



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Papel de las porinas OmpS1 y OmpS2 en la patogénesis
de
*Salmonella enterica***

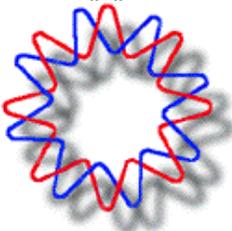
T E S I S

que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

presenta

MVZ. OLIVIA RODRÍGUEZ MORALES



Cuernavaca, Mor. México

Mayo, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A Dios con amor y gratitud, por la fortaleza, el valor y el consuelo en situaciones adversas y por todas las bendiciones recibidas a lo largo de mi vida.

A mi familia: mis padres con profundo cariño y respeto, por contar con ellos en todo momento de manera incondicional; mi hermano Ernesto y su esposa Janet, por los momentos felices compartidos; mi consentida Gaby, por ser mi cómplice, confidente y amiga sinigual, mi sobrina Elena, por esa identificación tan especial y mis pequeños monstruos, Netito, Daniel y Julio, por ser la alegría de esta familia. Gracias a todos por su apoyo. Los quiero mucho.

A todas mis excelentes amigas, por contar con ellas en todo y para todo. Las de toda la vida: Jessi, Grisel, Montse y Norma, las veterinarias: Ixchel, Rosalva, Magali, Kitty, Paloma, Ruth, Caro y Elvia; las Aranjuez: Rocío, Claudia, Brenda, Vero, Laura y Olga, las M. en C. y Dras.: Martha, Ale, Karol, Adriana, Vane, Simona y Yamilé. A todas, mi agradecimiento y mi cariño.

A los Fernández de Córdoba y de la Barrera, por ser un hermoso ejemplo de unión y solidaridad familiar. Con mención especial a la Sra. Soledad y a Malena.

A ti Luis, por todo tu amor, comprensión, apoyo y confianza. Por ayudarme a superar esos momentos difíciles y seguir juntos aun en contra de todos los pronósticos. El amor romántico no muere, se renueva a diario; por tanto, sí existe.

A mis angelitos ausentes: Richie y Montse, cada uno sabe el motor que representan en mi vida, las razones reales para seguir creciendo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología, por tener el orgullo de pertenecer a ellos.

Al Dr. Edmundo Calva Mercado, por la confianza depositada en mí, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por el tiempo brindado en mi desarrollo académico, pero sobre todo por haber tenido la suerte de conocer en él a un excelente ser humano.

Al Dr. José Luis Puente García, por su invaluable ayuda y consejos recibidos en situaciones cruciales durante el desarrollo de mi proyecto y de mi formación académica, en especial por haber sido “consejero espiritual” en momentos difíciles.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay,
Dr. Carlos F. Arias Ortiz
Dra. Clara Espitia Pinzón

por todas las críticas y aportaciones recibidas para la realización de este proyecto.

A mi jurado de tesis:

Dr. Alejandro Alagón Cano
Dr. Jorge Membrillo Hernández
Dr. Mario Soberón Chávez
Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Dr. Gustavo Pedraza Alva
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

por los valiosos comentarios y sugerencias recibidos en la revisión y crítica de este documento.

A la gran familia que constituye el Lab. Calva/Puente, por la colaboración y apoyo en algún momento durante el desarrollo de este proyecto y por los momentos divertidos de camaradería sincera: Amapola, Rosalva, Elvira, Paty, Ale, Karol, Adriana, Mario Alberto, Martha, Francisco, Marcos, Alma, Vero, Jenny, Cristina, Miryam, Tomás, Juan, Toño, Víctor Antonio, Carmen, Miguel, Ricardo, Betty, Nacho, Ismael, Aurora, Augusto y Ana.

A los médicos, investigadores y estudiantes del grupo del Dr. Isibasi de la Unidad de Investigación Médica en Inmunohistoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su gran ayuda y colaboración en este trabajo y por hacerme sentir en familia mientras conviví con ellos.

“Perseverancia no es
una larga carrera;
son pequeñas carreras
una después de la otra”

Ωαλτερ Ελλιοττ

“El arte de la vida
consiste en hacer de la vida
una obra de arte”

ζολταιρε

“Recuerda que hoy
es el mañana por el que
te preocupabas ayer”

Δαλε Χαρνεγιε

El presente proyecto se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado

El Comité Tutorial estuvo integrado por:

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Dr. Carlos F. Arias Ortiz

Dra. Clara Espitia Pinzón

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dr. Jorge Membrillo Hernández

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. M. Gustavo Pedraza Alva

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca-crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. Registro 117004) y del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) (833)

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS UTILIZADOS EN EL TEXTO.....	12
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	15
I. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 Taxonomía y Enfermedades causadas por <i>Salmonella enterica</i>	17
1.2 Modelos de estudio para las enfermedades causadas por <i>Salmonella</i> ...	19
1.3 Curso clínico.....	22
1.4 Inmunología.....	26
1.5 Porinas.....	32
II. ANTECEDENTES.....	39
III. HIPÓTESIS.....	42
IV. OBJETIVOS.....	42
Objetivo General.....	42
Objetivos Específicos.....	42
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
5.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	43
5.2 Animales de experimentación.....	44
5.3 Líneas celulares.....	44
5.4 Generación de mutantes.....	44

5.5 Caracterización de mutantes por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por “Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel”).....	45
5.6 Ensayos de cinética bacteriana en diferentes medios de cultivo.....	45
5.7 Ensayos de dosis letal 50% (LD ₅₀).....	46
5.8 Ensayos de competencia <i>in vivo</i>	47
5.9 Ensayos de competencia <i>in vitro</i>	48
5.10 Ensayos de excreción bacteriana en heces.....	50
5.11 Ensayos de susceptibilidad a ácidos grasos de cadena corta (SCFAs por “Short Chain Fatty Acids”).....	50
5.12 Ensayos de susceptibilidad a ácido láctico.....	51
5.13 Ensayos de susceptibilidad a sales biliares y otros detergentes suave.	51
5.14 Ensayos de susceptibilidad a polimixina B (péptido catiónico antimicrobiano -CAMP por “Cationic Antimicrobial Peptide”-).....	52
5.15 Ensayos de susceptibilidad a pH ácido.....	52
VI. RESULTADOS.....	53
6.1 Caracterización de las mutantes.....	53
6.2 Dosis letal 50% (LD ₅₀).....	56
6.3 Índices competitivos <i>in vivo</i>	59
6.4 Índices competitivos <i>in vitro</i>	62
6.5 Excreción de <i>S. enterica</i> en heces.....	64
6.6 Susceptibilidad a ciertas condiciones de estrés <i>in vitro</i>	64
VII. DISCUSIÓN.....	65
7.1 Mutagénesis por el método de Datsenko y Wanner.....	65

7.2 Índices competitivos (ICs) <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de las mutantes en <i>ompS1</i> y <i>ompS2</i>	66
7.3 Ensayos de excreción de <i>Salmonella</i> en heces.....	67
7.4 Condiciones de estrés <i>in vitro</i> que están presentes en el TGI.....	67
7.5 Índices competitivos (ICs) de las cepas mutantes en <i>ompR</i> y <i>envZ</i>	69
7.6 Índices competitivos (ICs) de la cepa mutante en <i>leuO</i>	70
7.7 Modelo propuesto de la participación de las porinas OmpS1 y OmpS2 durante la patogénesis de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en el ratón.	72
VIII. CONCLUSIONES.....	77
IX. PERSPECTIVAS.....	79
X. BIBLIOGRAFÍA.....	81
XI. APÉNDICE DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	87
ANEXO: Artículo publicado en <i>Infect. Immun.</i> (2006) 74:1398-1402.....	89

RESUMEN

Cepas mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en los genes *ompS1* y *ompS2*, los cuales codifican para porinas de baja expresión en condiciones estándar de laboratorio, mostraron una gran atenuación en la virulencia en un modelo murino de infección por vía oral (IO). La dosis letal media (LD₅₀) determinada, dio como resultado una atenuación de 10,000 y >40,000 veces para la mutante en el gen *ompS1* y en el gen *ompS2*, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre 14028. Los índices competitivos (ICs) en el bazo y en el hígado después de la IO mostraron que la capacidad para colonizar estos órganos estuvo reducida más de 250 veces para ambas mutantes, en comparación con la cepa silvestre. En contraste, la capacidad de estas mutantes para competir por la colonización de estos órganos no se vio tan severamente afectada después de la inoculación intraperitoneal (IIP), mostrando una reducción de sólo 4 a 5 veces en comparación con la cepa silvestre, indicando que estos genes desempeñan un papel en la patogénesis, principalmente durante los primeros estadios del proceso infeccioso. La atenuación de una doble mutante *ompS1 ompS2* mostró un efecto aditivo con respecto a las mutantes simples, sugiriendo que cada mutación resultó en la pérdida de funciones independientes. Además, ambas mutantes simples fueron incapaces de causar bacteremia en tiempos tempranos de la infección (2 días), con un IC menor a 1×10^{-4} . Las tres mutantes fueron excretadas en heces en igual proporción que la cepa silvestre, indicando que no son particularmente susceptibles a las condiciones de estrés probadas presentes en el tracto gastrointestinal (TGI). Los fenotipos de atenuación

en el hospedante no fueron evidentes en ensayos *in vitro*, donde no se observaron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las cepas mutantes y la cepa silvestre en su capacidad de competir por la invasión a células epiteliales o por la sobrevivencia/proliferación en macrófagos. Por otra parte, se determinó la LD₅₀ de una cepa mutante en el gen *leuO* (regulador positivo de OmpS2 en *S. enterica* serovar Typhi), la cual resultó ser >65,000 veces mayor que la LD₅₀ de la cepa silvestre. La capacidad de esta cepa de colonizar el bazo y el hígado en una IO fue de 500 y 1,000 veces menor, respectivamente, que la de la cepa silvestre; pero después de una IIP, la reducción en la capacidad de colonización fue tan sólo de <10 veces con respecto a la cepa silvestre, sugiriendo que LeuO tiene un papel en la patogénesis de *S. enterica* serovar Typhimurium durante los estadios tempranos de la infección. Los ICs de las mutantes independientes en los genes del sistema de dos componentes OmpR/EnvZ, tanto en IO como en IIP, confirmaron el papel pleiotrópico de la proteína reguladora OmpR y la participación de EnvZ como su principal cinasa-fosforilasa *in vivo*.

ABSTRACT

Salmonella enterica serovar Typhimurium mutants in the *ompS1* and *ompS2* genes, which code for quiescent porins under standard laboratory conditions, were nevertheless highly attenuated for virulence in the mouse upon oral infection (OI). The LD₅₀ showed a 10,000- and >40,000-fold attenuation for the *ompS1* and *ompS2* mutants, respectively, as compared to the 14028 wild-type strain. The competitive indices (CIs) in the spleen and liver upon OI indicated more than 250-fold reduced ability to colonize them for both mutants as compared to the wild type. In contrast, the ability of the *ompS1* and *ompS2* mutants to compete for colonization in murine tissues was not as severely affected after intraperitoneal infection (IPI), showing only 4-5 fold reduction in both spleen and liver, indicating a role in pathogenesis mainly during the first stages of the infectious process. The attenuation of a double *ompS1 ompS2* mutant was the predicted combined effect of the single mutations, suggesting that each mutation resulted in the loss of independent functions. In addition, both the *ompS1* and *ompS2* mutants were impaired to cause bacteremia at an early time after infection (2 days), with a CI lower than 1×10^{-4} . Single and double mutants were shed in the feces in equal numbers as the wild type, indicating that they were not particularly sensitive to stress conditions in the gastrointestinal tract tested *in vitro*. The attenuated phenotypes in the host were not evident upon assays *in vitro*, as no significant differences ($P < 0.001$) were observed between the mutants and the wild type regarding epithelial cell invasion or regarding survival/proliferation in macrophages upon mixed infections. In a *leuO* mutant, positive regulator of *S. enterica* serovar

Typhi *ompS2* expression, the LD₅₀ was >65,000-fold higher than the wild type, and the CIs indicated 500- to 1,000-fold reduced survival in the spleen and liver, respectively, after OI, but <10-fold reduced survival after IPI, indicating a role in pathogenesis mainly during the first stages of the infectious process. The CIs for *envZ* and *ompR* after both the OI and IPI confirmed the proposed pleiotropic role for the OmpR regulator and the participation of EnvZ as the main phosphorylase for OmpR *in vivo*.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS UTILIZADOS EN EL TEXTO

Amp ^R	Resistente a ampicilina
ATCC	“American Type Culture Collection”
bp	Pares de bases
CAMP o CAMPs	Péptido(s) catiónico(s) antimicrobiano(s), del inglés “Cationic Antimicrobial Peptide”
CFTR	Regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística, del inglés “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”
Cm	Cloranfenicol
Cm ^R	Resistente a cloranfenicol
CPA o CPAs	Célula(s) presentadora(s) de antígenos
Da	Dalton
DMEM	Medio para cultivo celular modificado de Dulbecco, del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (ver su modo de preparación en el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FT	Fiebre tifoidea
IC o ICs	Índice(s) competitivo(s)
ID ₅₀	Dosis mínima infecciosa
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IIP	Infección intraperitoneal
IL-	Interleucina
IO	Infección oral
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina

Km ^R	Resistente a kanamicina
LB	Medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani (ver su composición en el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo)
lb	libra
LD ₅₀	Dosis letal 50% o Dosis letal media
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
mA	Miliampere
mM	milimolar
mmol	milimol
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad, del inglés “Major Histocompatibility Complex”
MN	Medio de cultivo nutritivo de baja osmolaridad (ver composición y modo de preparación en el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo)
MNN	Medio de cultivo nutritivo con 0.3 M de NaCl de alta osmolaridad (ver composición y modo de preparación en el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo)
NK	Linfocitos asesinos naturales o Células asesinas naturales, del inglés “Natural Killer”
OMP u OMPs	Proteína(s) de Membrana Externa, del inglés “Outer Membrane Protein(s)”
PAMP o PAMPs	Patrón(es) molecular(es) asociado(s) a patógenos, del inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (ver composición y modo de preparación en el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “Polymerase Chain Reaction”

PEEC	Quimioatrayente epitelial inducido por patógenos, del inglés “Pathogen-Elicited Epithelial Chemoattractant”
PME o PMEs	Proteína(s) de Membrana Externa
PMN o PMNs	Polimorfonuclear(es)
RPMI	Medio para cultivo celular (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) (ver su modo de preparación en el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo)
SCFA o SCFAs	Ácido(s) Graso(s) de Cadena Corta, del inglés “Short Chain Fatty Acid”
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio, del inglés “Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel”
Sp	Espectinomicina
Sp ^R	Resistente a espectinomicina
SPI-1	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> -1, del inglés “ <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island-1)
SPI-2	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> -2, del inglés “ <i>Salmonella</i> Pathogenicity Island-2)
TGI	Tracto gastrointestinal
TLR o TLRs	Receptor(es) “Toll-like”
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidad(es) formadora(s) de colonia(s)

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium y plásmidos.....	43
Tabla 2. Dosis letal 50% de cepas de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en ratones BALB/c infectados vía oral.....	56
Tabla 3. Índices competitivos (ICs) de infecciones mixtas orales e intraperitoneales de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en ratones BALB/c.....	61

FIGURAS

Fig. 1. Envoltura celular de bacterias Gram-negativas. Esquema obsequiado por el Dr. Constantino López-Macías (Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS, México).....	32
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Fig. 2. Estructura de la porina OmpF de E. coli. A) Trímero visto a través del poro desde la parte superior, esto es, en dirección perpendicular al plano de la membrana. El asa 2, coloreada en azul, juega un papel en la interacción del monómero con su unidad vecina. El asa 3, coloreada en anaranjado, estrecha el canal. B) Monómero visto lateralmente, a lo largo del eje de la membrana señalado por la flecha del panel A. Las asas 2 y 3 están coloreadas como se indica en el panel A. C) Monómero visto desde la parte superior, mostrando el “ojo” del canal o “eyelet”, que constituye la región constreñida del canal. El “ojo” del canal se forma por los residuos de Glu117 y de Asp113 del asa 3; así como de cuatro residuos de la pared opuesta del barril, Lys16, Arg42, Arg82 y Arg132, todos mostrados como esferas. Imagen tomada de Nikaido, H. <i>Microbiol. Mol. Biol. Rev.</i> (2003) 67: 593-656 (Nikaido, 2003).....	36
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Fig. 3. Perfil de Proteínas de Membrana Externa (PMEs) de varias cepas de S. enterica serovar Typhimurium en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Líneas: 1, STM14028 (cepa silvestre)/pFMtrcleuO (inducido con 50 µM de IPTG [isopropil-β-D-tiogalactopiranosido]); 2, STMS23 (ΔompS2::Km)/pFMtrcleuO (inducido con 50 µM de IPTG); 3, STM14028 (cepa silvestre)/pFMtrc12 (inducido con 50 µM de IPTG); 4, STMR (ΔompR::Km); 5, STMR (ΔompR::Km)/pFM2001 (ompR); 6, STMZ (ΔenvZ::Cm); 7, STMZ (ΔenvZ::Cm)/pROZ (envZ); y 8, STMD (ΔompD::Km)..	54
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Fig. 4. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes en ompS1 y ompS2 de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en diferentes medios de cultivo. Cada gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de 2 a 3 experimentos independientes.....	55
Fig. 5. Sobrevivencia de ratones BALB/c infectados con <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium. A) Cepa 14028 tipo silvestre a diferentes dosis; B) Atenuación de la cepa STMLEUO1 ($\Delta leuO$), comparada con la cepa 14028 tipo silvestre, a dosis altas.....	57
Fig. 6. Ratón BALB/c infectado con <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium. Los signos representativos de la enfermedad causada por <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en los ratones son fiebre y malestar general, caracterizados por pérdida del apetito, piloerección, encorvamiento de la espina dorsal y tremor muscular. Los animales del fondo de la jaula muestran un buen estado de salud.....	58
Fig. 7. Fenotipos <i>in vitro</i> de las mutantes ompS1 y ompS2 de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium. A) Índice Competitivo en Invasión (ICI) de una mezcla de cepas mutante y silvestre en una infección de células HeLa en cultivo. B) Índice Competitivo en Proliferación y sobrevivencia (ICP) de una mezcla de cepas mutante y silvestre en una infección de macrófagos J774.A1 en cultivo. Todos los valores son el promedio y las desviaciones estándar de al menos dos experimentos realizados por triplicado ($P < 0.001$ por la prueba <i>t</i> de Student).....	63
Fig. 8. Esquema de perspectivas para entender la participación de las porinas y del regulador LeuO como factores de virulencia de <i>Salmonella enterica</i> y su aplicación práctica en el área médica y de la salud. Los aspectos 1 y 2 involucran la realización de ICs en diferentes órganos y a diferentes tiempos de infección, así como la implementación de una metodología para la evaluación de la expresión génica <i>in vivo</i> . El aspecto 3 ayudará a definir la participación de las porinas como moléculas de señalización y comunicación intercelular. Los aspectos 4 y 5 podrían explicar su participación como canal para el paso de nutrientes o metales para el establecimiento y progresión de la infección. Los aspectos 6 y 7 proporcionarán datos que conduzcan a una posible explicación del control de la infección a nivel de la respuesta inmune innata. El aspecto 8 abarca estudios de proteómica, atenuación y expresión génica <i>in vivo</i> con la proteína LeuO y los genes que regula. El aspecto 9 busca la aplicación del conocimiento básico en la elaboración de métodos de inmunodiagnóstico rápido de la FT en humanos y la elaboración de vacunas de nueva generación.....	80

