma, activa a OmpF y la otra activa a OmpC (89,36)

EnvZ es la responsable de mediar la conversión de OmpR dentro de las diferentes formas (89); sin embargo EnvZ requiere para la expresión de ambas porinas OmpF y OmpC (29,30,66).

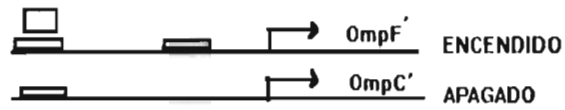
Al igual se observó que las mutaciones en OmpR causa disminución o la nula expresión de OmpC.

La ausencia de OmpC en *Shigella* es causada por la reducción de virulencia, donde OmpF no está relacionada en esta, mientras que en *Salmonella typhimurium* observaron que cuando hay mutación en OmpC no afecta la virulencia

La mutaciones que disminuyen la expresión de OmpC causan el aumento en la expresión de OmpF. La mutación que incrementa la expresión de OmpC causa baja expresión de OmpF. Sin embargo la disminución de expresión de OmpF parece ser dominante. Si hay dominio de OmpF, el fenotipo OmpC + refleja una normal regulación de los genes de las porinas (48).



Baja Osmolaridad



Alta osmolaridad

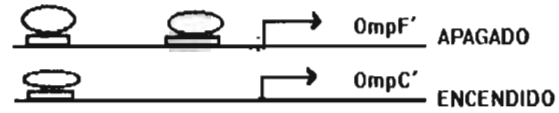


TABLA 2. Modelo para la regulación transcripcional de la expresión de las porinas por OmpR y EnvZ

III.8 Un ejemplo bien conocido de genes relacionados con virulencia y patogenicidad de *Salmonella* es el sistema *PhoP/PhoQ*

Que es un sistema regulador que consiste de 2 componentes bacterianos (63). De un sensor cinasa asociada a membrana (*PhoQ*) y a un regulador transcripcional citoplasmático (*PhoP*).

Esta regulación en la transcripción de las diferencias múltiples de *PhoP* -activado y los genes reprimidos-*PhoP*, están originalmente caracterizados en ratones BALB/C infectados con *Salmonella typhimurium*.

Este operón puede modular las importantes funciones de virulencia incluyendo la supervivencia dentro de macrófagos (63,22) y la resistencia de péptidos antimicrobiales endógenos de la familia (defensina-cryptdina) (22,64).

La mutación nula de *PhoP/PhoQ* es efectiva como vacuna en un modelo animal.

La delección de los genes *PhoP/PhoQ* en la cepa auxotróficas de *Salmonella typhi* (514Ty) se observaron en cepas Ty445.

Los genes activados de *PhoP* han sido implicados en la inhibición del procesamiento de antígeno por *Salmonella typhimurium in vitro*.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la UIMI se ha observado que el patrón electroforético de los extractos protéicos crudos de *Salmonella typhi* CVD908, una mutante *aroC aroD*, son diferentes a los de *Salmonella typhi* Ty2. En condiciones usuales de cultivo, *Salmonella typhi* CVD908 carece de la banda que corresponde a OmpC y en inmunoelectrotransferencia, utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra una región expuesta de esta proteína (L6), no se revela la banda que corresponde a OmpC.

Existen diversas razones que pueden explicar la falta en la detección de esta proteína. Es posible que la proteína se produzca en muy bajas cantidades, o bien que *Salmonella typhi* CVD908 contenga alguna mutación, por lo que tal vez esta diferencia fenotípica contribuya al distinto comportamiento biológico de ambas cepas.

Debido a que esta cepa de *Samonella* se obtuvo mediante métodos de ingeniería genética que involucran recombinación homóloga, existe la posibilidad de que se haya causado una delección inesperada en el gen OmpC. Por otro lado, *Salmonella typhi* CVD908 contiene delecciones en los locus *aroC* y *aro D*. Estas mutaciones, que impiden que la bacteria sintetice aminoácidos aromáticos, probablemente influyen de manera indirecta en el grado de expresión de la proteína OmpC, o bien es probable que se produzca anormalmente el RNA mensajero de esta proteína en *Salmonella typhi* CVD908.

Por otro lado, el hecho de que *Salmonella typhi* CVD908 exprese de manera deficiente OmpC, ofrece la oportunidad de realizar ensayos para determinar el papel que desempeña la OmpC, al realizar inmunizaciones en ratones BALB/c con la *Salmonella typhi* Ty2 y CVD908 para comparar la respuesta entre una y otra, así como conocer que tanto de la respuesta está dirigida a la proteína OmpC en *Salmonella typhi* Ty2.

V. OBJETIVO

Determinar el papel de la porina OmpC en la inmunogenicidad que desarrolla la cepa atenuada *Salmonella typhi* CVD908 en ratones BALB/c

VI. HIPOTESIS

La inmunización de ratones con la *Salmonella typhi* Ty2 genera mayor protección al reto con *Salmonella typhi* Ty2, comparado con los ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908, ya que ésta última tiene una baja expresión de la proteína OmpC y ésta juega un papel muy importante en la respuesta contra *Salmonella typhi*.

VII. MATERIAL Y METODOS

A). BACTERIOLOGICOS

A.1 Cepas bacterianas.

Salmonella typhi Ty2 de la colección de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMI).

Salmonella typhi CVD908. Mutante Δ aroC Δ aroD (donada por el Dr. Myron Levine, Center for Vaccine Development, Universidad de Maryland, Baltimore, USA) .

Salmonella typhi CVD908 Ω Mgp63. Contiene integrado en el *locus aroC* el gene que codifica para la GP63 de *Leishmania mexicana* (34) (construida en la UIMI).

Escherichia coli UH302. Cepa mutante deficiente en porinas (10) (donada por el Dr. U. Henning).

pST13. fue construida por el Dr. Felipe Cabello. CVD908 - pST13, está transflectada con el plásmido pST13 el cual tiene el gen que codifica para la porina OmpC, y el gen que codifica para la resistencia a ampicilina.

Se realizó la caracterización bioquímica de todas las cepas en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA.

A.2 Cultivo de Bacterias.

Las cepas bacterianas se crecieron en medio de Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BIOXON) durante toda la noche y se realizó una resiembra al día siguiente sustituyendo el medio anterior por medio nuevo, a 37°C con agitación constante en un Environ-Shaker (Lab-Line). Las cepas se crecieron hasta lograr una fase logarítmica (0.6 de D.O a 540 nm).

A.3 Determinación de la dosis letal al 50% (DL₅₀).

El cultivo bacteriano de *Salmonella typhi* Ty2, fue cosechado en la fase de crecimiento logarítmico se ajusto a una concentración de 10^9 bacterias/ml (0.6 de D.O a 540 nm) partiendo de esta suspensión, empleando para ello un factor de dilución constante, se preparan las siguientes concentraciones: 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 1.6×10^4 , 3.2×10^3 y 6.4×10^2 bacterias/ml, 0.5 ml de las bacterias resuspendidas en mucina (mucina gástrica de cerdo al 5% en solución salina estéril) se inocularon por vía intraperitoneal (i.p) a grupos de 5 ratones BALB/c de 18 a 20 g de peso. Como grupo testigo se emplearon ratones inyectados con 0.5 ml de mucina.

Para *Salmonella typhi* Ty2 se registró la sobrevivencia tres días después de la administración del inóculo bacteriano.

La DL₅₀ se determinó de acuerdo al método de Reed y Muench (81), según la siguiente fórmula:

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

en donde:

Log dil <50% = Logaritmo de la dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

$$\text{Distancia Proporcional} = \frac{50\% - <50\%}{>50\% - <50\%}$$

50%= dilución de la concentración que mata al 50% de la población.

<50%= dilución inmediata inferior a la dilución que mata al 50% de la población.

>50%= dilución inmediata superior a la dilución que mata al 50% de la población.

B) ANIMALES DE LABORATORIO.

Ratones BALB/c de 20 g aproximadamente, de ambos sexos.

Conejo Nueva Zelanda.

Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

C) OBTENCION DE SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO CONTRA LA PROTEINA Omp C RECOMBINANTE DE *Salmonella typhi*.

Se obtuvo suero hiperinmune de conejo contra la proteína OmpC recombinante de *Salmonella typhi*. Se utilizó un conejo de la cepa Nueva Zelanda el cual fue inmunizado por vía interescapulovertebral con OmpC recombinante.