I. INTRODUCCIÓN

1.1 TAXONOMÍA Y ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Salmonella enterica*

Salmonella enterica es una bacteria Gram-negativa, patógena, intracelular facultativa, que infecta a diversas especies animales, incluyendo al hombre. El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, el tamaño de la bacteria es de 2 a 3 x 0.4 a 0.6 μm . La caracterización molecular del género agrupa a estas bacterias en una única especie: *Salmonella enterica*. De acuerdo a la similitud genética y a su especificidad del hospedante, las especies se han dividido en seis subespecies (ssp.): *enterica* (Grupo 1), *salamae* (Grupo 2), *arizonae* (Grupo 3a), *diarizonae* (Grupo 3b), *houtenae* (Grupo 4) e *indica* (Grupo 6). *S. bongori*, la cual fue categorizada inicialmente como subespecie 5, generalmente se considera una especie separada, debido a su divergencia de otras salmonelas y por ser la única especie no patógena (Scherer y Miller, 2001).

El grupo 1 (*enterica*) incluye a muchas de las serovariedades patógenas para los humanos, entre éstos: *typhi* y *typhimurium*. Debido a que la correcta clasificación taxonómica para nombrar a las subespecies de *Salmonella* no se aplica con frecuencia, actualmente se emplea la siguiente nomenclatura: *Salmonella enterica* serovar Typhi, para referirse a *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *typhi* (Scherer y Miller, 2001).

El género *Salmonella* se ha agrupado, a su vez, en más de 2,200 serotipos de acuerdo a tres determinantes antigénicos principales: el antígeno flagelar H, el antígeno somático O y el antígeno capsular Vi. Este último, constituye un polímero de ácido *N*-acetil-galactosamino-urónico, encontrado predominantemente en *S. enterica* serovar Typhi y que se considera una característica distintiva de este serotipo (Scherer y Miller, 2001).

Las serovariedades de *Salmonella* se asocian con diferentes síndromes de enfermedad en humanos: bacteremia, fiebre tifoidea (FT) y enterocolitis. De éstas, la bacteremia es poco frecuente en humanos en donde es causada por la

serovariedad Choleraesuis de *S. enterica*, especie específica de los cerdos, y por la serovariedad Dublin de *S. enterica*, especie específica de los bovinos (Zhang et al., 2003).

La FT es causada por la serovariedad Typhi de *S. enterica*, especie específica del humano, que se caracteriza por síntomas como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, dolores musculares y esporádicamente diarrea. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que ocurren 16 a 17 millones de casos anualmente, resultando en cerca de 600,000 muertes. En algunas áreas altamente endémicas, particularmente Pakistán e Indonesia, se han observado con frecuencia otras complicaciones de la enfermedad, tales como perforación intestinal y choque séptico. Los grandes brotes continúan siendo un gran problema, como el reportado entre 1996 y 1997 con 50,000 a 60,000 casos en Tadjikistán. Además, las cepas resistentes a múltiples antibióticos han sido aisladas en la mayoría de las áreas endémicas, particularmente en el Sureste de Asia, India, Pakistán y el Medio Oriente (Scherer y Miller, 2001; Zhang et al., 2003)

La enterocolitis se clasifica dentro de las enfermedades asociadas a la contaminación bacteriana de los alimentos, la cual es mucho más frecuente que la fiebre tifoidea y es causada por muchas serovariedades de *Salmonella*, las más comunes son *S. enterica* serovar Enteritidis y *S. enterica* serovar Typhimurium. El consumo de carne no bien cocida, de huevo y de pescados y mariscos contaminados es la causa más común de salmonelosis, cuya presentación es la enterocolitis o la gastroenteritis. La presentación de la enfermedad ocurre entre las 8 y las 48 horas después de la ingestión y se caracteriza por náuseas y vómito, diarrea y dolor abdominal seguidos de fiebre. Generalmente las infecciones se resuelven dentro de 5 a 7 días sin tratamiento médico, aunque algunas infecciones pueden resultar en bacteremia u otras complicaciones y requieren de una terapia antibiótica. La incidencia de la gastroenteritis aguda debida a *Salmonella* se estima en 1,300 millones de casos por año a nivel mundial, resultando en aproximadamente 3 millones de muertes (Scherer y Miller, 2001; Zhang et al., 2003).

1.2 MODELOS DE ESTUDIO PARA LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Salmonella*

Salmonella enterica serovar Typhimurium produce en ratones una enfermedad similar a la fiebre tifoidea (FT) del humano, con lesiones intestinales y extraintestinales muy semejantes; es por eso que se han realizado diversos estudios en los que se analiza la relación entre esta bacteria y las células hospedantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, para conocer los detalles del proceso infeccioso (Zhang, et al., 2003; Hurley y Mc Cormick, 2003).

El modelo murino de esta enfermedad con *S. enterica* serovar Typhimurium tiene gran popularidad y aceptación, debido a que la FT del humano sólo puede ser inducida experimentalmente por la inoculación oral de humanos o de primates superiores (p. e. chimpancés); mientras que los primates inferiores (p. e. monos rhesus) o los vertebrados no-primates son resistentes a la infección por *S. enterica* serovar Typhi (Zhang, et al., 2003).

Para el modelo murino de la FT se utilizan ratones endogámicos de las cepas BALB/c y C57B1/6. La infección oral de estas cepas murinas endogámicas con 10,000 a 100,000 unidades formadoras de colonias (UFCs) de *S. enterica* serovar Typhimurium, resulta en una infección sistémica que produce la muerte. La dosis requerida para causar la muerte en el 50% de los ratones infectados (LD₅₀) cuando la bacteria es administrada intravenosamente o a través del peritoneo es menos de 10 UFCs (Scherer y Miller, 2001; Dorman, et al., 1989; Chatfield, et al., 1991).

La susceptibilidad de los ratones BALB/c y otras cepas de ratón (C57B1/6, DBA/1 y B10) a las infecciones con *Salmonella* han sido asociadas a un locus único, *Bcg/Ity/Lsh*, el cual media la resistencia innata a micobacterias, salmonelas y leishmanias, respectivamente. Los fenotipos *Bcg^S/Ity^S/Lsh^S* están todos asociados al mismo gen, *Nramp1*, el cual codifica para una fosfoglicoproteína transportadora de iones asociada a la resistencia natural, específica de macrófagos que es reclutada hacia la membrana fagosomal durante la fagocitosis.

Se hipotetiza que la proteína Nramp1 tiene una función de transporte que promueve la muerte de microorganismos intravacuolares, ya sea directa o indirectamente; ya que actúa bombeando metales divalentes hacia afuera del fagosoma, inhibiendo así el crecimiento de parásitos intracelulares al desproveerlos de iones metales. La diferencia entre los alelos resistente y susceptible parece estar asociada a la sustitución de un único nucleótido en el gen *Nramp* (Govoni y Gross, 1998; Linehan y Holden, 2003).

Los cultivos celulares, como otro sistema experimental para el estudio del proceso infeccioso, proveen una herramienta para estudiar las interacciones de patógenos humanos con células humanas de un solo tipo en un ambiente más controlado. Sin embargo, las observaciones y las hipótesis acerca de los mecanismos moleculares obtenidos de este sistema un poco limitado necesitan ser validados eventualmente en el contexto del organismo hospedante en su totalidad, para establecer la relevancia de los datos obtenidos (Hurley y McCormick, 2003).

Debe hacerse notar que, las infecciones con *S. enterica* serovar Typhimurium causan patologías intestinales dramáticamente diferentes en ratones y en humanos, desencadenan respuestas diferentes por parte de los hospedantes y resultan en síndromes distintos de enfermedad. Debido a estas diferencias, es muy difícil entender la patogénesis de *S. enterica* serovar Typhimurium en humanos con sólo extrapolar los datos obtenidos usando el modelo murino. Para este propósito, se emplean otros modelos animales como la infección de asas intestinales de íleon ligadas de conejo, la cual mimetiza más cercanamente la respuesta del hospedante encontrada durante una infección de *S. enterica* serovar Typhimurium en el humano. Sin embargo, en una inoculación oral, los conejos no sólo cursan con el síndrome enterocolítico sino que también llegan a presentar el cuadro sistémico. Los bovinos también son utilizados como un modelo de estudio para la patogénesis de la enterocolitis, por constituir la especie animal que, tras una infección oral natural o experimental, resulta en una enfermedad entérica con características clínicas y patológicas que mimetizan la enfermedad que presenta el

humano. Las asas intestinales de íleon ligadas de bovinos han sido el modelo de elección con mayor éxito para estudiar la acumulación de fluido y las respuestas del hospedante que siguen a la infección con *S. enterica* serovar Typhimurium. Debido a esto, el bovino es un excelente modelo para estudiar la patogénesis de la enterocolitis humana causada por la serovariedad Typhimurium (Zhang et al., 2003).

1.3 CURSO CLÍNICO

Salmonella es ingerida por vía oral a través del agua y de los alimentos contaminados. La dosis mínima infecciosa (ID_{50}) para las serovariedades patógenas humanas en voluntarios es de aproximadamente 10^6 organismos. Las condiciones que incrementan la susceptibilidad a un inóculo menor incluyen una disminución en la acidez estomacal (por ejemplo en infantes, o debido a alguna enfermedad acloridial o a la ingestión de antiácidos), enfermedades gastrointestinales crónicas como una enfermedad inflamatoria del intestino, cirugías gastrointestinales y la alteración de la microbiota intestinal por la administración de antibióticos. La inmunocompetencia también afecta la ID_{50} ; por ejemplo en aquellos desórdenes inmunes, como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), se ha visto que los pacientes son aproximadamente 20 veces más susceptibles a contraer la salmonelosis sintomática que la población general, aún cuando se haya presentado con una dosis infecciosa baja (Calva y Calva, 1998; Scherer y Miller, 2001).

La infección ocasionada por *Salmonella* se desarrolla de la siguiente manera: las bacterias que sobreviven al pH bajo del estómago rápidamente colonizan el lumen del intestino delgado, donde tienen preferencia por las Placas de Peyer. El paso de *Salmonella* a través de la barrera epitelial del intestino ocurre, en la mayoría de los casos, a través de los enterocitos especializados microplegados (M) o células M, los cuales cubren a las Placas de Peyer. Las salmonelas invasivas entran a las células M vía un proceso que induce la ondulación de la membrana y la endocitosis, conocido como “ruffling”, ganando acceso al tejido linfoide subyacente, ya sea por transcitosis a través de la célula M o por lisis de la misma. Las bacterias son internalizadas cuando las ondulaciones o “ruffles” se fusionan para formar los fagosomas. Después de cierto tiempo, los enterocitos eventualmente reparan su borde de cepillo y regresan a su estado normal (Scherer y Miller, 2001; House et al., 2001).

Una vez que las bacterias han atravesado el epitelio intestinal, penetran a las células fagocíticas (macrófagos) del tejido linfoide subyacente. Las salmonelas

son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, una característica que se correlaciona con la patogénesis del modelo tifoide murino de la infección con *S. enterica* serovar Typhimurium. En un punto crítico del proceso infeccioso, determinado principalmente por el número de bacterias, la virulencia de la cepa bacteriana y la respuesta inmune del hospedante, las bacterias alcanzan los ganglios linfáticos mesentéricos y se diseminan al sistema circulatorio a través de los vasos linfáticos eferentes, lo que produce una bacteremia transitoria. Esta fase bacterémica de la enfermedad se caracteriza por una amplia diseminación de los organismos hacia los sitios más comunes de infección secundaria que son: el hígado, el bazo, la médula ósea, la vesícula biliar y las Placas de Peyer en el íleon distal (Scherer y Miller, 2001; House et al., 2001, Zhang et al., 2003).

Estos primeros estadios de la infección se llevan a cabo en pocas horas; posteriormente la bacteria se multiplica y los títulos bacterianos en el bazo y en el hígado aumentan durante varios días. Después de alcanzar una carga de 10^8 bacterias, los animales ya no controlan la infección, por lo que sobreviene una bacteremia secundaria, el choque endotóxico y finalmente la muerte. En una infección subletal, los ratones restringen la bacteremia y el proceso infeccioso se caracteriza por hepato-esplenomegalia, supresión inmune y el nivel de carga bacteriana que se mantiene en los órganos depende de la cepa de ratón y de la cepa bacteriana utilizada (Mittrücker y Kauffmann, 2000).

En el hígado, *S. enterica* serovar Typhi provoca la activación de las células de Kupffer. Estas células tienen un alto poder microbicida y neutralizan a las bacterias con enzimas oxidativas (vía la generación de radicales libres de oxígeno, óxido nítrico, etc.), así como enzimas que se activan en un pH ácido. Las bacterias sobrevivientes alcanzan e invaden los hepatocitos y provocan una alta tasa de muerte celular, principalmente por apoptosis (Ramos de Andrade y Ramos de Andrade, 2003). La apoptosis ocurre a través de enzimas cisteín-proteasas llamadas caspasas, las cuales forman cascadas proteolíticas que producen cambios en proteínas estructurales, la activación de otras moléculas efectoras como nucleasas o la eliminación de algún inhibidor de la maquinaria de muerte

(Martin y Green, 1995). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es producido progresivamente por los hepatocitos de rata tras la infección con *S. enterica* serovar Typhimurium y es capaz de amplificar la respuesta inflamatoria local y de inducir la muerte del hepatocito por apoptosis (Ramos de Andrade y Ramos de Andrade, 2003).

Se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares por los cuales las serovariedades de *Salmonella* causan FT o gastroenteritis en humanos. En una infección con salmonelas no tifoides se presenta infiltración de neutrófilos, una característica de inflamación aguda, seguida por diarrea inflamatoria autolimitante. En contraste, en las infecciones tifoides rara vez se presentan síntomas gastrointestinales y los tejidos linfoides de todo el cuerpo, incluyendo las Placas de Peyer, contienen microorganismos y un infiltrado de linfocitos y macrófagos, características de una inflamación crónica (Scherer y Miller, 2001; House et al., 2001; Zhang et al., 2003).

En resumen, tras una inoculación oral letal de salmonelas tifoides, las bacterias atraviesan rápidamente la barrera intestinal para colonizar las Placas de Peyer por la infección de los macrófagos en este tejido linfoide. Las bacterias sobreviven y se replican dentro de los macrófagos y posteriormente migran (vía el sistema linfático) al bazo y al hígado en los primeros 3 ó 4 días. La replicación dentro del tejido retículo-endotelial y la infiltración de células inflamatorias (p. e. macrófagos y neutrófilos) resultan en hepato-esplenomegalia, necrosis focal y bacteremia, seguida por la muerte del ratón en 5 a 8 días (Zhang et al., 2003).

La patogénesis de *S. enterica* serovar Typhimurium es un proceso multifactorial complejo que es la consecuencia de la actividad de los productos de numerosos genes bacterianos, tanto ya conocidos como nuevos, encargados en conjunto de establecer la infección y de persistir dentro del hospedante, sugiriendo que cierta clase de genes son requeridos en tiempos específicos durante la infección y proveyendo un fundamento para clasificar a la patogénesis de *Salmonella* en distintas fases temporales. Se estima que al menos el 4% del

genoma de *S. enterica* serovar Typhimurium está involucrado en la virulencia (Bowe et al., 1998; Hurley y McCormick, 2003; Chan et al., 2005; Lawley et al., 2006).

1.4 INMUNOLOGÍA

La respuesta inmune innata está constituida por mecanismos de defensa del hospedante que no son adquiridos tras la exposición a agentes infecciosos. Estos mecanismos no involucran una proliferación de linfocitos clonales en respuesta al antígeno, no requieren de un período de activación prolongado y constituyen la primera línea de defensa en contra de un agente infeccioso. Su papel en promover las respuestas inmunitarias específicas o adaptativas, así como en la patogénesis de la enfermedad causada por *Salmonella*, son áreas importantes de investigaciones futuras por diversos grupos de trabajo, que pueden definir los principios importantes de las interacciones bacterianas con las células del sistema inmune.

Los mecanismos relevantes de inmunidad innata hacia la infección causada por *Salmonella* incluyen la acidez gástrica, la peristalsis, el complemento, las opsoninas, los péptidos antimicrobianos, los cilios, la mucina, la lisozima y el glucocálix de las células intestinales. Los mecanismos importantes de inmunidad innata después de la invasión son la fagocitosis, la actividad antimicrobiana dentro de los fagosomas (péptidos antimicrobianos, nitratos, radicales de oxígeno, acidez) y la secreción de quimiocinas y citocinas en respuesta a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por “Pathogen-Associated Molecular Patterns”) de *Salmonella*, como el lipopolisacárido (LPS) (Scherer y Miller, 2001; Abbas y Lichtman, 2004). Los tipos celulares que median la inmunidad innata son las células blancas sanguíneas como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos asesinos naturales (NK, por “Natural Killer) y células cebadas o mastocitos. Estas células funcionan como centinelas, fagocitando y matando a los patógenos y coordinando, a su vez, las respuestas adicionales del hospedante para sintetizar una gran variedad de mediadores inflamatorios y citocinas (Abbas y Lichtman, 2004).

Los PAMPs son motivos presentes en la superficie de los organismos invasores que tienen papeles esenciales en la biología de los agentes invasores, y por tanto no están sujetos a altas tasas de mutación. Algunos PAMPs son las

mananas de la pared celular de las levaduras, los péptidos formilados, el ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano y varios componentes de las envolturas celulares bacterianas, tales como el LPS, los lipopéptidos, los péptidoglicanos y los ácidos teicoicos (Aderem et al., 2000; Kirby et al., 2002).

El principal reto del hospedante ante una infección con un agente extraño como *Salmonella*, es detectar al patógeno y activar una respuesta defensiva rápida alertando al sistema inmune adaptativo. Esto se logra por el uso de un número restringido de receptores presentes en las células centinelas que reconocen motivos conservados en la superficie de los patógenos, que no son encontrados en las células eucariotas superiores. Estos receptores son de dos clases, aquellos que median la fagocitosis y aquellos que conducen a la activación de vías pro-inflamatorias. Ambas clases pertenecen a un grupo de proteínas comprendidas en la familia de receptores “Toll” o “Toll-like” (TLRs por “Toll-like receptors”), que llevan a cabo su papel en organismos vertebrados e invertebrados (Aderem et al., 2000).

En el caso del LPS, éste es reconocido por el receptor “Toll-like” 4 (TLR4), que es una molécula que atraviesa la membrana celular y transmite señales por su cadena proteica intracelular. La activación de estas proteínas se extiende hacia el factor transcripcional nuclear llamado NF- κ B que migra desde el citoplasma al núcleo de la célula. NF- κ B reconoce promotores y activa la transcripción de genes que codifican para moléculas de adhesión, para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y para otras citocinas como interferón gamma (IFN- γ), Interleucina-2 (IL-2), etc. (Aderem et al., 2000). En un estudio reciente, se observó que una porina de *Haemophilus influenzae* indujo la producción de citocinas como el TNF- α y la IL-6, a través del TLR2 y su proteína adaptadora asociada llamada MyD88, tanto en monocitos humanos como en macrófagos de ratón (Galdiero et al., 2004).

El principal mecanismo de defensa del hospedante en contra de *Salmonella* spp. ocurre primero a través de los neutrófilos, seguido por las células mononucleares. Estas células inflamatorias producen citocinas como el TNF- α , el

IFN- γ y las IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8. La interacción de *Salmonella* spp. con las células epiteliales conduce a la generación de un gran número de señales bioquímicas por parte de estas células, que incluyen la liberación basolateral de quimiocinas (como IL-8) (Eckmann et al. 1993) y la secreción apical del quimioatrayente epitelial inducido por patógenos (PEEC, por "Pathogen-Elicited Epithelial Chemoattractant") (McCormick et al., 1998). Estas sustancias son parcialmente responsables de guiar el reclutamiento y el tráfico de los polimorfonucleares (PMNs) a través de las células del epitelio intestinal.

Los PMN aparecen en la submucosa dentro de las primeras horas de la infección y son las primeras células que infiltran tejidos extraintestinales. También se ha descrito que existe activación de células NK, entre los 2 y 4 días después de la infección (Fierer, 2001).

El destino de *S. enterica* serovar Typhimurium depende del lugar donde la bacteria atraviese la barrera de la mucosa del hospedante, ya sea a través de las células M de las Placas de Peyer o a través de los enterocitos del íleon. Posteriormente, las salmonelas se liberan en la lámina propia donde son reconocidas primeramente por un grupo de células presentadoras de antígenos (CPAs), siendo parcialmente fagocitadas y neutralizadas predominantemente por los macrófagos, que por mucho tiempo se han considerado como las principales células blanco que encuentra la bacteria una vez que ha cruzado la barrera epitelial. Sin embargo, también se ha descrito que en el domo de los folículos, en las Placas de Peyer, hay una gran cantidad de células dendríticas y linfocitos B, y muy escasos macrófagos (Kelsall y Strober, 1996). Las células dendríticas también fagocitan *S. enterica* serovar Typhimurium y a diferencia de los macrófagos, éstas no son residentes y pueden migrar a ganglios linfáticos distales después de la ingestión de la bacteria, por lo que pueden ser un nicho importante para la diseminación sistémica de *Salmonella*. Las células dendríticas también participan de manera importante presentando a los antígenos bacterianos y ello provoca la activación de los linfocitos T y B (Hopkins y Kraehenbuhl, 1997; House, et al., 2001; Wick, 2002).

Se ha demostrado, mediante estudios de neutralización de citocinas, que el TNF- α , el IFN- γ , la IL-12 y la IL-18 son elementos importantes en la respuesta primaria temprana hacia *Salmonella*, con una contribución protectora de neutrófilos, macrófagos y células NK (Kirby et al., 2002). Galdiero, et al. (2001) demostraron que las porinas de *S. enterica* serovar Typhimurium indujeron la liberación de citocinas a través de mecanismos dependientes de linfocitos con las moléculas de superficie CD11a/CD18, apoyando así la importancia de la respuesta inmune innata en la infección por *Salmonella*.

Por otro lado, la protección en contra de una infección subsecuente por *Salmonella*, y su habilidad para curar la infección tardía o latente, está relacionada con el desarrollo de una respuesta inmune antígeno-específica. Como la mayoría de patógenos intracelulares, *Salmonella* induce primeramente una respuesta inflamatoria de células T cooperadoras 1, designada respuesta T_H1 (por “T helper”). El desarrollo de células T CD4-positivas (CD4⁺) hacia células T_H1 es inducido por la secreción de IL-12 por macrófagos infectados y por la producción del IFN- γ por parte de la población de células NK durante la fase temprana o aguda del proceso infeccioso, aunque en ratones susceptibles a la infección, la producción de IFN- γ está reducida. El papel principal del IFN- γ en la infección con *Salmonella* parece ser la inhibición del crecimiento bacteriano más que la inducción de mecanismos de muerte mediados por el hospedante (Jones y Falkow, 1996).

Las células T_H1 ayudan a erradicar las infecciones bacterianas por la activación de las propiedades de los macrófagos no infectados y por la inducción de la producción de anticuerpos circulantes, que pueden opsonizar a las bacterias extracelulares para maximizar la fagocitosis por parte de los macrófagos activados. La vacunación de ratones con *Salmonella* expresando antígenos heterólogos también puede resultar en la inducción de células T citotóxicas CD8-positivas (CD8⁺), las cuales reconocen a estos antígenos (Cookson y Bevan, 1997). El papel de células T CD8⁺ durante la infección por *Salmonella* no es clara pero ha cobrado interés debido a que humanos y ratones inmunizados con cepas

atenuadas de *Salmonella* pueden generar una respuesta de células T CD8⁺ (Lundin et al., 2002; Salerno-Goncalves et al., 2002). En este sentido, se observó que la infección de ratones con las serovariedades Typhimurium y Typhi de *S. enterica* induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos específica, dirigida contra péptidos específicos de la porina OmpC, a través de la unión a la molécula de clase I H2-K^b (miembro de las moléculas clásicas del Complejo Principal de Histocompatibilidad I o MHC-I, por “Major Histocompatibility Complex”) constituyendo así los primeros epítopes de *Salmonella* reconocidos por linfocitos T citotóxicos que son restringidos por moléculas MHC-I clásicas (Díaz-Quiñonez et al., 2004).

Asimismo, aunque las salmonelas son principalmente patógenos intracelulares, también la inmunidad humoral juega un papel en el control de la infección. *Salmonella* extracelular puede ser detectada por anticuerpos, quizás previniendo la diseminación o la invasión inicial a través de la barrera intestinal. La producción de anticuerpos del tipo de Inmunoglobulina A (IgA) secretora, es un componente importante de la respuesta humoral. Se ha demostrado que estos anticuerpos juegan un papel protector en contra de la infección por *Salmonella*, probablemente al contribuir al desarrollo de la inmunidad en mucosas. El antígeno predominante reconocido por el suero, inducido por *Salmonella*, es el LPS; sin embargo, muchos otros antígenos, incluyendo las proteínas de membrana externa (OMPs por “Outer Membrane Proteins”), son reconocidos por el suero inmune y parecen ser importantes en desarrollar una inmunidad protectora (Scherer y Miller, 2001).

La infección de ratones con *Salmonella* induce una fuerte respuesta de anticuerpos contra antígenos proteicos y también contra antígenos no proteicos, como el LPS y el polisacárido Vi; sin embargo, los resultados en distintos modelos de protección, mediada por anticuerpos específicos, han sido contradictorios debido principalmente a la susceptibilidad o resistencia innata a la infección por *Salmonella* de los animales en estudio. No obstante, las células B juegan un papel esencial en la defensa del hospedante, ya que son necesarias para la protección

eficiente de ratones susceptibles en contra de las infecciones primarias y secundarias con *S. enterica* serovar Typhimurium (Mittrücker, et al., 2000). Asimismo, experimentos de transferencia de inmunidad han demostrado que las células CD4⁺, las células CD8⁺ y también el suero son requeridos para proteger a ratones susceptibles de un reto con *S. enterica* serovar Typhimurium virulenta (Mastroeni et al., 2000).

Todos los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata descritos aquí controlan la multiplicación de la bacteria, al tiempo que empieza a disminuir la colonización (entre los 7 y los 14 días); mientras que la respuesta inmune específica se desarrolla durante la fase de eliminación de la bacteria.

1.5 PORINAS

Salmonella enterica, como toda bacteria Gram-negativa, posee una membrana interna y una externa, separadas por el periplasma (Fig. 1). La membrana externa de *S. enterica* posee, entre otros componentes, un repertorio de proteínas que forman poros, denominadas PORINAS, las cuales forman canales de difusión pasiva para el intercambio de nutrientes y productos de desecho entre el medio externo y la bacteria (Nikaido, 2003).

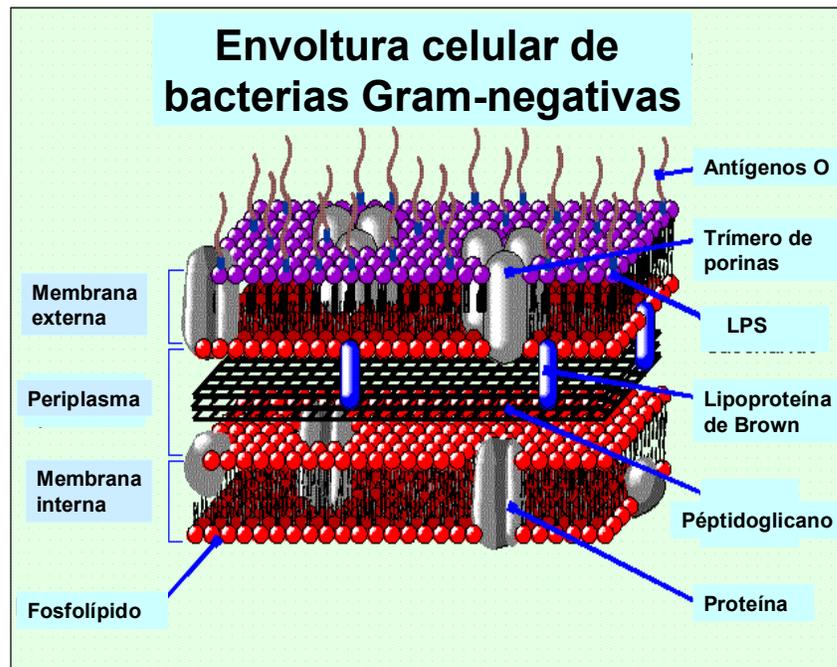


Fig. 1. Envoltura celular de bacterias Gram-negativas. Esquema obsequiado por el Dr. Constantino López-Macías (Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS, México)

Dentro de las propiedades físicas de las porinas se pueden mencionar que son moléculas de 28,000 a 48,000 Da, presentes en forma de oligómeros (agregados triméricos), en asociación no covalente con el peptidoglicano y con el LPS, con puntos isoeléctricos (pI) ácidos y un alto contenido de estructuras de hojas- β (Nikaido, 2003).

Para su estudio, Nikaido (2003) clasifica a las porinas en:

a) *La familia de las porinas clásicas*. Esta clasificación se deriva de razones históricas, ya que las porinas OmpF, OmpC y PhoE de *Escherichia coli* (y sus homólogos en otras bacterias) constituyeron la base del conocimiento actual que ahora se tiene de muchas otras porinas. Estas porinas también están presentes en *Salmonella*.

b) *Las "slow porins"*. Esta clasificación está representada por la porina OprF de *Pseudomonas aeruginosa* que entre sus características muy particulares, está la de permitir la difusión mucho más lenta de pequeños solutos en comparación a la tasa de difusión de OmpF. Un homólogo de OprF es OmpA, proteína estructural no oligomérica, presente en *E. coli* y *Salmonella*, que ha generado controversia en diversos estudios que investigan sus funciones como canal.

c) *Otras porinas en E. coli y Salmonella*. Son aquellas porinas que han sido identificadas a lo largo del genoma de estas bacterias, diferentes a OmpF, OmpC y PhoE, entre las que se pueden mencionar a NmpC, OmpN, OmpD, OmpE, OmpG, OmpL, OmpW, etc.

d) *Los canales específicos*. Estos canales catalizan la difusión espontánea de clases específicas de nutrientes. El prototipo de esta clase de porinas es la proteína LamB, que cataliza el influjo de maltosa y oligosacáridos más grandes formados por series de maltosas. Otros canales específicos son ScrY o canal de sacarosa, BglH, Tsx, FadL, etc.

e) *Los canales de compuerta o dependientes de receptores TonB*. Éstos permiten el paso de compuestos demasiado grandes como los sideróforos (quelantes de hierro de origen microbiano) y la vitamina B₁₂, que requieren de la

participación de la proteína TonB, la cual se cree que se extiende a lo largo del periplasma y que la energía derivada de la fuerza motora de los protones se transfiere a ciertos receptores y, con la participación de otras dos proteínas, se establece un transporte activo a través de la membrana externa.

f) *Los canales de exportación de la familia TolC.* Son aquellos canales que muestran un mecanismo de exportación de tipo I, en donde la proteína es exportada en un sólo paso a través de un ensamblaje de múltiples subunidades que no dependen de la vía Sec convencional. Ejemplos de proteínas que se exportan a través de estos canales son la hemolisina y la colicina V en *E. coli*, la metaloproteasa en *Erwinia chrysanthemi*, la proteasa alcalina en *P. aeruginosa* y la ciclolisina en *Bordetella pertussis*.

g) *Las secretinas, los “ushers” y los autotransportadores.* Las secretinas pertenecen al mecanismo de exportación del tipo II dependiente de la vía Sec convencional, que atraviesan la membrana externa por un proceso que requiere de muchos componentes. Un ejemplo de secretinas es el sistema Pul que exporta la enzima pululanasa en *Klebsiella oxytoca*, o el sistema Out que secreta la pectato-liasa y otras enzimas en *E. chrysantemi*. La vía de secreción llamada “chaperona-usher”, utilizada para la exportación de algunos componentes del pili P y del pili tipo I de *E. coli* requiere esencialmente de sólo dos especies proteicas, una chaperona periplásmica y un canal de membrana externa o “usher” que también ayuda al plegamiento y a la polimerización de las subunidades del pili y que son más grandes que las secretinas. Los autotransportadores son proteínas con información necesaria para su transporte en su propia secuencia peptídica, ya que usan sus dominios del carboxilo terminal para formar los canales en la membrana externa y sus dominios del amino terminal para su transporte.

Dentro de los ensayos que se realizan para investigar la funcionalidad de las porinas están: los de permeabilidad de sustratos a través de la membrana externa, al comparar cepas mutantes deficientes en porinas y su isogénica silvestre; los de formación de canales hidrofílicos; los de tamaño del canal, por ejemplo, mediante ensayos de conductancia para calcular el diámetro del poro; los

de selectividad iónica (con potenciales de membrana de “corriente-cero”); de especificidad a ciertos sustratos (como maltodextrinas y fosfatos), etc. Para todos estos diferentes estudios se ha recurrido a los modelos de membrana artificiales, como el de hinchamiento del proteoliposoma o la bicapa lipídica negra, también se han realizado ensayos en células intactas e indudablemente la estructura cristalográfica ha sido el progreso más importante en el estudio de las porinas. También se pueden mencionar nuevas herramientas como: la simulación computarizada del movimiento browniano de cationes y aniones a través de los canales; la combinación de simulaciones dinámicas moleculares con estudios de bicapas planas; o la microscopía de fuerza atómica para examinar la superficie de las porinas (Nikaido, 2003).