Se le administró una dosis cada semana de 1 mg/ml en 500 ml de SS mezclados con 500 ml de adyuvante incompleto de Freund (SIGMA) durante 12 semanas. El conejo se sangró el día cero para obtener el suero control. La titulación de

anticuerpos se realizó en la semana 12 mediante ELISA, para lo cual las placas se sensibilizaron con 10 mg/ml de proteína OmpC recombinante en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 1 hr a 37°C. La placa se bloqueó con PBS-leche al 5% por 2 hr a 37°C.

El suero de conejo se agregó por duplicado en cinco diluciones (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700 y 1:8100) y se incubó por 1 hr a 37°C.

Finalmente, la placa se incubó con un suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (SIGMA) durante 1 hr a 37°C. Posteriormente se agregó el substrato o-fenilendiamina H₂O₂ se estabilizó el color con H₂SO₄ 2N y se leyó la D.O. a 490 nm. Entre las incubaciones, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01%. Para utilizar este suero hiperinmune en la evaluación de la expresión de OmpC por *Salmonella typhi* CVD908, se purificó IgG mediante una columna afinidad de proteína A de *Staphylococcus aureus*, de acuerdo al método descrito (37,52)

D) ANALITICOS

D.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de las PME y extracto crudo de cada una de las diferentes cepas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB instruments) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo al método de Laemmli (56). Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, b-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. El gel superior contenía 2.5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel separador contenía 12% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en

amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. Las bacterias se ajustaron espectrofotométricamente a 1×10^9 /ml.

Las muestras se resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 8.8, SDS al 2%, b-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%), las muestras se hirvieron por 10 min.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante aproximadamente 5 hrs empleando 5 v/cm^2 , y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.195 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 1 hr en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fue transparente.

D.2 Inmunoelctrotransferencia ("Western blot").

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 m (Micron Hybond-C de Amersham), en una unidad de transferencia electrónica (LKB 2005 TRANSPHOR) por 3 hrs a 0.5 A de acuerdo al método de Towbin (99). Posterior a esto el papel de nitrocelulosa se bloqueó por 1 hr con PBS-leche al 5%, y después se lavó tres veces con PBS y otras tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y se puso en contacto con un anticuerpo monoclonal contra la porina OmpC de *Salmonella typhi* (55) (donado por el Dr. Felipe Cabello. New York Medical College, Valhalla, NY, USA) . El anticuerpo se empleó en una dilución 1:1000 en PBS-leche al 5% durante 1 hr a 37°C y se procedió a lavar en las mismas condiciones que se mencionan arriba y se adicionó el segundo anticuerpo revelador que fue un anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma)

diluido 1:1000 durante 45 min. La reacción se reveló con a 4-Cloro naftol-H₂O₂. Todo esto se realizó a una temperatura de 37°C.

D.3 Citometría de Flujo (FACS)

La presencia de la proteína OmpC en la superficie de *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* Ty2 se determinó por inmunofluorescencia indirecta empleando un suero hiperinmune de conejo inmunizado con OmpC recombinante y un anticuerpo monoclonal contra OmpC de *Salmonella typhi* (55). Como segundo anticuerpo se empleó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína. La intensidad de fluorescencia se determinó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View. C.A.) analizando 10³ bacterias de cada una de las muestras.

D.4 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Se realizó de acuerdo al método de Engvall (16). Se recubrieron placas para microtitulación con 15 µg de un proteína OmpC recombinante, para lo cual se resuspendió en amortiguador de carbonatos pH 9.5. y se incubó por 2 hrs a 37 °C y posteriormente se dejaron toda la noche a 4 °C. Para bloquear se adicionaron 100 ml/pozo de una solución de PBS-leche al 5%, por 1 hr. Se le adicionó el primer anticuerpo, que consistió en el suero de los grupos de ratones inmunizados de acuerdo al esquema anteriormente mencionado. Los sueros se emplearon diluidos 1:200 en PBS-leche 5%. Se incubó la placa a 37 °C por 2 hrs, y se adicionó el segundo anticuerpo que fue un conjugado IgG de ratón diluido 1:1000 y se incubó 1 hrs. Se adicionó como substrato o-fenilendiamina H₂O₂ de un stock de 6mg/12ml, para

preparar la mezcla se empleó amortiguador de citratos de pH 5.6. Se detuvo la reacción a los 10 min de incubación adicionando 50 ml por pozo de H₂SO₄. Se midió la absorbancia a 492 nm. Entre cada paso se realizaron 4 lavados con una mezcla de PBS-Tween 20 al 0.1%

E). INGENIERIA GENETICA.

La manipulación de DNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook (84).

E.1 Extracción de DNA genómico

Se realizó a partir de 1×10^9 bacterias cosechadas (utilizando *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908, *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63, UH302, UH302pST13), dejándolas crecer en medio BHI A 37°C 24 hrs y con agitación orbital a 200 rpm después de este tiempo se centrifugó a 3500 rpm se obtuvo la pastilla y se adicionó 1 ml de de TRIzol (GIBCO BRL) 5 minutos después, se adicionó 200 μ l de cloroformo, se agitó por 15 segundos y se incubó por 2-3 minutos, tras este tiempo se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C, se removió la fase acuosa y se siguió la técnica para la fase orgánica se agregó 300 μ l de etanol 100% , se agitó suavemente y se dejó en reposo por 2-3 minutos, se centrifugó a 2000 x g por 5 minutos a 4°C, se removió toda la fase orgánica, a la pastilla se le hicieron 2 lavados con 1 ml citrato de sodio 0.1M entre cada lavado se dejó la pastilla en la solución con agitación constante a temperatura ambiente por 30 minutos, después del paso de los 30 minutos se centrifugó a 2000 x g por 10 minutos, después de esto se adicionó 1.5 - 2 ml de alcohol al 75% se dejó de 10-20 minutos a temperatura ambiente.

Tras este lapso de tiempo se centrifugó a 2000 x g por 5 minutos a 4°C, se decantó el alcohol y la pastilla se secó a vacío por 5-10 minutos, se añadió 300-600 µl de hidróxido de sodio 8mM se dejó a 56-60°C en baño maria por 20 minutos, se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos, se decantó y la pastilla se resuspendió en 50µl de agua estéril.

E.2 Cuantificación de DNA

El DNA se cunificó en el espectrofotómetro a 260 nm. Las muestras se diluyeron 1:100 en agua inyectable. Las concentraciones de DNA se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$[\] \text{ de DNA} = 50 \text{ ug/ml} \times \text{factor de dilución} \times \text{D.O a 260 nm.}$$

$$40\text{ug} = 1 \text{ unidad de absorbancia}$$

E.3 Detección del gen por la técnica de "Southern blot".

La sonda empleada en la hibridación se preparó de acuerdo al método de "Random Primer". Aproximadamente 10µg de DNA, se desnaturalizó por ebullición durante 10 minutos y se transfirió a hielo por 5 minutos, posteriormente se adicionaron 3ml de mezcla de nucleótidos (sin CTP), 2 ml de amortiguador para el fragmento Klenow, 5 ml de a-CTP marcada con 32-P, 1 ml de dicha enzima y se llevó a 20 ml de reacción con agua estéril. Se incubó 2 hrs a 37 °C. Después de los anterior la sonda marcada se purificó mediante una columna de Sephadex G-50 (sigma).

La hibridación de DNA genómico con una sonda de DNA plasmídico se realizó de acuerdo al método descrito por Southern (90). Se digirieron 10 µg de DNA cromosomal purificado a partir de *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMgp63, toda la noche con KpnI y se corrió un gel de agarosa al 1% conteniendo bromuro de

etidio (0.5 mg/ml) en TAE 1X. El gel se sumergió en solución desnaturalizante de DNA por 45 min (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 N), con agitación constante. Se lavó el gel con agua desionizada y luego se neutralizó, con solución de lavado (Tris 1M pH 7.4, NaCl 1.5 M) por 30 min a temperatura ambiente, se repitió la operación por 15 min. Se transfirió el DNA a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad empleando como amortiguador de transferencia una solución de 10X SSC. Se lavó el papel con una solución 10X de SSC. La membrana de nitrocelulosa con el DNA fue expuesta en un entrecruzador (Stratagene UV, StratalinkerTM, 1800). La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X, DENHARDT 10%, SDS 20%), y la sonda radioactiva previamente desnaturalizada (fragmento 0.8 Kb KpnI-KpnI del plásmido pST13) incubando toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 15 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso en una película (Kodak) durante 24 hrs.