Dentro de las propiedades funcionales de las porinas clásicas se pueden mencionar que se trata de canales grandes (0.6 a 2.3 nm de diámetro), transmembranales, hidrofílicos, con un límite de exclusión en función a su tamaño y a su hidrofiliidad (que es aproximadamente de 600 Da), con pobre selectividad química por diferentes sustratos y más bien una selectividad hacia iones (cationes o aniones) que obedece al número y posición de aminoácidos cargados que se disponen en el interior de la porina. Las porinas aparentemente no son reguladas por voltaje en su apertura o cierre del poro y no hay gran influencia de lípidos o lipopolisacáridos para determinar su función, sino más bien es su estructura terciaria y cuaternaria la característica determinante (Nikaido, 2003).

De acuerdo a estudios de difracción electrónica y cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de las porinas triméricas constituyen monómeros que cruzan la bicapa lipídica a manera de un barril- β o por series de 16 hojas- β (Fig. 2). La longitud de cada hoja transmembranal va de sólo 7 (en la hoja 5) hasta 16 (en la hoja 1). El contacto entre los monómeros se estabiliza por interacciones hidrofóbicas y polares, y el asa 2 tiende a doblarse sobre la pared del barril de la subunidad vecina jugando también un papel en la estabilización. La superficie externa del barril está ocupada por cadenas laterales lipofílicas y las hojas transmembranales se conectan por pequeñas asas o “vueltas” del lado

periplásmico, pero las asas que las conectan en el lado externo son largas (el asa 3 que conecta la hoja 5 con la 6 tiene 33 residuos) y se dobla hacia dentro del barril para producir la angostura del canal o el “ojo” del canal (a menudo llamado “eyelet”). La naturaleza de los residuos alineados en la pared del canal provee una explicación razonable de las características de difusión a través de las porinas (Fig. 2) (Nikaido, 2003; Schulz, 2002).

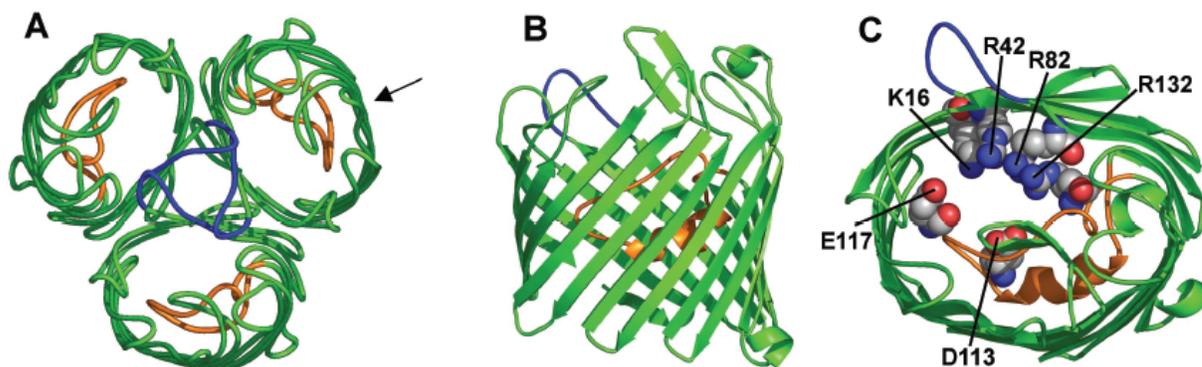


Figura 2. Estructura de la porina OmpF de *E. coli*. A) Trímero visto a través del poro desde la parte superior, esto es, en dirección perpendicular al plano de la membrana. El asa 2, coloreada en azul, juega un papel en la interacción del monómero con su unidad vecina. El asa 3, coloreada en anaranjado, estrecha el canal. B) Monómero visto lateralmente, a lo largo del eje de la membrana señalado por la flecha del panel A. Las asas 2 y 3 están coloreadas como se indica en el panel A. C) Monómero visto desde la parte superior, mostrando el “ojo” del canal o “eyelet”, que constituye la región constreñida del canal. El “ojo” del canal se forma por los residuos de Glu117 y de Asp113 del asa 3; así como de cuatro residuos de la pared opuesta del barril, Lys16, Arg42, Arg82 y Arg132, todos mostrados como esferas. Imagen tomada de Nikaido, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2003) 67: 593-656 (Nikaido, 2003)

En *E. coli*, se identificó a la porina OmpN, la cual muestra un alto porcentaje de homología con OmpS2 de *S. enterica* serovar Typhi. Se realizaron ensayos para determinar sus propiedades bioquímicas y funcionales, en comparación con las porinas clásicas no específicas OmpC, OmpF y PhoE. Comparada con la porina OmpF de *E. coli* K-12, la proteína OmpN contiene un trecho adicional de 9 residuos de aminoácidos, que se predice están localizados en el asa L7 que está expuesta a la superficie. En términos de propiedades funcionales, las porinas OmpN y OmpC poseen valores de conductancia de canal muy similares, hallazgo que puede ser explicado por la observación de que ambas porinas contienen insertos cortos en regiones de dos asas (correspondientes a L4 y L8) comparadas a las porinas OmpF y PhoE. En contraste, el paso de mono- y disacáridos de la proteína OmpN se asemeja más a la de la porina OmpF que a la de OmpC (Prilipov et al, 1998).

Salmonella enterica serovar Typhimurium sintetiza cuatro porinas de manera abundante, por lo que se les llaman también mayoritarias: OmpC, OmpF, PhoE y OmpD, que en términos de masa pueden representar hasta un 2% de la bacteria (Nikaido, 2003).

Los genes *ompC* y *ompF* codifican para dos de las porinas mayoritarias en *E. coli* y *S. enterica*. Los genes *ompS1* y *ompS2* en *S. enterica* serovares Typhi y Typhimurium codifican para otras dos porinas que se expresan en niveles muy bajos en condiciones estándar de laboratorio, con respecto a las mayoritarias OmpC y OmpF. OmpD es una porina clasificada dentro de las otras porinas en *E. coli* y *Salmonella* que sólo es producida por *S. enterica* serovar Typhimurium, pero que se puede considerar como un miembro adicional de la familia de porinas clásicas; ya que tiene propiedades de canal comparables a aquellas de OmpF u OmpC, analizadas en ensayos de conductancia de canal simple. OmpS1 y OmpS2, así como OmpC y OmpF están reguladas por el sistema de dos componentes OmpR/EnvZ, codificadas en el operón *ompB* (Puente et al., 1991; Oropeza et al., 1999); además, *ompS1* es regulado negativamente por la proteína HN-S (Flores-Valdez et al., 2003) y *ompS2* positivamente por el regulador global

LeuO (Fernández-Mora et al., 2004). OmpD, en cambio, depende de AMP cíclico y de condiciones de anaerobiosis para su expresión (Santiviago et al., 2003).

II. ANTECEDENTES

Diversos estudios han demostrado que las porinas poseen propiedades inmunogénicas y profilácticas. La vacunación de ratones con porinas purificadas de *S. enterica* serovar Typhi y Typhimurium proporcionan protección contra el reto con cepas virulentas de *Salmonella* (Kuusi et al., 1981; Isibasi et al., 1988; Muthukummar y Mutukkaruppan, 1993) y se ha demostrado que las porinas OmpC y OmpF participan en esta inmunidad protectora, donde actúan tanto la respuesta humoral como respuestas de linfocitos T CD4⁺ (Isibasi et al., 1992; González et al., 1993). Las porinas de *S. enterica* serovar Typhi también inducen respuestas inmunitarias en el humano, propiedad que puede ser empleada como herramienta diagnóstica en la fiebre tifoidea (FT), ya que es posible detectar anticuerpos que reconocen a las porinas en el suero de pacientes en fase de convalecencia de la enfermedad (Calderón et al., 1986; Verdugo-Rodríguez et al., 1993). Además, la vacunación de voluntarios sanos con una dosis subcutánea de porinas induce una respuesta de anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2, y respuestas de células T caracterizadas por la producción de IFN- γ (Salazar-González et al., 2004).

En un estudio reciente se observó que las porinas OmpC y OmpF de *S. enterica* serovar Typhi inducen una respuesta de memoria de anticuerpos de larga vida en ausencia de adyuvantes exógenos, independientemente de la ruta de inmunización (intravenosa o subcutánea) (Secundino et al., 2006). En este estudio, además se determinó que una inmunización con porinas de *S. enterica* serovar Typhi en ratones es capaz de inducir un efecto bactericida y con unión al anticuerpo, tanto en una respuesta primaria como en una secundaria. Asimismo, las subclases de inmunoglobulinas que se inducen predominantemente en la respuesta de memoria anti-porinas son IgG1, IgG2b e IgG2a; estas últimas responsables del efecto bactericida de larga duración. Finalmente, se vio que OmpC induce una respuesta bactericida persistente y OmpF genera únicamente anticuerpos bactericidas después la dosis de refuerzo, sugiriendo que los anticuerpos de larga duración anti-OmpF reconocen principalmente epítopes no expuestos sobre la superficie bacteriana (Secundino et al., 2006).

Dentro de las propiedades inmunobiológicas de las porinas, están la inducción y liberación de diferentes citocinas como IL-6, IL-8 y TNF- α (Galdiero et al., 2001); así como la activación de proteínas como tirosín-cinasa, PKA y PKC (proteín-cinasa A y C, respectivamente) (Galdiero et al., 2003), mediante la inducción con porinas aisladas a partir de *S. enterica* serovar Typhimurium en células monocíticas. Asimismo, se ha demostrado que las porinas participan en vías de transducción de señales en macrófagos intestinales activados con éstas (Gupta et al., 1999). Se ha involucrado a la porina OmpC en el reconocimiento de la bacteria por macrófagos durante los estadios iniciales de la infección (Negm y Pistole, 1999) y OmpS1 parece tener un papel importante en la fisiología de *S. enterica* serovar Typhimurium, ya que la interrupción del gen ha demostrado interferir con la formación de “biofilms” y el movimiento tipo “swarming” (Toguchi et al., 2000; Wang et al., 2004).

Se ha reportado que las porinas y sus reguladores juegan un papel importante en virulencia, ya que mutantes en *ompB* (el operón que codifica para las proteínas OmpR y EnvZ) y en *ompC* afectan la invasión y la diseminación intercelular de *Shigella flexneri in vitro* (Bernardini, et al., 1990 y 1993). En *S. enterica* serovar Typhimurium, mutantes en *ompR*, así como una doble mutante *ompC ompF* incrementan la dosis letal media más de 1,600 y 300 veces, respectivamente, en relación con una cepa tipo silvestre (Dorman et al., 1989; Chatfield et al., 1991); además, mutantes en *ompR* no son citotóxicas para macrófagos *in vitro* (Lindgren et al., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que el sistema de dos componentes OmpR/EnvZ regula la Isla de Patogenicidad-2 de *Salmonella* (SPI-2) a través de mediar la respuesta de la bacteria frente a la detección de un pH ácido, y en menor proporción a la ausencia de Ca²⁺ y a la baja osmolaridad (Garmendia et al., 2003) después de su entrada en el macrófago. De esta manera, la forma fosforilada de OmpR, a través de la proteína detectora EnvZ (Kim et al., 2004), promueve la eficiente transcripción de *ssrA* al unirse a su promotor. El gen *ssrA* es el primero del operón *ssrAB*, que constituye, a su vez, un sistema de dos componentes codificado en la SPI-2, que regula el sistema de

secreción tipo III que se requiere para la infección sistémica de *Salmonella* (Lee et al., 2000; Kim et al., 2004).

Con respecto a LeuO, en el modelo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* en el estudio de gastroenteritis de *S. enterica* serovar Typhimurium, se observó que la interrupción del gen *leuO* interfirió con la transmigración de polimorfonucleares (PMN) en la mucosa y en el lumen intestinal en un 37% con respecto a la cepa tipo silvestre, por lo que se identificó a esta proteína como un nuevo factor de virulencia en *S. enterica* (Tenor, et al., 2004). Más recientemente, en un estudio diseñado para identificar genes de *S. enterica* serovar Typhimurium requeridos para el establecimiento y la persistencia de la bacteria en el bazo y en el hígado, mediante un escrutinio del genoma completo basado en microarreglos, se identificó a *leuO*, como un gen importante en los primeros 7 días post-infección intraperitoneal (Lawley et al., 2006).

Para definir el papel de *ompS1* y *ompS2* de *S. enterica* serovar Typhimurium en virulencia, se generaron una serie de mutantes en las cuales los genes codificantes para estas porinas minoritarias, así como los genes que codifican para OmpR, EnvZ y LeuO, fueron eliminados de acuerdo al procedimiento de inactivación de tipo no polar por un solo paso utilizando productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por "Polymerase Chain Reaction") y reemplazados por un casete que confiere resistencia a un antibiótico, descrito por Datsenko y Wanner (2000). Estas mutantes fueron evaluadas en ensayos *in vivo*, determinando la dosis letal media (LD₅₀) y los Índices Competitivos (ICs) en hígado y en bazo; así como en ensayos *in vitro* mediante la obtención del Índice Competitivo en Invasión (ICI) y el Índice Competitivo en Proliferación (ICP).

III. HIPÓTESIS

Las proteínas de membrana externa OmpS1 y OmpS2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, porinas de baja expresión en condiciones estándar de laboratorio, así como proteínas involucradas en su regulación, tales como OmpR, EnvZ y LeuO, están involucradas de manera importante en las diferentes etapas de la patogénesis de *S. enterica*.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el papel de las porinas OmpS1 y OmpS2 en la patogénesis de *Salmonella enterica*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de las mutaciones $\Delta ompS1$ y $\Delta ompS2$ en el modelo murino.
2. Determinar el efecto de las mutaciones $\Delta ompS1$ y $\Delta ompS2$ en la interacción con células en cultivo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y plásmidos

La descripción de las cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium y los plásmidos que se emplearon en este estudio se resumen en la Tabla 1. Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido LB (Luria-Bertani). (Ver Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo para consultar su composición y modo de preparación).

Tabla 1. Cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium y plásmidos

Cepas o Plásmidos	Descripción	Fuente o Referencia
<i>Cepas</i>		
ATCC 14028	Silvestre (Sp ^R)	ATCC Núm. CDC 6516-60
STMS14	ATCC 14028 $\Delta ompS1::Km$	Este estudio
STMS23	ATCC 14028 $\Delta ompS2::Km$	Este estudio
STMR	ATCC 14028 $\Delta ompR::Km$	Este estudio
STMZ	ATCC 14028 $\Delta envZ::Cm$	Este estudio
STMLEUO1	ATCC 14028 $\Delta leuO::Km$	Este estudio
STMS23S15	STMS23 $\Delta ompS1::Cm$	Este estudio
STMD	ATCC 14028 $\Delta ompD::Km$	Este estudio
STMA1	ATCC 14028 $\Delta invA::Cm$	Este estudio
<i>Plásmidos</i>		
pKD46	oriR101ts, sistema de recombinasa λ Red bajo el promotor <i>paraB</i> ; Amp ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pKD4	Derivado de pANTS γ conteniendo una secuencia flanqueante FRT al gen de Km ^R a partir del pCP15	Datsenko y Wanner, 2000
pKD3	Derivado de pANTS γ conteniendo una secuencia flanqueante FRT al gen de Cm ^R a partir del Psc140	Datsenko y Wanner, 2000
pFMtrc12	P15A1 <i>lacl trcp</i> Amp ^R	Fernández-Mora et al., 2004
pFMtrcleuO	Derivado del vector pFMtrc12 portando el gen <i>leuO</i>	Fernández-Mora et al., 2005
pFM2001	Derivado del vector pACYC184 portando el gen <i>ompR</i>	Este estudio
pROZ	Derivado del vector pMPMA6 portando el gen <i>envZ</i>	Este estudio

5.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras de la cepa endogámica BALB/c, naturalmente susceptibles a la infección causada por *Salmonella*, de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos de Harlan Sprague-Dawley Inc., México. Los animales se mantuvieron en el cuarto de patógenos adscrito al bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM, donde se les suministró alimento y agua *ad libitum*. El trabajo experimental realizado con los animales, así como el método de eutanasia empleado en este estudio se llevaron a cabo siguiendo los protocolos aprobados por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de “National Institutes of Health”, con número de publicación 93-23.

5.3 Líneas Celulares

Para los ensayos de Índices Competitivos en Invasión (ICI) se utilizó la línea de células epiteliales de origen humano HeLa, derivada de un carcinoma de cérvix, obtenida de la ATCC con número CCL-2 y fue un obsequio del Dr. Alejandro García-Carrancá (Laboratorio de Virus y Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, México). La línea HeLa se cultivó en el medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM, por “Dulbecco’s modified Eagle Medium”) (Gibco) (Ver Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo para consultar su modo de preparación). La línea de células fagocíticas utilizada para los ensayos de Índices Competitivos en Proliferación/Sobrevivencia (ICP) fue la J774.A1, macrófagos de origen murino de la cepa endogámica BALB/c, obtenida de la ATCC con número TIB-67 y fue cultivada en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco) (Ver Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo para consultar su modo de preparación).

5.4 Generación de mutantes

La eliminación específica e intercambio de los genes *ompS1*, *ompS2*, *ompR*, *envZ*, *leuO*, *ompS1 ompS2*, *ompD* e *invA* por un gen de resistencia a un

antibiótico (kanamicina -Km- o cloranfenicol -Cm-) se realizó de acuerdo a la estrategia de mutagénesis dirigida con productos de PCR descrita por Datsenko y Wanner (2000), basada en el sistema λ Red, en el cual la recombinasa Red del fago λ se sintetiza bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias y fácilmente curable (pKD46). El producto mutagénico se obtuvo por PCR usando oligonucleótidos de 42-bp a partir del plásmido pKD3 o pKD4 (Cm^R o Km^R, respectivamente). Asimismo, se usaron diferentes juegos de oligonucleótidos para verificar la adecuada sustitución del gen a eliminar por el casete de resistencia al antibiótico (Tabla 2 del artículo anexo a este trabajo: Rodríguez-Morales et al. *Infect. Immun.* (2006) 74:1398-1402).