E.4 Extracción de RNA mensajero

Se extrajo RNA acuerdo al método descrito por Chomczynski (8). Una alícuota de 200 µl de suspensión bacteriana (1×10^8 bacterias/ml) se diluyó en 200 µl de TRIzol (GIBCO BRL) (1:1) (Isotiocianato de guanidinio) se mezcló e incubó a temperatura ambiente 5 minutos. Se agregaron 40 µl de cloroformo (200 µl por cada ml de TRIzol utilizado), se mezcló vigorosamente por 15 segundos.

Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 10,000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo y se adicionaron 100 µl de isopropanol (500 µl por ml de TRIzol utilizado). Se mezcló vigorosamente por 10 segundos y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugaron las muestras a 10,000 xg por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 75% (1 ml de etanol por cada ml de TRIzol utilizado). Se mezcló vigorosamente por 10 segundos y se centrifugó a 7,000 xg por cinco minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó al vacío. La pastilla conteniendo el RNA se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNAsas y se encubó a 56 °C durante 30 minutos. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman) a 260 nm, haciendo una dilución 1:100 de la muestra.

E.5 Detección de mRNA, por "Northern blot".

El RNA total purificado por la técnica de Chomczynski (8) utilizando TRIzol, se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 nm, y se corrió en un gel de agarosa al 1% (1 gr de agarosa, amortiguador de corrimiento 1X, formaldehído 2.2 M) 50 mg de RNA total, se realizó corrimiento previo de 5 min a 5 v/cm². Se corrieron las muestras hasta 3/4 de el gel total. Se transfirió cada muestra por difusión capilar a una membrana de nitrocelulosa y se expuso en un entrecruzador (Stratagene UV, StratalinkerTM, 1800).

La hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X , DENHARDT 10%, SDS 20%), y la sonda radioactiva previamente desnaturalizada, fragmento 0.8 Kb KpnI-KpnI del plásmido pST13, encubando toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana 5 veces durante 15 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso en una película (Kodak) durante 24 hrs.

F). METODOS INMUNOLOGICOS

F.1 Esquema de inmunización.

Número de ratones	10
Grupo de ratones	3
Edad de los animales	2 meses
Cepas utilizadas	<i>Salmonella typhi</i> Ty2, <i>Salmonella typhi</i> CVD908, <i>Salmonella</i> <i>typhi</i> CVD908ΩMgp63
Administración	Via oral (v.o)
Tiempo de administración	a) 10 minutos antes de administrar la bacteria se administraron 100 µl de bicarbonato de sodio b) Posteriormente se les dió 1×10^{-8} bacterias (100µl)
Monitoreo de los animales	Los días cero, siete y treinta y cinco.

F.2 Ensayos de protección.

Para estos ensayos se utilizaron siete grupos de diez ratones BALB/c. Seis grupos fueron inmunizados con 1×10^8 bacterias de las cepas *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMgp63 en 100µl de PBS (dos grupos por cepa). Al séptimo grupo se le administró 100µl de PBS, el esquema de inmunización fue como ya se mencionó. Después de la última dosis se dejó pasar una semana para después retarlos por inoculación i.p. con la DL50 de *Salmonella typhi* Ty2 que es de 1×10^6 en 100 ml de

mucina al 5% (Type II Sigma). Los ratones se observaron durante 10 días después del reto.

F.3 Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación se realizaron de acuerdo al método descrito con anterioridad (33). Grupos de 10 ratones BALB/c se inmunizaron con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMgp63 como se mencionó anteriormente. 8 días después de la última dosis se preparó una suspensión de esplenocitos por medio de disgregación del bazo en tela de organza. Los eritrocitos se eliminaron mediante el empleo de un amortiguador de lisis (0.15 M de NH₄Cl, 1.0 mM de KHCO₃, 0.1 Mm de Na₂EDTA, pH 7.4) durante 3 min. Los esplenocitos se lavaron con solución de HANKS (Gibco), y se ajustaron a 30x10⁶/10 ml de RPMI complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina y piruvato de sodio.

Las células se colocaron en placas de microcultivo de 96 pozos y fondo plano (NUNC) y se cultivaron en presencia de 50 µg/ml de proteína OmpC recombinante de *Salmonella typhi*. Los cultivos se incubaron 5 días a 37°C y 5% de CO₂. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo se agregó 1 µCi de ³H-Timidina (Amersham, Int. Berkshire, England) por pozo. Las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio y la incorporación del material radiactivo se cuantificó en un contador de Centelleo Líquido (Beckman LS 5801, Beckman, Ins. Stanford CA, USA). Los resultados se encuentran expresados en c.p.m.

VIII. RESULTADOS.

Comportamiento electroforético de *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

En la **Figura No1** se presenta el análisis de PME de las cepas estudiadas en donde revela que *Salmonella typhi* Ty2 (Carril 1) presenta la banda que corresponde a *OmpC*. Se observa una clara diferencia entre los patrones de *Escherichia coli* UH302-pST13 (carril 2), *Escherichia coli* UH302 (carril 3) y *Salmonella typhi* CVD908 (carril 5) en la nula expresión de la banda de 36 KDa, en tanto que en la cepa *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63 (carril 4) sí se observa.

Detección del gen *ompC* en *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

Se realizó un ensayo de "Southern blot" para lo cual se digirió DNA cromosomal de las diferentes cepas de *Salmonella typhi* con la enzima KpnI y, después de someterlas a electroforesis en agarosa, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y a hibridación con una sonda del fragmento KpnI-KpnI del plásmido pST13. En la **Figura No. 2** se presenta el resultado. El carril 1 corresponde al plásmido pST13 sin digestión.

El carril 2 muestra el fragmento KpnI-KpnI de 0.8 Kb. *Escherichia coli* UH302 (carril 3) no presenta la señal que corresponde a *ompC*. Mientras que *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908 Ω Mgp63 presentan la señal que corresponde a *ompC*. En el carril 6 se presenta la hibridación de *Salmonella typhi* CVD908 transformada con pST13. Se obtuvo una señal débil en el tamaño que corresponde al fragmento KpnI-KpnI, debido a probablemente a que se corrió una cantidad escasa de DNA. Sin embargo, se observa claramente que *Salmonella typhi* CVD908 tiene el gene que codifica para *ompC*.

Detección de RNA mensajero de la porina OmpC en *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

La determinación de RNA mensajero se realizó mediante la técnica de "Northern blot". En la **Figura No. 3** se observa que la cepa *Escherichia coli* UH302 no produce RNA mensajero de OmpC (carril 1), en tanto que el resto de las cepas examinadas (*Salmonella typhi* Ty2, CVD908 y CVD908 Ω Mgp63) si lo hacen. La señal más intensa se encontró con *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63 (carril 3).

Expresión de la proteína OmpC en *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

Una vez que se estableció que *Salmonella typhi* CVD908 contiene funcional el gene *ompC*, se precedió a identificar a la proteína. En la **Figura No. 4** se presentan dos inmunoelectrotransferencias ("Western blot") que demuestran que todas las cepas examinadas producen la proteína OmpC.

Para comparar el grado de expresión de OmpC en *Salmonella typhi* Ty2 y en *Salmonella typhi* CVD908 se realizó citofluorometría. La **Figura No. 5** presenta una comparación entre los resultados obtenidos entre la (**figura C**) y la (**figura D**). En la (**figura C**) se presentan los resultados utilizando un suero hiperinmune de conejo y en el (**figura D**) se presentan los resultados que se obtuvieron al revelar con un anticuerpo monoclonal contra la porina OmpC. Estos resultados confirman que las dos cepas de *Salmonella typhi* (Ty2 y CVD908) producen la proteína OmpC. Se observa que en ambos casos, utilizando las mismas condiciones de cultivo para ambas cepas y el mismo número de células, la fluorescencia es menor en CVD908, lo que demuestra que existe menor expresión de Ompc en la superficie bacteriana de esta cepa.

Inmunogenicidad de *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908ΩMgp63.

Una vez que se estableció que *Salmonella typhi* CVD908 expresa menor cantidad de OmpC, se decidió comparar la inmunogenicidad de estas cepas. Se inmunizaron por vía oral ratones BALB/c con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 o CVD908ΩMgp63 y se determinaron anticuerpos contra la porina OmpC por ELISA. La **Figura No. 6** presenta los resultados del promedio de experimentos en el que se utilizó el suero de ratón diluido 1:200. Se observa que los animales que fueron inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 tienen menor título de anticuerpos contra la porina OmpC que aquellos que fueron inmunizados con *Salmonella typhi* Ty2 o *Salmonella typhi* CVD908ΩMgp63.