5.5 Caracterización de mutantes por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por “Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel”)

Se cultivaron las cepas a evaluar en 50 ml de medio líquido LB y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm. Se realizó la preparación de proteínas de membrana externa (PMEs), según el método descrito por Lowry et al. (1951), tomando las muestras a la quinta hora de crecimiento. Las preparaciones de PMEs se analizaron por SDS-PAGE, a 30 mA por 6 horas, en un gel con acrilamida al 11%, bisacrilamida al 0.12%, urea al 8 M y SDS al 0.1%. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

5.6 Ensayos de cinética bacteriana en diferentes medios de cultivo

Las cepas bacterianas se crecieron en medio líquido LB durante 12 horas, con los antibióticos correspondientes, posteriormente se hizo un subcultivo (1:1,000) en los diferentes medios de cultivo a evaluar: medio LB, medio MNN (medio nutritivo con 0.3 M de NaCl, de alta osmolaridad) y medio MN (medio nutritivo de baja osmolaridad) (Verdugo-Rodríguez et al., 1993) (Ver Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones en este trabajo para consultar su composición y

modo de preparación). Los subcultivos se incubaron a 37°C con agitación a 110 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se lavaron dos veces con solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS 1X) (ver el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones para consultar su composición y modo de preparación) y se ajustaron a una densidad óptica de 1.8 (A_{590nm}). Con este inóculo se hizo nuevamente un subcultivo (1:150) en cada uno de los diferentes medios de cultivo con los antibióticos correspondientes, se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm y se registró el crecimiento de las cepas cada hora durante 12 a 24 horas, midiendo la densidad óptica (A_{590nm}).

5.7 Ensayos de dosis letal 50% (LD₅₀)

Para la determinación de la LD₅₀, se inocularon grupos de seis animales, con diluciones décuples seriadas de *S. enterica* serovar Typhimurium vía oral, usando una aguja de alimentación de acero inoxidable (22 x 1[1/2] no. 7920. Popper & Sons, Inc., New Hyde Park, NY). Se registraron las muertes ocurridas durante los siguientes 28 días y se representó como porcentaje de animales vivos. La LD₅₀ se calculó por el método de Reed y Muench (1938) en 3 a 4 repeticiones. Como control negativo, se usaron ratones a los que se les inoculó sólo PBS 1X. A todos los grupos de ratones se les administró 0.1 ml de bicarbonato de sodio al 1.0% esterilizado por autoclave, 30 min antes de la infección oral con la finalidad de neutralizar el pH ácido del estómago, como se ha reportado previamente en inoculaciones orales con *Salmonella* (Kirby et al., 2002).

El número de bacterias se calculó a partir de una curva estándar graficando unidades formadoras de colonias (UFC) contra absorbancia a 540 nm (A_{540nm}). Las cepas bacterianas se crecieron toda la noche en medio líquido LB a 37°C, con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se realizó un subcultivo (1:10), y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 6 horas. Se ajustaron las bacterias a una densidad óptica de 0.6 unidades de A_{540nm} (considerando este punto = 3.2×10^8 bacterias por ml, para la cepa tipo silvestre). El número de

bacterias se confirmó en cada experimento realizando diluciones décuples seriadas del cultivo bacteriano en PBS 1X, cultivando 100 μ l de las tres últimas diluciones (10^2 , 10^1 y 10^0) en placas de agar LB durante 18 a 24 h a 37°C, por duplicado y cuantificando las UFC.

5.8 Ensayos de competencia *in vivo*

Para la determinación del Índice Competitivo (IC) entre la cepa tipo silvestre y una mutante en particular, se inocularon los ratones por vía oral (infección oral = IO) y por vía intraperitoneal (infección intraperitoneal = IIP), con 0.3 ml de mezclas equivalentes de ambas cepas, con un inóculo total de 10^8 y 10^5 bacterias por ratón, respectivamente. Los ratones se sacrificaron seis y tres días después de la IO y de la IIP, respectivamente, y se extrajeron asépticamente el bazo y el hígado. Los órganos fueron homogeneizados en 5 ml de PBS 1X. Las células resuspendidas fueron lisadas agregando un volumen equivalente de desoxicolato de sodio al 0.5% en PBS 1X e incubándolas a temperatura ambiente durante 15 min. Las diluciones décuples seriadas de las células lisadas se sembraron en cajas preparadas con medio LB con agar al 0.8% con Km (40 μ g/ml) o con Cm (25 μ g/ml) para la cuantificación de las UFC por miligramo de órgano para la cepa mutante y sin antibióticos para las UFC de la mezcla de las cepas mutante y silvestre.

Para la determinación del IC en sangre, se infectaron a los ratones vía oral de manera similar que para los ICs en bazo y en hígado. A las 48 horas post-inoculación se colectó una muestra de sangre de la vena caudal, realizando un corte preciso y rápido con una hoja de bisturí en la porción distal de la cola del animal, previo acercamiento de éste a una fuente de luz (calor) durante 5 minutos con el fin de provocar su turgencia. Inmediatamente después de la colección de la muestra, se agregó un volumen equivalente de una solución hipotónica (agua desionizada estéril) para provocar la lisis de los eritrocitos y la consecuente liberación de las bacterias. Se realizaron diluciones décuples seriadas del tejido

sanguíneo lisado y se sembraron en cajas preparadas con medio LB con agar al 0.8% con Km (40µg/ml) o con Cm (25 µg/ml) para la cuantificación de las UFC por mililitro de sangre para la cepa mutante y sin antibióticos para las UFC de la mezcla de las cepas mutante y silvestre.

Los ICs se calcularon al obtener la razón entre las bacterias mutante y silvestre recuperadas de los órganos o la sangre dividida entre la razón obtenida entre el inóculo de infección de bacterias mutante y silvestre; es decir, empleando la siguiente ecuación (Beuzón y Holden, 2001):

$$IC = \frac{[\text{UFC mutantes recuperadas de órganos} / \text{UFC silvestres recuperadas de órganos}]}{[\text{UFC mutantes inoculadas al ratón} / \text{UFC silvestres inoculadas al ratón}]}$$

5.9 Ensayos de competencia *in vitro*

Para la determinación del Índice Competitivo en Invasión (ICI) en células epiteliales HeLa entre la cepa tipo silvestre y una mutante en particular, se realizaron ensayos de protección con gentamicina descritos previamente (Segura et al., 2004; Tang et al., 1993). Se prepararon placas de 24 pozos con 5×10^4 células por pozo a una confluencia del 90%. Las bacterias fueron crecidas bajo condiciones limitadas de oxígeno y recolectadas en la fase temprana-media de crecimiento logarítmico (~ 0.2 de $A_{590\text{nm}}$). Se infectaron las células con una mezcla 1:1 de mutante y silvestre con una multiplicidad de infección de 100. Se permitió la invasión por 1 hr, se lavaron las células con PBS 1X y se adicionó gentamicina (Gm) a una concentración final de 50 µg/ml para matar a las bacterias extracelulares. Al cabo de 2 horas se lavaron las células con PBS 1X, se realizó la lisis celular con desoxicolato de sodio al 0.5% y se sembraron las diluciones décuples seriadas de las células lisadas en cajas preparadas con medio LB con agar al 0.8% con Km (40µg/ml) para la cuantificación de las UFC de la cepa

mutante y sin antibiótico para las UFC de la mezcla de las cepas mutante y silvestre.

. El ICI se calculó obteniendo la razón entre las dos cepas intracelulares dividido entre la razón de las dos cepas en el inóculo de infección; es decir, empleando la siguiente ecuación (Segura et al., 2004):

$$ICI = \frac{[UFC \text{ mutantes a las 3 h post-infección} / UFC \text{ silvestres a las 3 h post-infección}]}{[UFC \text{ mutantes del inóculo de infección} / UFC \text{ silvestres del inóculo de infección}]}$$

Para la determinación del Índice Competitivo en Proliferación/Sobrevivencia (ICP) en macrófagos de ratón J774A.1 entre la cepa tipo silvestre y una mutante en particular, se procedió de igual manera que para las células epiteliales. Se infectaron dos placas de macrófagos con una mezcla 1:1 de cepas mutante y silvestre con una multiplicidad de infección de 10. En ambas placas se permitió la invasión por 1 hr, se lavaron las células con PBS 1X y se adicionó gentamicina (Gm) a una concentración final de 50 μ g/ml para matar a las bacterias extracelulares. Al cabo de 5 minutos, se lavaron las células de una de las placas con PBS 1X, se realizó la lisis celular con desoxicolato de sodio al 0.5% y se sembraron las diluciones décuples seriadas de las células lisadas en cajas preparadas con medio LB con agar al 0.8% con Km (40 μ g/ml) para la cuantificación de las UFC de la cepa mutante y sin antibiótico para las UFC de la mezcla de las cepas mutante y silvestre. La concentración de Gm en la segunda placa se redujo a 10 μ g/ml después de la cuarta hora de haber sido adicionada para reducir los efectos tóxicos del antibiótico sobre los macrófagos y las bacterias intracelulares y se concluyó la incubación durante 24 horas. El ICP se calculó obteniendo la razón entre las dos cepas intracelulares de la segunda placa dividido entre la razón de ambas cepas intracelulares de la primera placa; es decir aplicando la siguiente ecuación (Segura et al., 2004):

$$\text{ICP} = \frac{[\text{UFC mutantes a las 24 h post-Gm} / \text{UFC silvestres a las 24 h post-Gm}]}{[\text{UFC mutantes a las 1:05 h post-infección} / \text{UFC silvestres a las 1:05 h post-infección}]}$$

5.10 Ensayos de excreción bacteriana en heces

Se infectaron grupos de 4 ratones por vía oral con una mezcla aproximada de 1:1 de la cepa silvestre y una cepa mutante en particular, en una dosis total de 10^8 UFC/ratón. Se recolectaron las heces y se homogeneizaron en 1ml de PBS 1X. Se hicieron diluciones décuples seriadas y se sembraron en cajas con medio MacConkey (Difco) adicionado con los antibióticos apropiados: Km (40 μ g/ml) y Sp (25 μ g/ml) para las mutantes sencillas; Km (40 μ g/ml), Cm (25 μ g/ml) y Sp (25 μ g/ml) para la doble mutante; y Sp (25 μ g/ml) únicamente para la mezcla de mutante con silvestre. El MacConkey es un medio suplementado con sales biliares que lo hacen selectivo para el género *Salmonella* y con un indicador de pH, que permite diferenciar entre bacterias fermentadoras de la lactosa (como *E. coli*) y no fermentadoras de la lactosa (como *Salmonella* spp.). El empleo de este medio de cultivo en este ensayo de excreción de *Salmonella* en heces, proporciona un método de selección más estricto para la cuantificación confiable de bacterias del género *Salmonella* presentes en las heces, eliminando así todo tipo de contaminación proveniente de la microbiota normal del hospedante, principalmente constituida por *E. coli* comensal. Los datos fueron normalizados al dividir la razón de las bacterias recuperadas (UFC de la cepa mutante/UFC de la cepa silvestre) entre la razón de las bacterias inoculadas (UFC de la cepa mutante/UFC de la cepa silvestre) (Kingsley, et al., 2003).

5.11 Ensayos de susceptibilidad a ácidos grasos de cadena corta (SCFAs por “Short Chain Fatty Acids”)

Se crecieron las cepas bacterianas a evaluar, en medio líquido LB durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. De este cultivo se inocularon 125 μ l en un matraz con 50 ml de medio LB (pH 7.0) y se incubaron a 37°C con agitación

a 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2 (A_{600nm}). Se agregó una solución madre de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) que consistió de acetato, propionato y butirato (1 M; pH 7.0, ajustado con NaOH) que se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.45 μm , a una concentración final de 50, 100 y 200 mM y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. El crecimiento de las cepas fue registrado cada hora durante 24 horas, determinando la densidad óptica (A_{600nm}) y por conteo de UFC/ml en agar LB, mediante diluciones décuples seriadas.

5.12 Ensayos de susceptibilidad a ácido láctico

Se crecieron las cepas bacterianas a evaluar en medio líquido LB durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. De este cultivo se inocularon 500 μl en un matraz con 50 ml de medio LB (pH 7.5) con diferentes concentraciones de ácido láctico (0.2, 0.3, 0.4 y 0.5%) y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. El crecimiento de las cepas fue registrado cada hora durante 12 horas, determinando la densidad óptica (A_{600nm}).

5.13 Ensayos de susceptibilidad a sales biliares y otros detergentes suaves

Se crecieron las cepas bacterianas a evaluar en medio líquido LB durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. De este cultivo se inoculó 1 ml en un matraz con 100 ml de medio LB (pH 7.4) con diferentes concentraciones de sales biliares (3, 5, 7.5%) y con diferentes concentraciones de desoxicolato de sodio y Tritón X-100 (0.1, 0.3 y 0.5%). Estos subcultivos se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm. El crecimiento de las cepas en sales biliares fue registrado cada hora durante 12 horas, midiendo la densidad óptica (A_{600nm}). El crecimiento con desoxicolato de sodio y con Tritón X-100 se midió determinando las UFC/ml en agar LB, mediante diluciones décuples seriadas a los 15 min, 2, 4, 8 y 12 hrs post-incubación.

5.14 Ensayos de susceptibilidad a polimixina B (péptido catiónico antimicrobiano -CAMP por “Cationic Antimicrobial Peptide”-)

Se crecieron las cepas bacterianas a evaluar en medio líquido LB durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. De este cultivo se inoculó 1 ml en un matraz con 100 ml de medio LB (pH 7.4), con una concentración final de sulfato de polimixina B de 1, 2 y 3 mg/ml y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. El crecimiento de las cepas fue registrado cada hora durante 9 horas, midiendo la densidad óptica (A_{600nm}).

5.15 Ensayos de susceptibilidad a pH ácido

Se crecieron las cepas bacterianas a evaluar en medio líquido LB durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. De este cultivo se inoculó 1 ml en un matraz con 100 ml de medio LB a diferentes pHs (3.0, 4.0, 5.0 y 6.0) ajustado con HCl y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. El crecimiento de las cepas fue registrado cada hora durante 15 horas, midiendo la densidad óptica (A_{600nm}).

VI. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las mutantes

Las mutantes obtenidas por el método de Datsenko y Wanner se verificaron por PCR utilizando oligonucleótidos complementarios a la secuencia interna del gen de resistencia al antibiótico, así como aquellos complementarios a la secuencia aledaña del gen silvestre (Tabla 2, ver artículo anexo).

Asimismo se realizó la caracterización de algunas de las mutantes por patrón de proteínas de membrana externa (PMEs) (Fig. 3), donde es posible observar la ausencia de la porina OmpS2 en la cepa mutante $\Delta ompS2$, bajo la presencia de su regulador positivo LeuO, cuyo gen va clonado en un plásmido (Fig. 3, carril 2); mientras que OmpS2 es sobreexpresada en la cepa silvestre bajo la presencia del plásmido que expresa LeuO (Fig. 3, carril 1).

Por otra parte, las mutantes en *ompR* y en *envZ* mostraron la ausencia de las porinas OmpC y OmpF, mismas que fueron restauradas al complementar en plásmido con los genes *ompR* y *envZ*, respectivamente (Fig. 3, carriles 4 al 7). Esto último ilustra particularmente el efecto no polar de las mutantes en el operón *ompB* (conformado por los genes *ompR* y *envZ*).

El carril 8 de la Fig. 3, muestra que la banda inmediatamente por debajo de OmpC y OmpF es OmpD (presente sólo en el serovar Typhimurium del género *Salmonella*), la cual desaparece en una mutante $\Delta ompD$ y no es regulada por las proteínas *ompR* y *envZ* (constituyentes del operón *ompB*).

Se hizo también una caracterización de las mutantes en su tasa de crecimiento (Fig. 4), donde no se observaron diferencias importantes en comparación con la cepa tipo silvestre cuando se probaron en medio líquido LB, en medio nutritivo de alta y baja osmolaridad (MNN y MN, respectivamente), así como en los medios utilizados para cultivos celulares (DMEM y RPMI) (Ver el Apéndice de Medios de Cultivo y Soluciones de este trabajo para consultar la composición y el modo de preparación de los medios de cultivo).