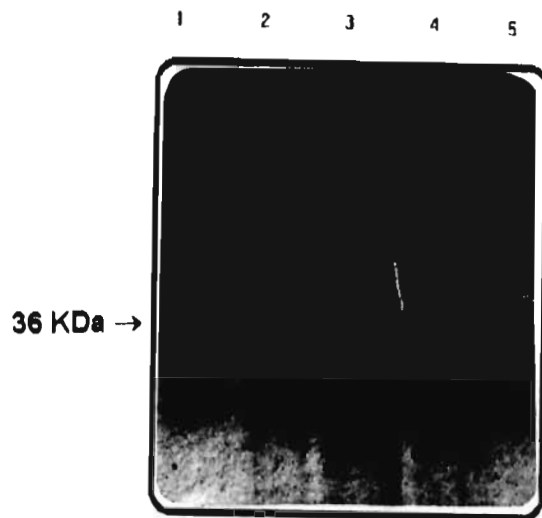
Se evaluó la respuesta linfoproliferativa *in vitro* contra la porina OmpC, que se genera inmunizando por vía oral con las diferentes cepas de *Salmonella typhi*. En la **Figura No. 7** se presenta el resultado promedio de experimentos en el que se purificaron esplenocitos de ratones inmunizados con las diferentes cepas bacterianas y que fueron cultivados con Ompc recombinante. Se agregó polimixina B al cultivo para eliminar la proliferación inducida por LPS contaminante. Se observa que la mejor respuesta proliferativa se presentó en los ratones que fueron inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908ΩMgp63.

Por último, se comparó la protección que inducen las diferentes cepas de *Salmonella typhi*, para lo cual se inmunizaron por vía oral grupos de ratones con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 o CVD908ΩMgp63 y se retaron con 100 DL₅₀ de *Salmonella typhi* Ty2 resuspendida en mucina por vía intraperitoneal.

En la **Tabla No.3** y la **Figura No.8** se presenta el resultado promedio de tres experimentos independientes. Puede observarse que cuando se inmunizó con *Salmonella typhi* Ty2, CVD908 o CVD908ΩMgp63 y se retó con 1×10^6 bacterias resuspendidas en mucina administradas i.p. (*Salmonella typhi* Ty2) se presentó menor sobrevida en los grupos de CVD908 y CVD908ΩMgp63. En cambio, cuando se retó con 1×10^5 bacterias no se observaron diferencias entre los diferentes grupos.

COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

FIGURA 1

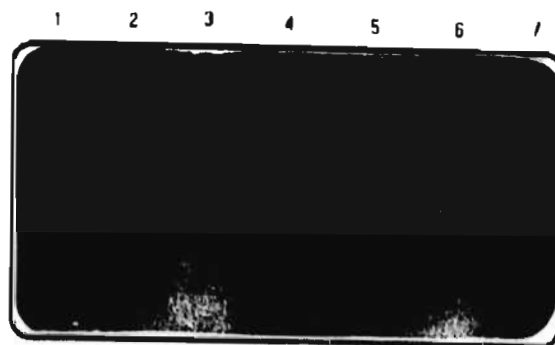


La electroforesis de proteínas de membrana externa de cada una de las diferentes cepas se realizó en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos.. El gel contenía 12% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida y 0.19% de SDS. Los geles se tiñeron en azul de Coomasie R-250.

En el carril 1) *S. typhi* Ty2; 2) *E. coli* UH302-PST13; 3) *E. coli* UH302; 4) *S. typhi* CVD908 Ω Mgp63; 5) *S. typhi* CVD908

DETECCION DEL GEN OmpC EN *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908
y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

FIGURA 2



Se realizó por la técnica de "Southern blot". Se digirieron 10 μ g de DNA con KpnI, se corrió un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, se llevó a cabo la hibridación y se puso en una película (Kodak) durante 24 horas.

En el carril 1) pST13 sin digerir; 2) fragmento KpnI-KpnI de pST13; 3) *E.coli* UH302; 4) *S.typhi* CVD908 Ω Mgp63; 5) *S. typhi* CVD908; 6) *S. typhi* CVD908-pST13; 7) *S. typhi* Ty2.

DETECCION DE RNA MENSAJERO DE LA PORINA OmpC EN *Salmonella typhi*
Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

FIGURA 3

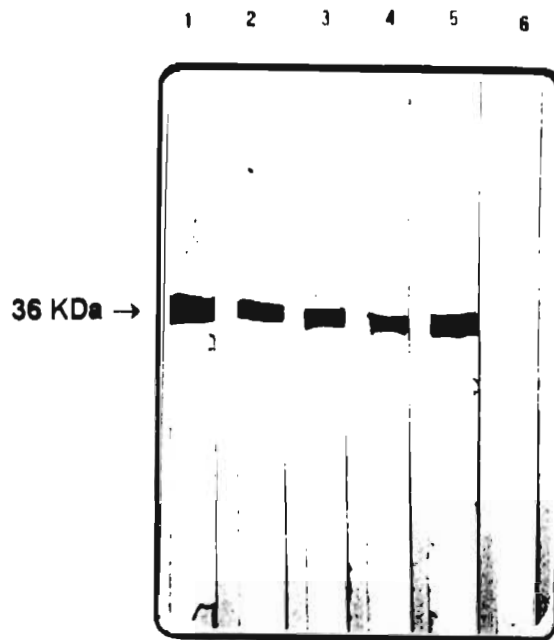


Se realizó un "Northern Blot", aislando RNA mensajero siguiendo la técnica de Trizol. El RNA se cuantificó en el espectrofotómetro y se sometió a electroforesis en agarosa al 1%. Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, y se expuso en una película durante 24 horas.

En el carril 1) *E. coli* UH302; 2) *S. typhi* CVD908; 3) *S. typhi* CVD908 Ω Mgp63; 4) *E. coli* UH302-pST13; 5) *S. typhi* Ty2

EXPRESION DE LA PROTEINA OmpC en *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* CVD908 Ω Mgp63.

FIGURA 4

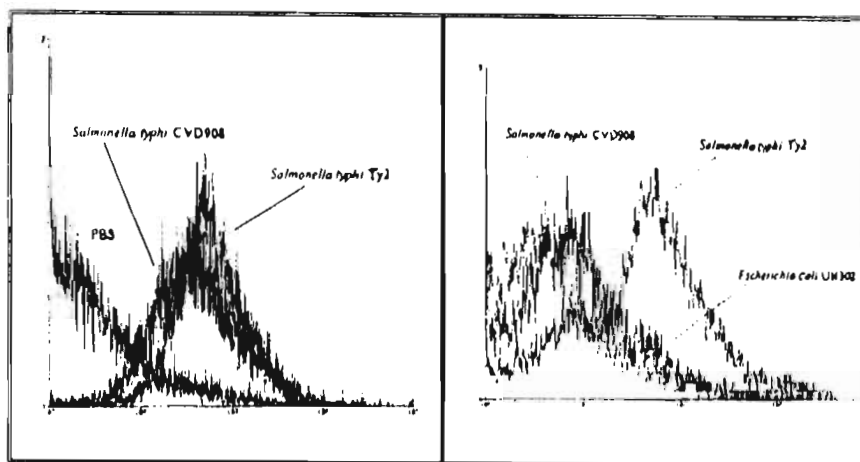


Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ . Posterior a esto el papel de nitrocelulosa se bloqueó por 1 hora con PBS-leche al 5% y se puso en contacto con un anticuerpo monoclonal contra la porina OmpC de *S. typhi*. El anticuerpo se empleó en una dilución 1:1000 en PBS-leche al 5% durante 1 hora a 37 grados, después de hacer los lavados adecuados, se añadió el segundo anticuerpo (anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:1000 durante 45 minutos). La reacción se reveló con α 4-cloro naftol-H₂O₂.

En el carril 1) *S. typhi* Ty2; 2) *S. typhi* CVD908 Ω Mgp63; 3) *S. typhi* CVD908; 4) OmpCr; 5) UH302-pST13; 6) UH302.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE OmpC EN *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908, POR CITOFLUOROMETRÍA

FIGURA 5



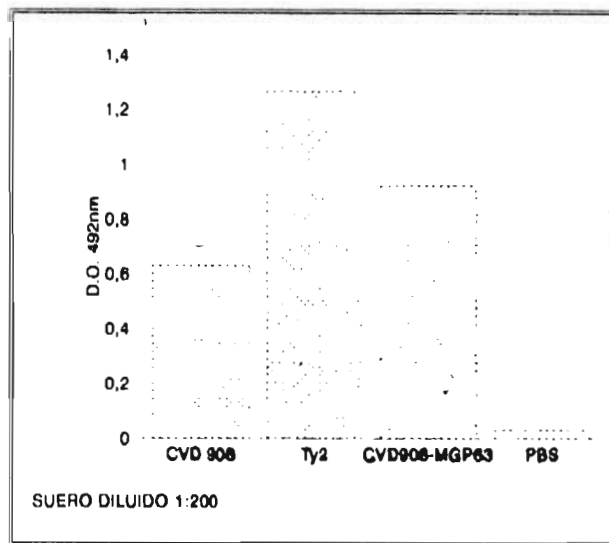
La presencia de la proteína OmpC en superficie de las cepas *S. typhi* Ty2 CVD908, se determinó por inmunofluorescencia indirecta empleando un suero hiperinmune de conejo inmunizado con OmpCr y un anticuerpo monoclonal. Como segundo anticuerpo se empleó inmunoglobulina de cabra anti-IgG de ratón o conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

Figura C → Análisis de un anticuerpo policlonal de conejo contra OmpC de *S. typhi*.

Figura D → Análisis de un anticuerpo monoclonal contra OmpC de *S. typhi*

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA OmpC EN RATONES
INMUNIZADOS CON *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908,
Salmonella typhi, CVD908ΩMgp63.

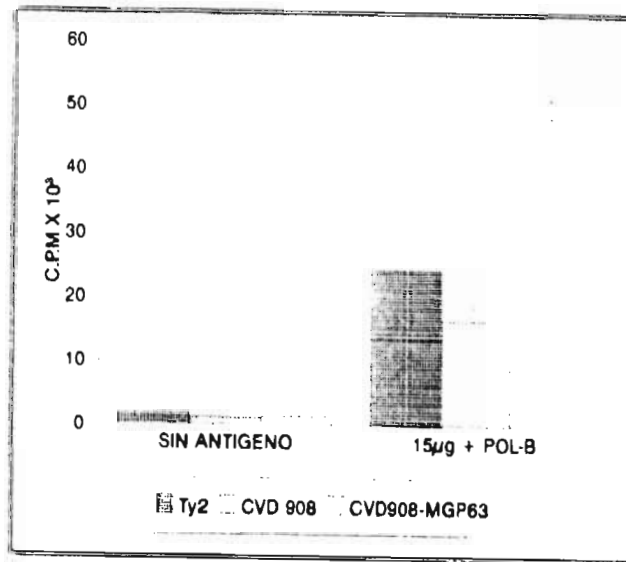
FIGURA 6



La ELISA se realizó utilizando un amortiguador de carbonatos y con 15µg de OmpCr. Para bloquear se añadieron 100 µl por pozo de una solución PBA-leche 5% por 1 hora. Se adicionó el primer anticuerpo de suero de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908, *S. typhi* CVD908 *S. typhi* CVD908ΩMgp63; se empleó una dilución 1:200 en PBS-leche 5%. Se incubó la placa por 2 hora a 37°C. Se empleó como segundo anticuerpo anti IgG de ratón utilizando una dilución 1:1000 e incubando por 1 hora. Se utilizó como sustrato OPD.

RESPUESTA DE PROLIFERACION DE CELULAS EFECTORAS CONTRA OmpC
INDUCIDA POR *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908, *Salmonella typhi*,
CVD908 Ω Mgp63.

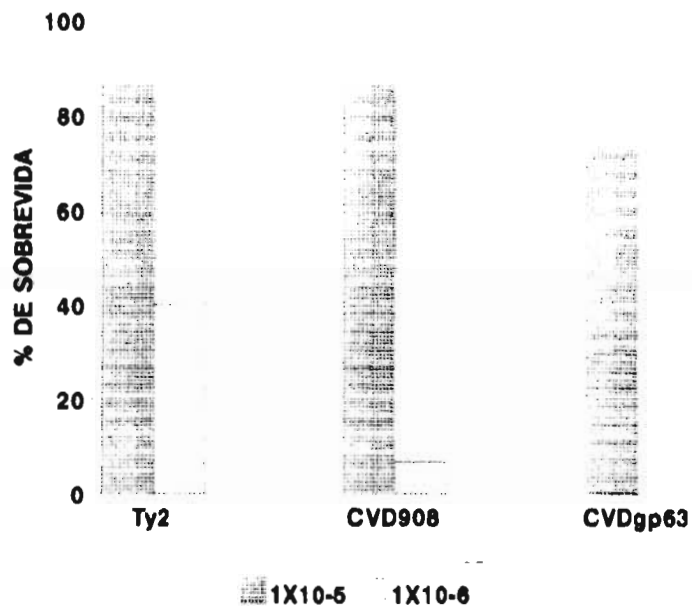
FIGURA 7



A 10 grupos de ratones BALB/Cse inmunizaron con *S. typhi* Ty2, *S. typhi* CVD908, *S. typhi* CVD908 Ω Mgp63, se sacrificaron y se obtuvo los esplenocitos estos se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos a una concentración de 2×10^5 se añadió 50 μ g/ μ l de OmpCr de *S. typhi*. Se incubaron 5 días 37 °C y 5% de CO₂ Dieciocho horas antes de terminar la incubación se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada por pozo. La incorporación del material radioactivo se cuantificó en contador de centelleo líquido. Los resultados se encuentran expresados en c.p.m.

RESPUESTA DE PROTECCION DESPUES DE LA INMUNIZACION CON *Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908, *Salmonella typhi*, CVD908ΩMgp63 Y RETANDO CON *Salmonella typhi* Ty2

FIGURA 8



Para estos ensayos se utilizaron siete grupos de diez ratones BALB/C. Seis grupos de ratones fueron inmunizados con 1×10^8 bacterias de la cepa *S. typhi* Ty2, *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CVD908ΩMgp63 en 100µl de PBS (dos grupos por cepa). Al séptimo grupo se le administro 100µl de PBS, de acuerdo al esquema descrito en Material y Métodos. Una semana después de la última dosis se retaron por inoculación intraperitoneal con 1×10^5 y 1×10^6 bacterias de *Salmonella typhi* Ty2 en 100µl de mucina al 5%. Se observó la sobrevivencia durante 10 días después del reto.

Sobrevivencia de ratones BALB/c inmunizados con tres cepas diferentes de *Salmonella typhi* (*Salmonella typhi* Ty2, *Salmonella typhi* CVD908, *Salmonella typhi* CVD908ΩMgp63) al reto con la cepa Ty2.

TABLA 3.

% de Supervivencia					
Cepas	DL ₅₀	Primer experimento	Segundo experimento	Tercer experimento	Promedio total
Ty2	1x10 ⁵	80 4/5	90 9/10	90 9/10	86.6
	1x10 ⁶	40 2/5	40 4/10	40 4/10	40
CVD908	1x10 ⁵	80 4/5	90 9/10	90 9/10	86.6
	1x10 ⁶	0 0/5	10 1/10	10 1/10	6.66
CVDgp63	1x10 ⁵	80 4/5	80 8/10	60 6/10	73.3
	1x10 ⁶	20 1/5	20 2/10	10 1/10	16.6

IX. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se reporta que una cepa atenuada de *S. typhi*, que contiene pérdidas en los loci *aroC* y *aroD*, expresa de manera deficiente la proteína OmpC. *S. typhi* CVD908 fue construida en el Centro para Desarrollo de Vacunas (UBAM, Baltimore, MD, EUA) mediante técnicas de ingeniería genética utilizando recombinación homóloga (41). A partir del plásmido pKTN701, que contiene el origen de replicación R6K, se substituyó el alelo *bla* por el gene *cat* que confiere resistencia al cloramfenicol y se insertó el gene Δ *aroC* y el plásmido resultante se denominó CVD1019; cuando se insertó el gene Δ *aroD* el plásmido se denominó CVD1013. Con estos plásmidos se transformó *S. typhi* Ty2. A La cepa resultante se le denominó CVD908. En ensayos clínicos fase I esta cepa resultó ser inmunogénica y segura (94).

Considerando que *S. typhi* CVD908 se obtuvo utilizando plásmidos que tienen la propiedad de recombinar de manera homóloga en el cromosoma bacteriano, se decidió utilizar esta cepa como acarreador de antígenos heterólogos. Para lo cual el plásmido CVD1019 se modificó generando un sitio único de clonación (PstI) en medio del alelo Δ *aroC*, el plásmido resultante se denominó pGORBY (25). En pGORBY se insertó el promotor *pTac* y la región "polylinker" del plásmido pKK223-3, resultando el plásmido pM7. En el plásmido pM7 se insertó, bajo el control del promotor *pTac* el gene que codifica para la proteína principal del promastigote (gp63) de *Leishmania mexicana* y se transformó en *S. typhi* CVD908, dando lugar a *S. typhi* CVD908 Ω Mgp63 (34).