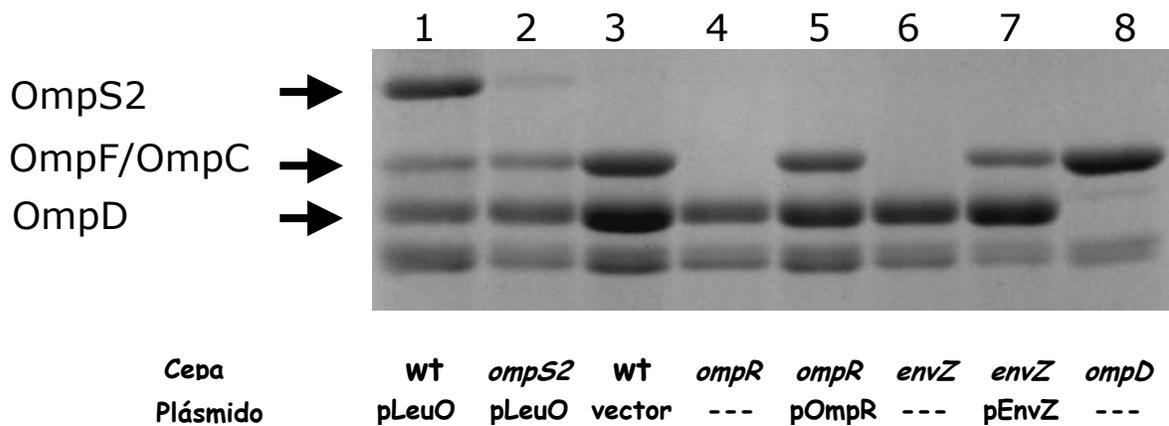


Fig. 3. Perfil de Proteínas de Membrana Externa (PMEs) de varias cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Líneas: 1, STM14028 (cepa silvestre)/pFMleuO (inducido con 50 μ M de IPTG [isopropil- β -D-tiogalactopiranosido]); 2, STMS23 ($\Delta ompS2::Km$)/pFMleuO (inducido con 50 μ M de IPTG); 3) STM14028 (cepa silvestre)/pFM12 (inducido con 50 μ M de IPTG); 4), STMR ($\Delta ompR::Km$); 5) STMR ($\Delta ompR::Km$)/pFM2001 (*ompR*); 6), STMZ ($\Delta envZ::Cm$); 7), STMZ ($\Delta envZ::Cm$)/pROZ (*envZ*); y 8), STMD ($\Delta ompD::Km$)

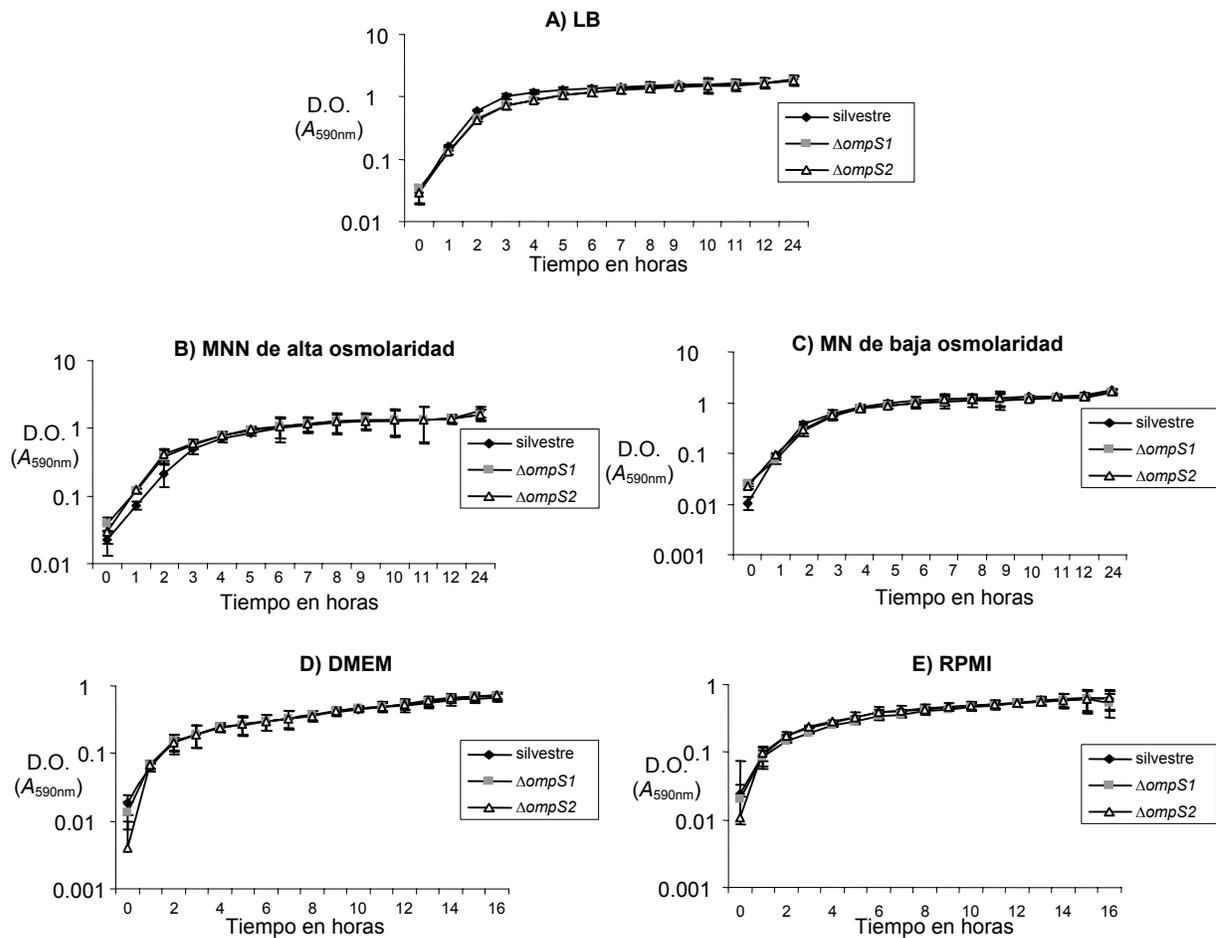


Fig. 4. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes en *ompS1* y *ompS2* de *S. enterica* serovar Typhimurium en diferentes medios de cultivo. Cada gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de 2 a 3 experimentos independientes

6.2 Dosis letal 50% (LD₅₀)

Para definir el papel de OmpS1 y OmpS2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la virulencia, se evaluaron las cepas mutantes en los genes de estas porinas y en el regulador *leuO* en un ensayo *in vivo* de LD₅₀, mediante el registro del número de individuos sobrevivientes de cada grupo de ratones a diferentes dosis de infección, como resultado del efecto acumulativo de todas las etapas involucradas en causar la letalidad al cabo de 28 días, obteniendo un número de UFC promedio en matar al 50% de la población de individuos infectados.

Como se muestra en la Tabla 2, las cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium STMS14 ($\Delta ompS1::Km$), STMS23 ($\Delta ompS2::Km$) y STMLEUO1 ($\Delta leuO::Km$) mostraron un aumento en la LD₅₀ de 10,000, >40,000 y >65,000 veces, comparada con la cepa silvestre. Estos resultados demuestran que las mutantes en estos genes están altamente atenuadas, debido a que no causan la enfermedad letal en el ratón.

Tabla 2. Dosis letal 50% de cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium en ratones BALB/c infectados vía oral

CEPA	LD ₅₀
14028 (silvestre)	1.52 x 10 ⁴
STMS14 ($\Delta ompS1::Km$)	1.53 x 10 ⁸
STMS23 ($\Delta ompS2::Km$)	>6.0 x 10 ⁸
STMLEUO1 ($\Delta leuO::Km$)	>1.0 x 10 ⁹

Como se puede apreciar en la gráfica de la Fig. 5A, se muestra un ejemplo del registro de la sobrevivencia de los ratones BALB/c a lo largo de 28 días después de la inoculación oral (IO) con diferentes dosis de la cepa tipo silvestre. El análisis de esta gráfica nos indica que la dosis de la cepa silvestre de *S. enterica* serovar Typhimurium en la que se murió el 50% de la población infectada está entre 6.1×10^3 y 6.1×10^4 . De igual manera, en la Fig 5B es posible observar la comparación de la sobrevivencia de los ratones infectados con dosis altas de la cepa mutante en el gen *leuO* y de la silvestre isogénica, donde puede concluirse que a dosis tan altas como 3.4×10^9 de la mutante en *leuO* la sobrevivencia de la población infectada es del 100%, a diferencia de la cepa silvestre, en la que con 2.4×10^7 , la sobrevivencia de la población infectada fue tan sólo del 20%, en este experimento en particular.

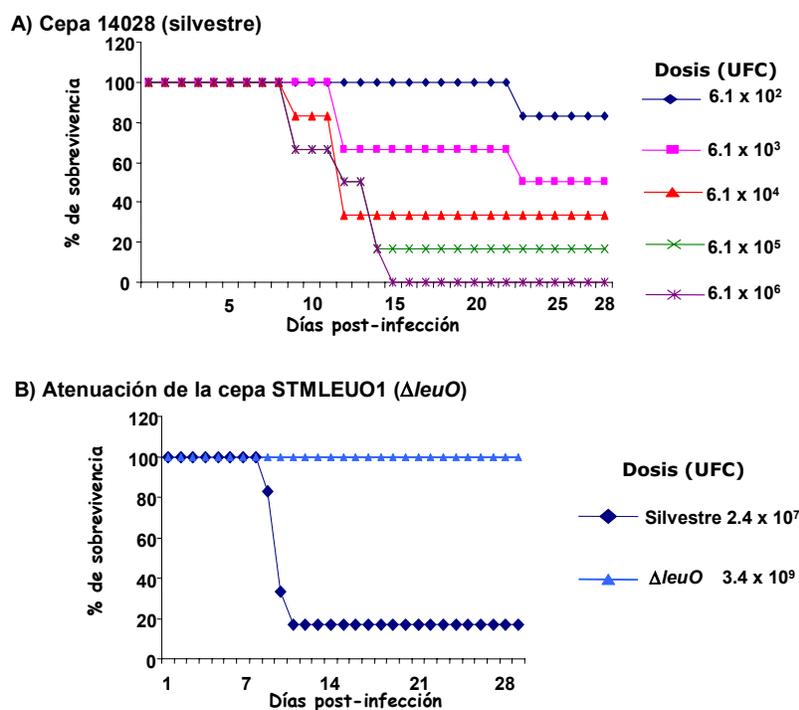


Fig. 5. Sobrevivencia de ratones BALB/c infectados con *S. enterica* serovar Typhimurium. A) Cepa 14028 tipo silvestre a diferentes dosis; B) Atenuación de la cepa STMLEUO1 ($\Delta leuO$), comparada con la cepa 14028 tipo silvestre, a dosis altas.

Durante el desarrollo del proceso infeccioso de la cepa silvestre de *S. enterica* serovar Typhimurium, los animales cursaron con signos de fiebre y de malestar general, como pérdida de apetito, piloerección, encorvamiento de la espina dorsal y tremor muscular (Fig. 6). Dichos signos se agudizaron hasta que se presentaba la muerte del animal. En el caso de las inoculaciones orales con las cepas mutantes, los animales presentaban signos leves de enfermedad y al cabo de 5 a 8 días se recuperaban por completo, sobreviviendo así a dosis mayores a 10^8 UFC.



Fig. 6. Ratón BALB/c infectado con *S. enterica* serovar Typhimurium. Los signos representativos de la enfermedad causada por *S. enterica* serovar Typhimurium en los ratones son fiebre y malestar general, caracterizados por pérdida del apetito, piloerección, encorvamiento de la espina dorsal y tremor muscular. Los animales del fondo de la jaula muestran un buen estado de salud.

6.3 Índices competitivos *in vivo*

Con la finalidad de obtener datos más sensibles acerca de la atenuación de la virulencia observada de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediante la determinación de las LD₅₀s en las mutantes evaluadas, éstas fueron sometidas a ensayos de competencia *in vivo*, en los cuales se compara los niveles de virulencia de una mutante en particular con respecto a su isogénica silvestre dentro del mismo individuo proporcionando así el grado de atenuación, al calcular la relación del número de bacterias involucradas en la causa de la letalidad, que llegan a colonizar y a establecerse en los órganos blanco sistémicos a los que tienen tropismo como son el bazo y el hígado, sitios más comunes de infección secundaria, mediante la determinación del Índice Competitivo (IC).

Los ICs en hígado y bazo, después de la infección oral (IO) de las mutantes en *ompS1* y *ompS2*, indicaron una reducción de más de 250 veces comparada con la cepa silvestre (Tabla 3); es decir, para el caso de la mutante en *ompS1*, por cada mil bacterias silvestres que se recolectaron del bazo sólo se recuperaron 3.83 mutantes, en promedio. En contraste, la capacidad de las mutantes en *ompS1* y *ompS2* para competir por el crecimiento en tejidos murinos no se vio tan severamente afectada después de la infección intraperitoneal (IIP), mostrando sólo una reducción de 4 a 5 veces, comparada con la cepa silvestre, tanto en hígado como en bazo.

Interesantemente, la atenuación que se obtuvo en los ICs de una doble mutante *ompS1 ompS2* fue el efecto aditivo de las mutaciones simples (Tabla 3); esto sugiere que cada mutación resulta en la pérdida de funciones independientes.

Otro dato que proporciona evidencias de que las porinas OmpS1 y OmpS2 tienen una participación importante durante el curso del proceso infeccioso, además de los ICs obtenidos en los órganos sistémicos de los ratones infectados, es que las mutantes *ompS1* y *ompS2* no fueron capaces de causar bacteremia en tiempos tempranos de la infección (2 días post-infección oral), ya que el IC calculado en sangre fue $<1 \times 10^{-4}$.

En lo que respecta a las mutantes en los genes involucrados en la regulación de estas porinas minoritarias, *ompR*, *envZ* y *leuO*, en la Tabla 3 también se muestran los ICs calculados a partir de estas cepas mutantes.

Para las mutantes en *ompR* y *envZ* los ICs obtenidos nos indican una reducción en su capacidad de colonizar el bazo y el hígado después de la IO, de aproximadamente 40,000 y 120,000 veces, respectivamente, en relación con la cepa silvestre; y de unas 3,000 veces después de la IIP (Tabla 3).

Con respecto a *LeuO*, el regulador positivo de *ompS2*, los ICs indicaron una sobrevivencia reducida de 500 a 1,000 veces en el bazo y en el hígado respectivamente, en relación con la cepa silvestre sólo después de la IO y menos de 10 veces después de la IIP, en ambos órganos (Tabla 3).

En resumen, todos los ICs calculados nos proporcionan información acerca del grado de atenuación de las mutantes evaluadas; donde el grado marcadamente alto se obtuvo con las mutantes en *envZ* y *ompR* por ambas rutas de infección (IO e IIP) y en la doble mutante *ompS1 ompS2* en la IO, con órdenes de magnitud entre 10^{-6} y 10^{-5} ; con un grado de atenuación alto se encontraron las mutantes en *ompS1*, *ompS2* y *leuO* en la IIP y la doble mutante *ompS1 ompS2* en la IIP, con órdenes de magnitud entre 10^{-4} y 10^{-3} ; y finalmente, con un grado de atenuación medio se ubicaron a las mutantes en *ompS1*, *ompS2* y *leuO* en la IIP, con órdenes de magnitud de 10^{-1} (Tabla 3).

Tabla 3. Índices competitivos (ICs) de infecciones mixtas orales e intraperitoneales de *S. enterica* serovar Typhimurium en ratones BALB/c.

Mutante mezclada con la silvestre	Vía de infección ^a	IC de infección en el órgano indicado ^b	
		Bazo	Hígado
<i>ompS1</i>	Oral	$3.8 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	$3.8 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$
	I.P.	0.25 ± 0.11	0.28 ± 0.17
<i>ompS2</i>	Oral	$3.4 \times 10^{-3} \pm 9.0 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-3} \pm 9.3 \times 10^{-4}$
	I.P.	0.19 ± 0.11	0.26 ± 0.12
<i>envZ</i>	Oral	$2.3 \times 10^{-5} \pm 9.0 \times 10^{-5}$	$2.6 \times 10^{-5} \pm 1.7 \times 10^{-5}$
	I.P.	$4.8 \times 10^{-4} \pm 1.4 \times 10^{-4}$	$6.8 \times 10^{-4} \pm 3.2 \times 10^{-4}$
<i>ompR</i>	Oral	$6.6 \times 10^{-6} \pm 5.7 \times 10^{-6}$	$8.7 \times 10^{-6} \pm 9.0 \times 10^{-6}$
	I.P.	$2.2 \times 10^{-4} \pm 4.2 \times 10^{-5}$	$4.4 \times 10^{-4} \pm 4.0 \times 10^{-4}$
<i>leuO</i>	Oral	$2.0 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3}$
	I.P.	0.12 ± 0.051	0.11 ± 0.041
<i>ompS1 ompS2</i>	Oral	$3.4 \times 10^{-5} \pm 1.6 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5} \pm 2.4 \times 10^{-5}$
	I.P.	$9.0 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-2}$

^a Los órganos obtenidos de las infecciones orales se colectaron a los 6 días post-inoculación; los de las intraperitoneales se colectaron a los 3 días post-inoculación

^b Los valores son promedios y desviaciones estándar de al menos dos experimentos independientes

6.4 Índices competitivos *in vitro*

Para correlacionar el efecto de las mutaciones observado *in vivo*, con la invasión de células epiteliales en cultivo, como una etapa temprana de la infección, así como con la proliferación y sobrevivencia en macrófagos en cultivo, como una etapa más tardía, se realizaron infecciones mixtas *in vitro* y se determinaron los índices competitivos en invasión (ICI) de células HeLa y los índices competitivos en proliferación/sobrevivencia (ICP) en macrófagos J774.A1.

Como se muestra en la Fig. 7A, no se observa una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre las mutantes en *ompS1* o en *ompS2* en su capacidad por invadir células epiteliales en cultivo con respecto a la cepa silvestre; a diferencia de la mutante en *invA* (gen que codifica para una proteína del Sistema de Secreción tipo III, de la Isla de Patogenicidad I, importante para la invasión de *Salmonella*) (Galán y Curtiss III, 1989), utilizada como control positivo, la cual mostró una severa reducción en su capacidad invasiva, con respecto a la cepa silvestre. De igual manera, tampoco se observó diferencia alguna en la proliferación/ sobrevivencia de las mutantes en *ompS1* y *ompS2* con respecto a la cepa silvestre en los macrófagos en cultivo, mostrando un ICP muy cercano a 1. (Fig. 7B).