El análisis del perfil de PME de *S. typhi* Ty2, CVD908 y CVD908ΩMgp63 revela que hay diferencias en la expresión de OmpC entre estas cepas. *S. typhi* CVD908 expresa de manera deficiente la proteína de 36 KDa que pudiera corresponder a OmpC, en tanto que *S. typhi* CVD908ΩMgp63, de manera sorprendente, la presenta en forma normal. La identidad de esta proteína se confirmó por citofluorometría (FACS), utilizando el anticuerpo monoclonal contra OmpC. Sin embargo, para confirmar esto sería importante realizar electroforesis bidimensional y sensibilidad al fago P221 o PH51 cuyos receptores específicos son OmpC u OmpF (106).

En experimentos realizados anteriormente y que no se reportan en este trabajo se comprobó que el gene *ompC* se encuentra completo en las cepas analizadas. Esta es una observación importante pues como CVD908 se obtuvo por recombinación homóloga, existe la posibilidad de haber causado una pérdida inesperada en este locus. Como se explicó anteriormente, para obtener la cepa CVD908 se transformó *S. typhi* Ty2 con un plásmido que confiere resistencia al cloramfenicol.

Por lo tanto, también existe la posibilidad de haberse seleccionado cepas productoras de bajos niveles de OmpC debido a alguna otra alteración genómica. Sin embargo, el hecho de que *S. typhi* CVD908ΩMgp63, que proviene de CVD908, presente expresión de OmpC semejante a la observada en *S. typhi* Ty2, descarta esta posibilidad. Es interesante la observación de que *S. typhi* CVD908ΩMgp63 produce mayor cantidad de mRNA de OmpC que el resto de las cepas. Es importante hacer notar que esta cepa contiene un promotor foráneo (*pTac*) en medio del locus Δ *aroC* y que el gene *gp63* se encuentra insertado en contrasentido al promotor natural de *aroC*. Esto sugiere la posibilidad de un mecanismo regulatorio que controla simultáneamente la expresión de OmpC y *aroC* probablemente a nivel transcripcional o postranscripcional.

Para estudiar la relación de *aroC* y *aroD* en la expresión de OmpC, será necesario aislar ambos genes y realizar experimentos de transcomplementación en *S. typhi* CVD908 utilizando plásmidos compatibles.

Se conoce de manera parcial el mapa genómico de *S. typhi* Ty2 y se sabe que difiere notablemente del de otras especies como por ejemplo *S. typhimurium* LT2, pues contiene inserciones e inversiones (59). Se conoce la localización de *ompC* y *ompD* pero no se ha reportado la correspondiente a *aroC* o *aroD*. Sin embargo, en *S. typhimurium* ambos loci se encuentran separados por 1.5 min aproximadamente (85).

La expresión de las principales proteínas de membrana externa OmpF y OmpC en *E. coli* están reguladas a nivel transcripcional por los productos del operón OmpB, OmpR y EnvZ en respuesta hacia los cambios de osmolaridad en el medio (29,36). EnvZ es una proteína de membrana interna, que tiene actividad fosfatasa (23,58). OmpR es una proteína que está unida a DNA que reconoce secuencias en la región del promotor de ambas porinas OmpF y OmpC (50,65,73).

Además de que puede ser fosforilada por EnvZ y la actividad de transcribir a las porinas OmpF y OmpC. Se sugiere que EnvZ funciona como un sensor que retrotransmite la información para la activación transcripcional de OmpR, que controla la expresión de ambas porinas (23,13). Además, las funciones conocidas de EnvZ requieren de OmpR (89). OmpF es preferencialmente expresado mediante baja osmolaridad, mientras que la expresión de OmpC es mediante el incremento de osmolaridad con una disminución de la producción de OmpF (105).

La regulación diferencial está medida por varias formas o estados de OmpR una forma activa a OmpF y la otra activa a OmpC (36,5). EnvZ es la responsable de mediar la conversión de OmpR dentro de las diferentes formas (89,36). Sin embargo, EnvZ requiere para la expresión de ambas porinas OmpF y OmpC (29,30,66). Es muy probable que ninguno de los mecanismos descritos anteriormente se encuentre afectado en *Salmonella typhi* CVD908.

Se han descrito cepas mutantes de *S. typhi* que no expresan la porina OmpC y consecuentemente son resistentes al cloramfenicol (98). En experimentos realizados en la UIMI y no reportados en este trabajo se ha encontrado que *Salmonella typhi* CVD908 es más resistente al cloramfenicol que *Salmonella typhi* Ty2, lo cual es compatible con la hipótesis de que la proteína cuya expresión está disminuida es OmpC. Sobre todo porque *S. typhi* CVD908, al ser transformada con el plásmido pST13 se revierte a cloramfenicol sensible.

Todos los experimentos se realizaron utilizando BHI y las mismas condiciones de cultivo. Tomando en cuenta que casi una quinta parte de los aminoácidos que componen OmpC son aromáticos, la deficiente expresión de esta proteína pudiese deberse sólo a la escasez de estos aminoácidos, que CVD908 no es capaz de producir. Sin embargo, el hecho de que *S. typhi* CVD908 Ω Mgp63 recupere la expresión, descarta esta posibilidad. Sin embargo, es necesario explorar el comportamiento electroforético de estas cepas bajo diferentes condiciones de cultivo, como son temperatura, pH, osmolaridad y diferentes fuentes y proporciones de carbono o nitrógeno. Es posible que tanto *S. typhi* CVD908 como CVD908 Ω Mgp63, incrementen su virulencia y patogenicidad bajo determinadas condiciones de cultivo.

La inducción de anticuerpos contra la porina OmpC, inmunizando ratones con las diferentes cepas bacterianas, también es compatible con la menor expresión de OmpC en *S. typhi* CVD908. En varios experimentos independientes se encontraron menores D.O. por ELISA utilizando el suero a diluciones 1:200. Sin embargo, cuando los sueros se utilizan más concentrados no se observan diferencias en las D.O., lo que sugiere que la inmunización con *S. typhi* CVD908 sí induce anticuerpos contra OmpC; si bien, en menor proporción que Ty2 o CVD908ΩMgp63. Este resultado es esperado, si consideramos que la proteína OmpC se encuentra hacia el exterior bacteriano y puede ser captada por el receptor específico del linfocito B. Los resultados de activación de linfocitos son, no obstante, más difíciles de explicar. *S. typhi* Ty2 y CVD908 parecen inducir respuestas proliferativas de la misma magnitud, en tanto que *S. typhi* CVD908ΩMgp63 induce la mayor activación específica contra OmpC. Este resultado pudiese ser compatible con la mayor producción de RNA mensajero para esta proteína, presenta *S. typhi* CVD908ΩMgp63. Es posible que se produzca mayor proteína, pero que no sea exportada a la superficie bacteriana.

Los experimentos tendientes a evaluar la capacidad de generar protección de las diferentes cepas bacterianas no son concluyentes. Aunque la tendencia que se observa cuando se retó con 1×10^6 bacterias parece indicar que existe menor protección cuando se inmuniza con *S. typhi* CVD908 o CVD908ΩMgp63, las diferencias no son notables.

La observación que se presenta en el presente trabajo es importante, pues llama la atención sobre la necesidad de caracterizar ampliamente las cepas que se modifican mediante ingeniería genética y que se pretende sean utilizadas como vacunas.

X. REFERENCIAS.

1. Abul, k., Abbas, Andrew, H., Lichtman, and Jordan, S.P: Inmunología Celular y Molecular. México D.F. 2a Ed. pp. 226,274, 1995
2. Agüero, J., Mora, G., Mroczenski-wildey M., Fernández, M., Aron, L. and Cabello, F. Cloning expression and characterization of the 36 KDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microb. Pathogen.* 3:399-407, 1987.
3. Bentley, A.T; and P.E klebba. Effect of lipopolysaccharide structure on reactivity of antiporin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface. *J.Bacteriol.* 170: 1063-1068, 1988.
4. Benz, R. and Bauer, K. Permeation of hidrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* 176:1-19, 1988.
5. Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C., and Kumate, J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scan. J. infectol.* 25:73-80, 1993.
6. Calderon, I; S. R. Lobos, H. A. Rojas, C. Palomino, S. H. Rodriguez, and G. Mora. Antibodies to porin antigen of *Salmonella typhi* induced during typhoid infections in humans. *Infect. Immun.* 52, 209-212, 1986.
7. Chatfield S. N; R. A. Strugnell and G. Dougan. Live S. as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. *vaccine* 7: 495-498, 1989
8. Chomczynski, P., and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium tyocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.
9. Clements, J.D. and El-Morshidy, S. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and *Cholera, E.coli* related diseases. *Infect. Immun.* 1984, 46, 564-569

10. Cole, S., Sonnatag, I., Henning, U. Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12, of genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 149:145-150, 1982.
11. Cote, T.R., Convery, H., Robinson, D., Ries, A., Barret, T., Frank, L., Furlong, W., Horan, J., and Dwyer, D. J. Typhoid fever in the park: epidemiology of an outbreak at a cultural interphase. Community Health. 20:451-458, 1995.
12. Cowan, S., Schirmer, G., Rummel, G., Steiter, M., Ghosh, R., Pauptit, R., Jansonius, J. and Rosenbusch, J. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. Nature. 358:727-733, 1992.
13. Csonka, L. N. Microbiol. Rev. 53, 121-147, 1989.
14. Dougan, G; C. E. Hormaeche, and D.J. Maskell. Live oral S. vaccines: Potencial use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. Parasite Immunol. 9:151-160, 1987.
15. Dougan, G; L. Smith, and F. Heffron. Live bacterial vaccines and their application as carriers for foreign antigens. P. 271-299 In J.L. Bittle and F. L. Murphy (ed.), Vaccine biotechnology. Academic press, Inc; Orlando, Fla, 1989.
16. Engvall, e. and Perimann, P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) Immunochemistry 8:874-879, 1971.
17. Emoto, M., Naito, T., Nakamura, R., and Yoshikai, Y. Different appearance of T_H1, T cells during salmonellosis between ity-r and ity-s mice. J. Immunol. 150:3411-3420, 1993.
18. Epidemiologia. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Unico de información. Vol 13 No. 36 Semana 36, 1996.
19. Falk, K; Rotzschke, O; Stevanovic, S; Jung, G; Rammensee H.G Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature 351: 290-296, 1991.

20. Fernandez-Beros, M; C. González, M. a; McIntosh, and F.C: Cabello. Immune response to the Iron-deprivation induced proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Infect. Immun.* 57, 1271-1275,1989.
21. Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J.L., and Calva, E. Isolation and characterization of omp S1, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene.* 158:67-72, 1995.
22. Fields P, Groisman E, Hetfron F. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science.* 243: 1059-62, 1986.
23. Forst, S; Comeau, D.E; N orioka, S. and Inouye, M. *J. Biol. Chem.* 262, 16 -33 ,16-38. 1987.
24. Forst, S; Delgado, J; Ramakrishnan, G. and Inouye, M. *J. Bacteriol.* 170, 5080-5085. 1988.
25. Fouts, T.R., Lewis, G.K., and Hone, D. M. Construction and characterization of a *Salmonella*-based HIV-1 vector vaccine. In: *Vaccines 93 Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS* Ginsberg, H.S., Brown, F., Chanock, R.M., and Lerner, R.A eds. CSHL press, USA. pp. 95-100, 1993.
26. Franco, A., González, C., Levine, O.S., Lagos, R., Hall, R.H., Hoffman, S.L., Moechtar, M. A., Gotuzzo, E., Levine, M. M., Hone, D.M., and Morris, J.G. Further consideration of the clonal nature of *Salmonella typhi*: evaluation of molecular and clinical characteristics of strains from Indonesia and Peru. *J. Clin. Microbiol.* 30:2187-2190, 1992.
27. Frankel, G., Newton, S.M.C., Schoolnik, G.K., and Stoker, B.A.D. Intragenic recombination in the flagellin gene: characterization of the H1-j gene of *Salmonella typhi*. *EMBOJ.* 8:3149-3152, 1989.
28. Galdiero, F., de L'Ero, G., Benedetto, N., Galdiero, M., and Tufano, M. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 61:155-161, 1993.

29. Garret, S; Taylor, R, K; and Silhavy, T.J. J. bacteriol. 156, 62-69, 1983.
30. Garret, S; Taylor, R.K; Silhavy, T. J. and Berman, M. L.J. Bacteriol. 162, 840-844, (1985).
31. Girón, J.A., Xu, J. G., González C.R., Hone, D., Kaper, J. B., and Levine, M.M. Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Δ aroC, Δ aroD *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908. Vaccine. 13:939-946, 1995.
32. González, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C.O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A. Nardin, E., Szein, M. B., Heppner, D. G., Fouts, T.R., Isibasi, A., and Levine, M.M. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908 expressing the circumsporozoite protein of *plasmodium falciparum*: Strain construction and safety and immunogenicity in humans. J. Infect. Dis. 169:927-931, 1994.
33. González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Garcia, J. and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. Microbiol. Immunol. 37:793-799, 1993.
34. González, C., Noriega, F., Hone, D., Santiago, A., Levine, M., Kumate, J. and Isibasi, A. Construction of a candidate vaccine strain against *Leishmaniasis* using *Salmonella typhi* as live carrier of *Leishmania mexicana* GP63. Arch. Med. Research. 25:49, 1994.
35. Hackett, J. Use of *Salmonella* for heterologous gene expression and vaccine delivery systems. Curr. Opin. Biotechnol. 4:611-615, 1993.
36. Hall, M. N. and Silhavy, T.J. (1981b). J. Mol. Biol. 151, 1-15
37. Harlow, E., and Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
38. Heneine, W., Matar, G., Reeves, M., and Swaminathan, B. Molecular characterization of *Salmonella typhi* isolates from patients with severe and mild typhoid fever. Eur. J. Epidemiol. 7:192-193, 1991.

39. Hoiseth S. K; and B.A.D. stocker. Aromatic dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature (london)* 291: 238-239, 1981.
40. Hone, D., Attridge, S., Bosch, L.D. and and Hackett, J.A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strain. *Microb. Pathog.* 5:407-418, 1989.
41. Hone, -d., Harris, A., Chatfield, S., Dougan G., and Levine, M.M. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9:8100-816, 1991.
42. Hormaeche, C *Salmonella*, infection and immunity. In: The Encyclopedia of Immunology. Roitt, M., and Delves, P. eds. Academic Press. USA. pp. 1350-1352, 1992.
43. Huckstep, R. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Ed. E.S. y S. Livinstong, L.T:D., London. pp. 4-9, 1983.
44. Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M., Martin, N., Ramírez, G., González, C., López C., Sánchez, J. and Kumate, J. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann New York cad of Sci.* 730:350-353, 1994.
45. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization whit outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12 Vi:d Infct. *Immun.* 56:2953-2959, 1988.
46. Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., García, J. and Kumate, J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* 10:811-813, 1992.
47. Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C. and Kumate, J. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. In: cell function and disease Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. and J, Jaz, J. eds. Plenum Press, New York. pp. 281-292,1988.

48. James M. Slauch, and Thomas, J. Silhavy. Genetic analysis of the switch that controls porine gene expression in *E. coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 210, 281-292, 1989.
49. Jeanteur, D; J. H. Lakey, and F. Pattus. The porin superfamily diversity and common features. p 363-380. In S.M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed), *Bacterial cell wall*. Elsevier, New York, 1994.
50. Jo, Y. L; Nara, F; Ichihara, S; Mizuno, T. and Mizushima, S.J. *Biol. Chem.* 261, 15252-15256, 1986.
51. Jones, P.W; Dougan, G; Hayward, C; Mackenzie, N; Collins, P. and Chatfield, S.N. Oral vaccination of calves against experimental salmonellosis using a double *aro* mutant of *Salmonella typhimurium* vaccine. *J. Vet. Med.* 9, 29.1991.
52. Kessler, S.W. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complex with protein A. *J. Immunol.* 115:1617, 1975.
53. Keusch, G., and Thea D. Invasive and tissue-damaging enteric Bacterial Pathogens: Bloody Diarrhea and Dysentery. In: *Mechanisms of microbial Disease*. Shachter, M., Medoff, G., Eisenstein, B. 2a eds. Williams and Wilkins., USA. pp. 264-280, 1993.
54. Killar, L., and Eisenstein, T. Delayed type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 52:504-508, 1986.
55. Kissel, V., González, C., Astudillo, M., Godard, A., Wachman, B., and Cabello F.C. *Salmonella*-specific monoclonal antibodies against recombinant *Salmonella typhi* kilodalton porin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:250-252, 1994.
56. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.