Esto indica que no fue posible observar los fenotipos de atenuación obtenidos en los ensayos de competencia *in vivo* en estos ensayos en células en cultivo; lo cual nos hace ver la relevancia de validar las observaciones obtenidas en un ensayo *in vitro* en el contexto del organismo hospedante en su totalidad y complejidad.

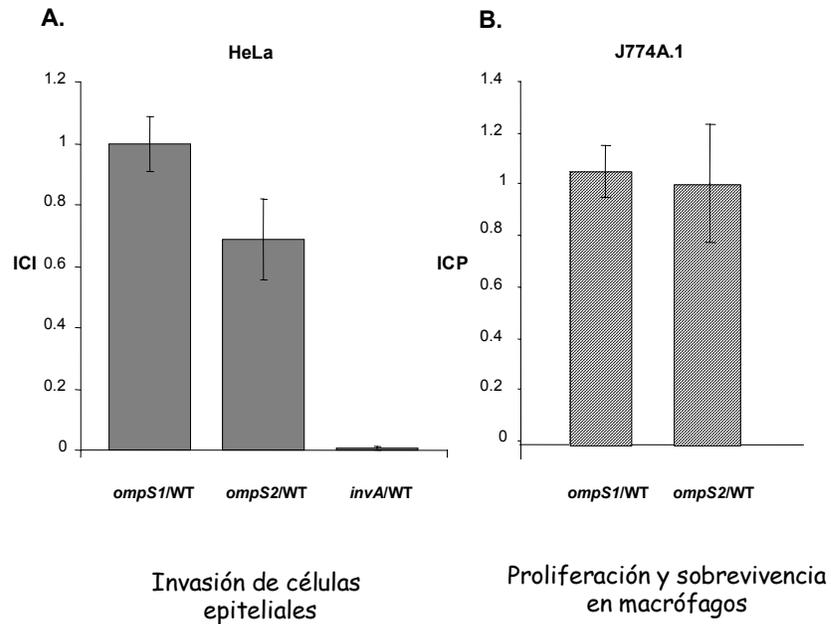


Fig. 7. Fenotipos *in vitro* de las mutantes *ompS1* y *ompS2* de *S. enterica* serovar Typhimurium. A) Índice Competitivo en Invasión (ICI) de una mezcla de cepas mutante y silvestre en una infección de células HeLa en cultivo. B) Índice Competitivo en Proliferación y supervivencia (ICP) de una mezcla de cepas mutante y silvestre en una infección de macrófagos J774.A1 en cultivo. Todos los valores son el promedio y las desviaciones estándar de al menos dos experimentos realizados por triplicado ($P < 0.001$ por la prueba *t* de Student).

6.5 Excreción de *S. enterica* en heces

Con la finalidad de averiguar si la atenuación en la virulencia, así como la obtención de ICs muy bajos en hígado y bazo se debía a un posible defecto en la sobrevivencia a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI), se determinaron las bacterias excretadas en heces, después de infecciones mixtas orales con un total de 10^8 UFC. Tanto las mutantes como la cepa silvestre se excretaron en números similares, tanto a la 1, 4, 8, 12 y 24 horas post-infección, teniendo una excreción máxima de $3 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ UFC/mg de heces a las 4 horas. Esto sugiere que durante el paso por el TGI, tanto las mutantes como la silvestre contienden de manera similar con las condiciones microambientales adversas que encuentran fuera de la célula del hospedero pero dentro del lumen intestinal, lo cual se traduce en la obtención de UFC en las heces en números similares y que hace pensar que el efecto de la atenuación y de los ICs tan bajos se explique en términos de la interacción con las células del hospedero, con las que *S. enterica* serovar Typhimurium establece los primeros contactos.

6.6 Ensayos de susceptibilidad a ciertas condiciones de estrés *in vitro*

En paralelo con los ensayos de excreción bacteriana en heces, se evaluó la susceptibilidad de las cepas bacterianas a una batería de factores de estrés, que están presentes en el TGI, tales como: acetato, propionato y butirato, de 50 a 200 mM; ácido láctico, del 0.1 al 0.5%; sales biliares, de 3 a 7.5%; otros detergentes suaves, como el desoxicolato de sodio o el tritón X-100, de 0.1 a 0.5%; polimixina B, de 1 a 3 μ g/ml y pH, de 3.5 a 6.0. De esta batería de condiciones de estrés probadas *in vitro*, no se observó ninguna diferencia importante entre las cepas mutantes en *ompS1*, *ompS2* o la doble *ompS1 ompS2* y la cepa isogénica silvestre, lo cual apoya la conclusión de que posiblemente el efecto de la atenuación y de los ICs tan bajos sea debido a que la interacción con las células del hospedero con que *S. enterica* serovar Typhimurium establece los primeros contactos se encuentre alterada.

VII. DISCUSIÓN

7.1 MUTAGÉNESIS POR EL MÉTODO DE DATSENKO Y WANNER

En el desarrollo del presente trabajo, se implementó con gran éxito la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000), para la generación mutaciones en genes bacterianos. Una ventaja de esta metodología es que se ha ideado tratando de evitar los efectos polares. Esto es, mediante el diseño apropiado de los oligonucleótidos, el casete de resistencia se inserta en el gen de interés, respetando las secuencias nativas de terminación de transcripción y de regulación del gen corriente abajo. Además, el marco de lectura abierta del casete queda en fase con los últimos codones del gen de interés, promoviendo el funcionamiento de las señales nativas de terminación de la traducción. Alternativamente, en el caso de un operón, en donde la transcripción del gen eliminado causa la transcripción del gen corriente abajo, el casete de resistencia tiene su propio promotor que puede suplir la función del promotor nativo.

Dentro de las ventajas que ofrece este método al utilizar el sistema λ Red, además de disminuir en gran medida la generación de mutaciones polares, es que dicho sistema puede catalizar una recombinación eficiente con regiones muy cortas de secuencia homóloga que se desea eliminar (<50 bp), además de que no requiere de contrucciones de plásmidos intermediarios que contengan el segmento homólogo, sino que únicamente se necesita del buen diseño de los oligonucleótidos. Por otro lado, el sistema λ Red combina la función de tres elementos (λ Exo, λ Beta y λ Gam, dentro del mismo operón p_L del profago λ) para llevar a cabo una adecuada sustitución del gen que se desea eliminar, ya que por un lado inhibe la acción de las nucleasas endógenas que degradarían DNA lineal de doble cadena y al mismo tiempo promueve la actividad de recombinación de ese DNA lineal con las regiones homólogas dentro del cromosoma bacteriano circular (Court et al., 2002).

7.2 ÍNDICES COMPETITIVOS (ICs) *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LAS MUTANTES EN *ompS1* Y *ompS2*

El índice competitivo (IC) es una medición alternativa a la LD₅₀, que emplea infecciones mixtas para determinar los grados de atenuación de la virulencia causada por una mutación particular. En los ICs, se obtienen datos más sensibles acerca de la atenuación de la virulencia, ya que refleja el número de bacterias involucradas en la causa de la letalidad y no sólo el número de individuos sobrevivientes, lo cual sólo es el resultado del efecto acumulativo de todas las etapas involucradas en causar dicha letalidad. Además, al comparar los niveles de virulencia de una mutante con respecto a su silvestre isogénica dentro del mismo individuo, se disminuye la variación inherente que existe entre animal y animal. Por estas razones, se determinaron los ICs, obteniendo así una indicación más certera de la atenuación de la virulencia de nuestras mutantes, usando un menor número de animales (Beuzón y Holden, 2001; Segura et al., 2004).

Los resultados de ICs *in vivo* indican que los genes *ompS1* y *ompS2* juegan un papel importante en los estadios iniciales de la enfermedad, como lo demuestran los datos obtenidos por la ruta de infección oral (IO), además de que aparentemente no tienen un papel tan importante en las etapas tardías, ya que la virulencia de estas cepas no se vio tan severamente afectada durante la infección intraperitoneal (IIP). La doble mutante *ompS1 ompS2* (STMS23S15) tuvo un efecto aditivo con respecto a las mutantes simples, sugiriendo que cada mutación resulta en la pérdida de funciones independientes.

No fue posible reproducir este fenotipo de atenuación para ambos genes en ensayos de ICI e ICP *in vitro*; sin embargo, esto ha ocurrido previamente en otros estudios donde algunos genes de *S. enterica* serovar Typhimurium que habían sido identificados como genes con efecto de atenuación en IIP e infección intragástrica en el ratón, mostraron una invasión de células epiteliales y una sobrevivencia en macrófagos comparable a la cepa silvestre (Bowe et al., 1998). En estudios previos se ha reportado una variación de resultados dependiendo de

la serovariedad de *Salmonella* con que se trabaje y la especie animal susceptible que se emplee como modelo de estudio. Más aún, en la naturaleza, la severidad de las infecciones causadas por alguna serovariedad de *Salmonella* varía dependiendo de la especie animal susceptible. Los genes de virulencia identificados para una especie animal no necesariamente son los mismos que para otra, incluso dentro de la misma serovariedad de *S. enterica* (Morgan et al., 2004).

El empleo de los cultivos celulares como una herramienta de estudio en las interacciones de patógenos como *Salmonella enterica* con células de un solo tipo en un ambiente más controlado, limita las observaciones y las hipótesis acerca de los mecanismos moleculares que participan en el proceso, por lo que se requiere que sean validados eventualmente en el contexto del organismo hospedante en su totalidad y complejidad para establecer la relevancia de los datos obtenidos (Hurley y McCormick, 2003).

7.3 ENSAYOS DE EXCRECIÓN DE *Salmonella* EN HECES

Los ensayos de excreción bacteriana en heces sugieren que las mutantes en *ompS1* y en *ompS2*, así como la doble mutante *ompS1 ompS2*, no están afectadas en su capacidad de sobrevivencia a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI), como lo demuestra la recuperación de números similares de las mutantes con respecto a la cepa silvestre en las heces de los animales infectados excretadas al ambiente externo. Cabe mencionar que después de 48 horas ya no se recuperaron bacterias en las heces, lo que nos indica que *Salmonella* atravesó la barrera intestinal y posiblemente colonizó algún tejido para llevar a cabo su proceso de replicación bacteriana.

7.4 CONDICIONES DE ESTRÉS *IN VITRO* QUE ESTÁN PRESENTES EN EL TGI

Debido a que *S. enterica* serovar Typhimurium es considerada uno de los patógenos primarios de infecciones por contaminación de alimentos, su

prevalencia está relacionada con la capacidad de sobrevivir y proliferar bajo una amplia gama de condiciones ambientales muy contrastantes, que abarcan incluso aquellas encontradas durante la producción y el procesamiento de los alimentos y las que se encuentran presentes dentro del hospedante. Estas condiciones ambientales pueden tener efectos dramáticos tanto en la sobrevivencia como en la virulencia de patógenos.

Dentro de las condiciones de estrés más importantes que *Salmonella* enfrenta en el paso por el TGI está la exposición a los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), particularmente acetato, propionato y butirato. La producción de estos ácidos orgánicos, incluyendo también al ácido láctico, resulta de la fermentación por parte de las bacterias intestinales nativas de la microbiota normal. Estos ácidos pueden encontrarse en concentraciones tan altas como 190 mM, en ecosistemas gastrointestinales que tienen extensas poblaciones de bacterias anaeróbicas fermentativas (Rishi et al., 2005). En humanos, por ejemplo, las concentraciones de SCFAs son de 35 mmol/Kg en el intestino delgado y de 134 mmol/Kg en el intestino grueso (Kwon y Ricke, 1998).

La resistencia a las sales biliares es otro factor importante que tiene efecto sobre la colonización intestinal. Las sales biliares constituyen una sustancia parecida a un detergente cuyos componentes antimicrobianos primarios consisten de los detergentes colato y desoxicolato. Las sales biliares son secretadas en el lumen del intestino delgado y su función es la de solubilizar las grasas ingeridas en la dieta. Las concentraciones de colato y desoxicolato en el intestino delgado son hasta de 20 mM (Bina y Mekalanos, 2001).

Los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs), como la polimixina B, son importantes componentes de los mecanismos de muerte no oxidativos del sistema inmune innato que se encuentran en las secreciones de las mucosas, en la superficie de la piel y en los gránulos de los fagocitos profesionales. *Salmonella* tiene la capacidad de contender activamente con los CAMPs del hospedante,

mediante la modificación del LPS y de otros componentes de su membrana externa (Merighi et al., 2005).

Por otra parte, un importante mecanismo de adaptación a ambientes hostiles de *S. enterica* serovar Typhimurium es la respuesta a la tolerancia ácida. Esta adaptación ácida de *Salmonella* parece tener un papel importante en su sobrevivencia, habiendo una fuerte correlación entre la capacidad de la bacteria en montar una respuesta a la tolerancia ácida y su virulencia (Kwon y Ricke, 1998).

Los niveles similares en las tasas de crecimiento observados *in vitro* entre las diferentes mutantes y la silvestre en distintas condiciones de estrés probadas, como las que se mencionan en los párrafos anteriores, apoyan los datos obtenidos con los ensayos de excreción en heces, confirmando que la ausencia de las porinas OmpS1, OmpS2, o ambas, en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium no afecta la capacidad de sobrevivencia de la bacteria a lo largo del TGI, por lo que tomando juntos todos los resultados, se sugiere que la atenuación de la virulencia de las mutantes *ompS1*, *ompS2* y *ompS1 ompS2* sea debido posiblemente a un defecto en la interacción con las células intestinales para su invasión y posterior colonización a los órganos sistémicos, o bien, en la alteración de los mecanismos de defensa del hospedante, sobre todo a nivel de la inmunidad innata, localizados en los tejidos intestinales, como pudieran ser la lámina propia del epitelio intestinal, las Placas de Peyer o los ganglios linfáticos mesentéricos, como lo sugiere el resultado obtenido con los ICs en tejido sanguíneo en estadios tempranos después de la inoculación oral, ya que en este corto tiempo post-infección (2 días), no es posible recuperar en sangre mutantes de *Salmonella* en estos genes de porinas.

7.5 ÍNDICES COMPETITIVOS (ICs) DE LAS CEPAS MUTANTES EN *ompR* Y *envZ*

La mutante en *ompR* se comportó como se esperaba, ya que se ha demostrado en estudios previos mediante ensayos de LD₅₀s exclusivamente, que

es una cepa altamente atenuada (Dorman et al., 1989; Chatfield et al., 1991) y cabe mencionar que no existen reportes previos donde se hayan realizado ensayos de ICs para este regulador global. Nuestros resultados muestran una alta atenuación por ambas rutas de infección, oral e intraperitoneal (IO e IIP, respectivamente), lo que confirma el papel pleiotrópico que se le ha atribuido a OmpR (Dorman et al., 1989; Chatfield et al., 1991; Lindgren et al., 1996, Lee et al., 2000; Kim y Falkow, 2004).

Con respecto a la mutante en *envZ*, no existen reportes previos de estudios *in vivo*, en el modelo del ratón, donde se analice el efecto de la mutación única en este gen, por lo que los resultados que se obtuvieron con esta mutante son novedosos y muy interesantes, ya que se observó que, al igual que *ompR*, también está altamente atenuada por ambas rutas de infección (Tabla 3). Esto nos sugiere que EnvZ es la principal cinasa-fosforilasa para OmpR, y que la fosforilación por otros reguladores en un proceso de comunicación cruzada (“cross-talk”) o por acetil fosfato no es relevante *in vivo*, como Kim y Falkow (2004) lo establecieron en sus estudios sobre la regulación de los genes *ssrAB* de la SPI-2, sobre los cuales actúa OmpR para la eficiente expresión.

7.6 ÍNDICES COMPETITIVOS (ICs) DE LA CEPA MUTANTE EN *leuO*

En lo que respecta a LeuO, existen muy pocos reportes publicados acerca de este regulador poco conocido. Nuestros resultados indican que *leuO*, al igual que *ompS1* y *ompS2*, también juega un papel importante en las etapas tempranas de la infección por *Salmonella* y no así en los estadios tardíos de la misma, como lo demuestra el IC mucho menor por vía oral que por vía intraperitoneal. Sin embargo, cabe la posibilidad de que LeuO esté participando en la regulación de otros genes requeridos para los eventos de virulencia temprana durante la infección por *Salmonella* y no únicamente a través de su regulación positiva sobre alguna de las porinas analizadas en este trabajo. En este sentido, estudios colaterales en nuestro laboratorio han demostrado que LeuO está involucrado en la expresión de aproximadamente 10 a 12 proteínas tanto en la serovariedad

Typhi como en Typhimurium, lo que resulta en un panorama atractivo para investigar su papel en patogénesis, determinando si actúa de manera directa o indirectamente a través de los genes que regula (Hernández-Lucas et al., datos no publicados).

Con nuestros datos en este trabajo, no obstante, demostramos que LeuO participa como un factor de virulencia en la patogénesis de *Salmonella*, principalmente durante los estadios iniciales de la infección, resultados que concuerdan con reportes previos en los cuales se identificó a LeuO como un nuevo factor de virulencia en el modelo de *C. elegans*, al estudiar la interacción bacteria-hospedante en el proceso de gastroenteritis (Tenor et al., 2004) y como un gen importante en los primeros 7 días post-infección intraperitoneal en el escrutinio del genoma completo de *S. enterica* serovar Typhimurium basado en microarreglos para la búsqueda y descubrimiento de genes requeridos para el establecimiento y la persistencia de la bacteria en el bazo y en el hígado (Lawley et al., 2006).