57. Levine, M. M; Hemington, D; Murphy, S.R; Morris, J.G; Lososn-sky, G; Tall, B. et al. Safety, infectivity, immunogenicity, and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi* 541Ty and 543Ty as live oral vaccines in man. J. Clin. Invest. 1987, 79, 888-902.
58. Liljestrom, P. F E M S Microbiol. Letters, 145-150, 1986.
59. Liu, S-It and Sanderson, K. Genomic cleavage map of *Salmonella typhi* Ty2 J. Bacteriol. 71:5099-5107, 1995.
60. López-Macias, C. Respuestas de Linfocitos T Citotóxicos contra la porina OmpC de *Salmonella Typhi*. Tesis de maestria. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.
61. Makela, H. Immunization with outer major membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect. Immun. 25:857-862, 1979
62. Mastroeni, P., Villareal, R., and Hormaeche, C. Transfer of Immunity to oral challenge with virulent *Salmonella* in innately susceptible BALB/C mice requires both immune serum and T cells. Infect. Immun. 61:3981-3984, 1993.
63. Miller S. I; Kukral A M, Mekalanos JJ. A two component regulatory system *PhoP/PhoQ* controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl acad Sc; USA; 86: 5054-8, 1989.
64. Miller S. I; pulkkinen W S, Selsted ME, Mekalanos JJ. characterization of defesin resistance phenotype associated with mutations in the *PhoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 1990; 58: 3706-10.
65. Mizuno, T; Kato, M; Jo, Y. L. and Mizushima, S.J. Biol. Chem. 263, 1008-1012. 1988.
66. Mizuno, T. and Mizushima, S.J. Biochem. 101, 387-396, 1987.
67. Mizuno, T; Wurtzel, E.T. and Inouye, M. J. Biol. Chem. 257, 13692-13698, 1982.

68. Muthukkaruppan, V.R; Nandakumar; K.S.and palanivel, V. Monoclonal antibodies against *Salmonella* porins; generation and characterization. Immunol. Lett 33 201-206, 1992
69. Muthukkumar, S., and Muthukkaruppan, V. Mechanism of protective immunity induced by porin lipopolysaccharide against murine *Salmonellosis*. Infect. Immun. 61:3017-3025, 1993.
70. Nastasi, A. Mammina, C. and Villafrate M.R.; DNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of *Salmonella typhi* infections Epidemiol. Infect. 107, 565-576,1991.
71. Nikaido, H. proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes; porins and phago λ receptor protein. Methods Enzymol. 97:85-100, 1983.
72. Nikaido, H., Vaara, M., Neidhardt, F., Ingraham, J., Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, H. Outer membrane. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In:Cellular and molecular Biology. American Society for Microbiology Washington, D.C. pp. 7-22., 1987.
73. Norioka, S; Ramakrishnan, G; Ikenaka, K. and Inouye, M. J. Biol. Chem. 261, 17113-17119,1986.
74. O'Brien, A.D. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 124, 37-48,1986.
75. Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia, E. and Kumate, J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27:1640-1645, 1989.
76. Overbeeke, N., Bergmans, H., Van Maxsfeld, F. and Lugtembuerg, B. Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12. J. Mol. Biol. 163:513-532, 1983.

77. Pamer, E. Cellular immunity to intracellular bacteria. *Curr. Op. Immunol.* 5:492-496, 1993.
78. Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., and Altwegg, M. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends. Microbiol.* 3:253-255, 1995.
79. Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., González, C., García, J., Islas, S., and Kumate, J. Anticuerpos monoclonales anti-Lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex).* 20:315-320, 1989.
80. Puente, J.L; Alvarez-Scherer, V; Gosset, G. and Calva, E.: comparative analysis of the *Salmonella typhi* y *E.coli* OmpC genes. *Gene* 83, 197-206, 1989.
81. Reed, L. and Muench, H. A simple method of estimating fifty percent and points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497, 1988.
82. Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., and Farmer III, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multylocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori*. *J. Clin. Microbiol.* 27:313-320, 1989.
83. Salander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A., and Musser, J.M. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars causing human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* 58:2262-2275, 1990.
84. Sambrook, K.J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. pp. 1.42-1.46., 1989.
85. Sanderson K. E. and Dovey D. Linkage map of *Salmonella typhimurium* In: *Genetic Maps.* O'Brien, S.J. ed. VII Ed. cold spring harbor N.Y. USA. pp 2.3-2.21, 1990.
86. Schnaitman, C.A. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysosyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108:553-563, 1971.

87. Sein, J., Cachicas, V., Becker, M.I., and De Ioannes, A.E. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol. Res.* 26:371-380, 1993.
88. Silva, B, A; C. González G. C. Mora and F. Cabello. Genetic characteristics of *Salmonella typhi* strain Ty21a vaccine. *J. Infect. Dis.* 155, 1077-1078, 1987.
89. Slauch, J.M; Garrett, S; Jackson, D.E. and Silhavy. T.J. *J. Bacteriol.* 170, 439-441, 1988.
90. Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-505, 1975.
91. Struye, M; J. Visser, H. Adriaanse R. Benz, and J. Tomassen. Topology of PhoE porin: The "Eyelet" region *Mol. Microbiol.* 7:131-140, 1993.
92. Szein, M. B; Tanner, M, Polotsky Y; Orenstein, J.M; and Levine M.M. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans. *J. Immunol.* 155: 3987-3993, 1995.
93. Tacket CO, Hone DM, Curtiss RIII, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of Δ aro C Δ aro D and Δ cya *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect Immun;* 60: 536-541,1992.
94. Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonsky, G.A., Guers, L., Edelman, R., and Levine, M. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine.* 10:443-446, 1992.
95. Thong; K-L., Passey, M., Clegg, A., Combs, B.G., Yassin, R.M., and Pang, T. Molecular analysis of isolates of *Salmonella typhi* obtained from patients with fatal and nonfatal typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 34:1029-1033, 1996.
96. Tite, J., Gao, X., Hughes, C., Lipsombe, M., O'Callaghan, D., Gougan, G., and Liew, F. Antiviral immunity induced by recombinant nucleoprotein of influenza A virus III.

Delivery of recombinant nucleoprotein to the immune system using attenuated *Salmonella typhimurium* as a live carrier. *Immunology*. 70:701-708, 1990.

97. Tommassen, J., M. Agterberg, R. Janssen, and G. Splerings. Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. *Zentralbl. Bakteriologie*. 278:396-406, 1993.

98. Toro, C., Lobos, S., Calderón, I., Rodríguez, M. and Mora, C. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 34:1715-1719, 1990.

99. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:4350-4354, 1979.

100. Tully, J., Gaines, S. And Tigert, W. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV Role of H antigen in protection. *J. Infect. Dis.* 112:118-124, 1963.

101. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. Characteristics of live vaccines in relations to delayed-type hypersensitivity and protective in murine salmonellosis. *Immunology Letters* 6:299-302, 1983.

102. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. Protective immunity by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55(3):816-821, 1987.

103. Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigens for delayed-type hypersensitivity in murine *Salmonellosis*. *Infect. Immun.* 55(3):822-824, 1987.

104. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V. Protective immunity induced by porin against *Salmonella* infection mice. *Indian J. Med. Res.* 89:121-127, 1989.

105. Van Alphen, W. and Lugtenberg. B. J. *Bacteriol.* 131, 623-630, 1977.

106. Venegas, A., Gómez, I., Zaror, I. and Yuldelevich, A. The nucleotide sequence the *Salmonella typhi* OmpC porin gene. *Nuc. Ac. Res.* 16:7715-7721, 1988.

107. Verdugo Rodriguez, A. López vidal Y; puente, J, L; Ruiz-palacios. GM. and colva F.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations Fur, J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 248-254, 1993.
108. Vidal, S., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P. Natural Resistance to infection with Intracellular Parasites: Isolation of Candidate for *bcg*. Cell 73:469-485, 1993.
109. Wunderlich, J., and Shearer, G. Assays for T cell fuction. Induction and Measurement of citotoxic T lymphocyte activity. In: Current Protocols in immunology. Colligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D:H., Shevach, E.M., Strober, W. eds. National Institutes of Health. Bethesda, MD. USA. 1:3.11.1-3.11.15, 1994.
110. Wurtzel, E. T; Chou, M. Y. and Inouye, M. J. Biol. Chem. 257, 13685-13691, 1982.