7.7 MODELO PROPUESTO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS PORINAS OmpS1 Y OmpS2 DURANTE LA PATOGÉNESIS DE *S. enterica* SEROVAR Typhimurium EN EL RATÓN

Los resultados de este trabajo nos llevan a suponer una posible combinación de eventos, que podrían estarse llevando a cabo durante la infección con *Salmonella*, en donde las porinas OmpS1 y OmpS2 están teniendo una participación importante en la patogénesis de la bacteria; por lo que se propone el siguiente modelo posible de la participación de estas porinas durante la enfermedad en el ratón.

Salmonella enterica serovar Typhimurium, en su estado silvestre cuenta con los elementos necesarios para llevar a cabo su ciclo biológico dentro del hospedante al que infecta con el fin de sobrevivir y perpetuarse, a costa de la salud de su hospedante. En condiciones normales de la infección, la bacteria tiene que contender con ambientes y situaciones muy hostiles que se presentan dentro del organismo al que penetra, cuando éste detecta que ha sido invadido por un parásito. En todo este proceso, resulta fácil imaginar que *Salmonella* debe contar en primera instancia con una cubierta efectiva en su superficie que le permita establecer el primer contacto con todos los factores externos. En este sentido, las porinas de *Salmonella* son uno de los componentes más abundantes y diversos en esa envoltura celular bacteriana, cuya función biofísica como canales de difusión pasiva no ofrece una explicación satisfactoria, para comprender que exista un amplio repertorio de éstas en la envoltura de la célula bacteriana.

Retomando estas consideraciones, así como el conocimiento que se tiene de las porinas y de la biología de *Salmonella* dentro de su hospedante, es posible tratar de explicar su participación en varios sentidos: 1) en relación a su papel de canal para el paso de posibles solutos como metales, fuentes de carbono u otros elementos, 2) en relación a su posible papel como molécula de señalización requerida para el establecimiento de una comunicación en conjunto con otras bacterias para una adecuada colonización de su hospedante, 3) en relación a su posible papel como molécula de anclaje hacia células del hospedante o bien,

hacia otras células bacterianas, 4) en relación a su papel como posible estructura con un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) para el establecimiento y activación de una respuesta inmune efectiva.

Con respecto a su papel de canal para el paso de posibles solutos, hay reportes en los que se piensa que la diversidad de los nutrientes disponibles marcan el establecimiento de un ecosistema balanceado dentro del tracto gastrointestinal (TGI) y que tal nicho de nutrientes definidos es ocupado por una población bacteriana particular (Chang et al., 2004). Una posible participación de OmpS1 y OmpS2 en este aspecto es que, a través de estas porinas *Salmonella* adquiere los nutrientes necesarios para infectar a su hospedante e iniciar el proceso de enfermedad y, al estar ausentes, la bacteria no puede contender plenamente con la situación adversa con el repertorio de porinas restantes y por tanto, es incapaz de progresar a la invasión sistémica, limitándose simplemente a la colonización e invasión de las células del intestino. Una posible exploración al respecto, sería investigar las fuentes de carbono preferenciales de *Salmonella* y evaluar si las mutantes se ven afectadas en su crecimiento; sin embargo, es necesario hacer los ensayos *in vivo*, tratando de determinar el mantenimiento y persistencia de *Salmonella* a lo largo del TGI evaluando si cuenta con la estrategia del “switch” hacia un cometabolismo de nutrientes limitantes.

Muy relacionado con el aspecto metabólico, en donde las porinas pueden tener un papel importante, se encuentra también la posible participación de éstas como molécula de señalización requerida para el establecimiento de una comunicación en conjunto con otras bacterias para una adecuada colonización de su hospedante, contando con la evidencia de que *ompS1* ha sido identificado como gen importante en el movimiento tipo “swarming” y en la formación de “biofilms” (Toguchi et al., 2000; Wang et al., 2004).

El movimiento tipo “swarming” se puede definir como una conducta colectiva de un grupo de células bacterianas asociada con la migración sobre superficies semi-sólidas. En este sentido, se cuenta con estudios donde se reporta el papel biológico del movimiento tipo “swarming” en diferentes bacterias, como es

el caso del uropatógeno *Proteus mirabilis*, que lo utiliza para ascender por el tracto urinario de su hospedante para colonizar el riñón (Fraser y Hughes, 1999). Por otra parte, también se ha demostrado que las bacterias del serovar Typhimurium de *S. enterica*, con capacidad de realizar esta conducta colectiva de “swarming”, presentan una resistencia elevada a un amplio espectro de antibióticos, en comparación con el estado planctónico o vegetativo (Kim et al., 2003).

Asimismo, Kim y Surette, empleando las técnicas de proteómica para la identificación de proteínas reguladas diferencialmente entre poblaciones de *S. enterica* serovar Typhimurium con movimiento tipo “swarming” y con movimiento convencional de estado planctónico, reportaron que la diferenciación de células con migración tipo “swarming” puede ser una respuesta adaptativa estimulada por las condiciones dentro del hospedante, las cuales pueden ayudar en la proliferación y persistencia de *Salmonella* dentro del ambiente competitivo del tracto gastrointestinal (Kim y Surette, 2004). En este estudio, se identificaron algunas porinas que se regularon negativamente en estado de “swarming”, tales como OmpD (NmpC), OmpW y OmpA, haciendo posiblemente a la membrana externa menos permeable al paso de varios solutos como arabinosa, glucosa, disacáridos, aminoácidos y dipéptidos; sugiriendo que la diferenciación hacia un estado de “swarming” está acoplada a una reducida permeabilidad de la membrana externa, a una aumentada biosíntesis de sustancias *de novo* y a un cambio en la utilización de glucosa (Kim y Surette, 2004).

Con base en estos estudios, es posible suponer que las mutantes en OmpS1 y OmpS2, con claras alteraciones en su envoltura celular, desprovee a la bacteria de esta estrategia metabólica y de sobrevivencia dentro del organismo, colocándola en desventaja ecológica en el nicho del TGI, impidiendo así la progresión del proceso infeccioso.

En cuanto a su posible papel como moléculas de anclaje, las porinas OmpS1 y OmpS2, podrían estar involucradas en una interacción ligando-receptor con las células con las que establece un primer contacto. En este sentido, a la fecha no se ha reportado ningún receptor para la serovariedad Typhimurium de *S.*

enterica; sin embargo, existen reportes en los que el regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR por “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”) presente en la superficie celular del epitelio intestinal es usado por *S. enterica* serovar Typhi como un receptor sobre estas células mediando la translocación de la bacteria hacia la submucosa intestinal (Pier et al., 1998).

Con base en estas consideraciones, no es difícil suponer que en nuestro modelo murino de infección con las mutantes en *ompS1* y *ompS2*, se haya establecido una alteración en un posible receptor de este tipo, el cual tiene un papel fisiológico perfectamente bien caracterizado, como un regulador de la secreción celular epitelial de iones de potasio, cloro y sodio. La proteína CFTR es capaz de movilizarse a la membrana plasmática de la célula epitelial en respuesta a los productos de algunos microorganismos que están presentes normalmente en la microbiota intestinal. Esta movilización del CFTR aumenta la invasión y la translocación del serovar Typhi de *S. enterica*; sugiriendo que la combinación de los microorganismos comensales presentes en el intestino delgado puede influir en la susceptibilidad del epitelio intestinal a la invasión por el serovar Typhi (Lyczak, 2003). En este sentido, si algo similar estuviera pasando con nuestras mutantes, podría ésta ser la explicación de que a pesar de lograr un primer establecimiento, no se logra una eficiente invasión al epitelio intestinal y se interrumpe el proceso de establecimiento de la enfermedad sistémica.

Aunado a todo lo anterior y considerando que el resultado de la enfermedad depende de varios factores, entre los que se incluyen los determinantes genéticos de virulencia de la bacteria, la respuesta inmune inata, la capacidad del hospedante para montar una respuesta inmune adquirida adecuada y finalmente de la capacidad para eliminar al patógeno, estamos ante un panorama muy complejo de posibilidades al pensar en una explicación a nivel de la respuesta inmune; donde es evidente que en nuestras mutantes evaluadas la alteración del establecimiento de la enfermedad sistémica está en los estadios iniciales de la misma, por lo que resulta más razonable pensar en involucrar al

sistema inmune innato como responsable del control de la enfermedad causada por estas cepas. En este sentido, podría ser interesante averiguar si las mutantes en *ompS1* y *ompS2* de *S. enterica* serovar Typhimurium están confinadas en el interior de los neutrófilos o de las células dendríticas, que son dos tipos celulares que participan en la respuesta inmune innata ante la invasión de un patógeno como *Salmonella*.

Finalmente, cabe mencionar que en estudios preliminares de microscopía electrónica de barrido realizados a las cepas mutantes en estos genes de porinas minoritarias *OmpS1* y *OmpS2*, también se tiene evidencia de que tanto las mutantes sencillas como la doble mutante muestran una morfología alterada, con respecto a la isogénica silvestre. Para las mutantes sencillas, la morfología es más alargada comparada con la silvestre, y para la doble mutante su morfología toma una apariencia similar a pegamento o chicle, que podría estar indicando una modificación importante en la composición y distribución de los elementos de su membrana externa (Hernández-Lucas et al, datos no publicados). Esto abre la posibilidad de un efecto estructural sobre la bacteria, que se refleje en su capacidad para ser virulenta; área que requiere de mucho trabajo aún para su elucidación.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las cepas mutantes en los genes de porinas OmpS1 y OmpS2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium están altamente atenuadas en el ratón
2. La capacidad de competir por la colonización del hígado y del bazo de las mutantes en *ompS1* y *ompS2* con la cepa silvestre de *S. enterica* serovar Typhimurium está severamente afectada después de la IO, pero no tanto cuando la administración es vía IP
3. La doble mutante *ompS1 ompS2* tiene un efecto aditivo, con respecto a las mutantes simples, sugiriendo que cada mutación resulta en la pérdida de funciones independientes
4. La atenuación de *ompS1* y *ompS2* que se observó en el hospedante no es evidente en ensayos *in vitro*, donde se evaluó su capacidad de invasión a células epiteliales o de proliferación y sobrevivencia en macrófagos
5. OmpS1 y OmpS2 juegan un papel importante en la patogénesis de *S. enterica* serovar Typhimurium durante las etapas iniciales de la enfermedad y su ausencia en la bacteria no la hace particularmente susceptible a alguna condición de estrés en el TGI probada en este estudio
6. Se confirmó el papel pleiotrópico de OmpR en la virulencia de *S. enterica* serovar Typhimurium, ya que la mutante en este regulador mostró una reducida capacidad de competir por la colonización del hígado y del bazo con la cepa silvestre, por ambas rutas de infección (IO e IIP)
7. La proteína detectora EnvZ es la principal cinasa-fosforilasa para OmpR *in vivo*; ya que la mutante en esta proteína mostró también una reducida capacidad de competir por la colonización del hígado y del bazo con la cepa silvestre, por ambas vías de infección (IO e IIP)

8. LeuO juega un papel importante en la patogénesis de *S. enterica* serovar Typhimurium, principalmente en las etapas iniciales de la infección, ya que la mutante en el gen de este regulador se vio severamente afectada en su capacidad de competir por la colonización del hígado y del bazo con la cepa silvestre después de una IO, pero no tanto cuando la administración es vía IP

IX. PERSPECTIVAS

Nuestros estudios futuros se están enfocando en entender de qué manera las porinas OmpS1 y OmpS2 intervienen como factores de virulencia y cómo podrían tener una aplicación práctica en el área médica y de la salud (Fig. 8).

Por lo tanto, es necesario identificar las características de sobrevivencia y eliminación de las mutantes en *ompS1* y *ompS2* dentro del hospedante, a diferentes etapas de la infección; identificar los sitios y las señales ambientales que determinan la expresión de *ompS1* y *ompS2* dentro del hospedante.

Asimismo, resulta interesante saber si OmpS1 y OmpS2 participan en procesos de “swarming” y de formación de “biofilms” en estadios tempranos de infección sobre células epiteliales intestinales.

Es también de gran interés explorar otras condiciones *in vitro* que mimeticen las que se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal (TGI), que nos permitan entender el mecanismo exacto por el cual las mutantes en estos genes de porinas no son capaces de causar la enfermedad sistémica como lo hace una cepa silvestre. Lo que sí es aparente, por el hecho de que las mutantes se excretan en heces a la misma tasa que la cepa silvestre, es que no son particularmente susceptibles a alguna condición de estrés en el TGI, probada en este estudio.

En este mismo sentido, nos interesa conocer todos estos aspectos para el regulador LeuO, así como caracterizar su regulón, esto es, el conjunto de genes que modula y el papel de cada uno en la virulencia.

Otros estudios de nuestro grupo, con nuestros colaboradores inmunólogos, los Drs. Armando Isibasi y Constantino López-Macías, implican explorar el potencial de OmpS1 y OmpS2 como antígenos destinados hacia el inmunodiagnóstico rápido de la fiebre tifoidea en humanos y hacia la elaboración de una vacuna de nueva generación.

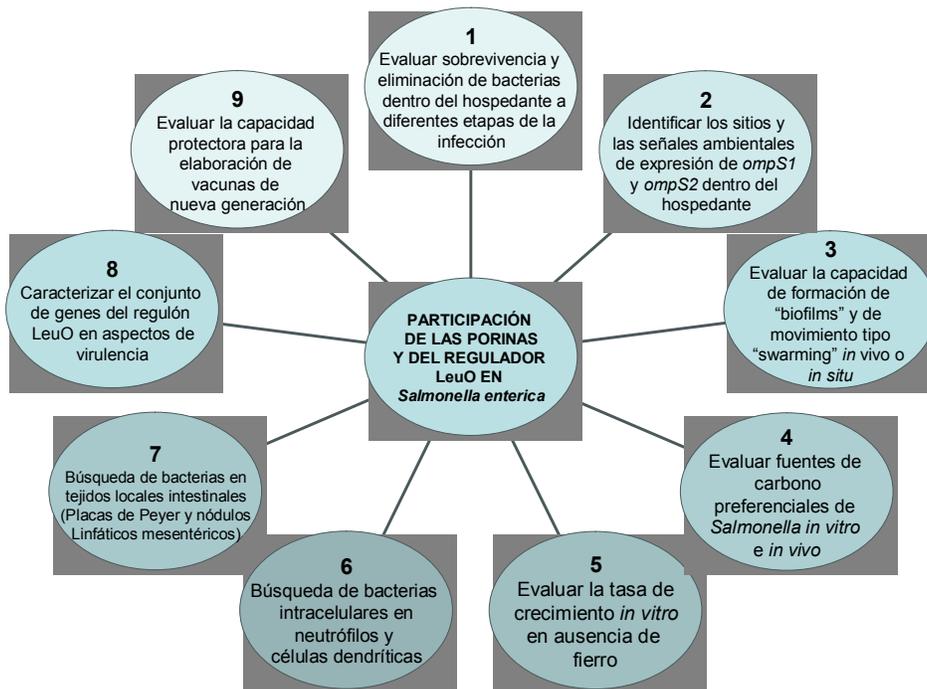


Fig. 8. Esquema de perspectivas para entender la participación de las porinas y del regulador LeuO como factores de virulencia de *Salmonella enterica* y su aplicación práctica en el área médica y de la salud. Los aspectos 1 y 2 involucran la realización de ICs en diferentes órganos y a diferentes tiempos de infección, así como la implementación de una metodología para la evaluación de la expresión génica *in vivo*. El aspecto 3 ayudará a definir la participación de las porinas como moléculas de señalización y comunicación intercelular. Los aspectos 4 y 5 podrían explicar su participación como canal para el paso de nutrientes o metales para el establecimiento y progresión de la infección. Los aspectos 6 y 7 proporcionarán datos que conduzcan a una posible explicación del control de la infección a nivel de la respuesta inmune innata. El aspecto 8 abarca estudios de proteómica, atenuación y expresión génica *in vivo* con la proteína LeuO y los genes que regula. El aspecto 9 busca la aplicación del conocimiento básico en la elaboración de métodos de inmunodiagnóstico rápido de la FT en humanos y la elaboración de vacunas de nueva generación.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbas, A. K y A. H. Lichtman.** 2004. En *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier USA. pp. 275-297.
2. **Aderem, A. y R. J. Ulevitch.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**:782-787.
3. **Bernardini, M. L., A. Fontaine y P. J. Sansonetti.** 1990. The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**: 6274-6281.
4. **Bernardini, M. L., M. G. Sanna, A. Fontaine y P. J. Sansonetti.** 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **62**:3625-3635.
5. **Beuzón, C. R. y D. W. Holden.** 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microb. and Infect.* **3**: 1345-1352.
6. **Bina, J. E. y J. J. Mekalanos.** 2001. *Vibrio cholerae tolC* is required for bile resistance and colonization. *Infect. Immun.* **69**:4681-4685.
7. **Bowe, F., C. J. Lipps, R. M. Tsolis, E. Groisman, F. Heffron y J. G. Kusters.** 1998. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect. Immun.* **66**: 3372-3377.
8. **Calderón, I., S. R. Lobos, H. A. Rojas, C. Palomino, L. H. Rodríguez y G. C. Mora.** 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* **57**:2136-2140.
9. **Calva, E. y J. J. Calva.** 1998. Country report: Typhoid fever and other Salmonellosis in Mexico. *Medical Journal of Indonesia* **7(S1)**:17-19.
10. **Chan, K., C. C. Kim y S Falkow.** 2005. Microarray-based detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect. Immun.* **73**:5438-5449.
11. **Chatfield, S. N., C. J. Dorman, C. Hayward y G. Dougan.** 1991. Role of ompR-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* **59**:449-452.
12. **Cookson, B. T. y M. J. Bevan.** 1997. Identification of a natural T-cell epitope presented by *Salmonella*-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice. *J. Immunol.* **158**: 4310-4319.
13. **Court, D. L., J. A. Sawitzke y L. C. Thomason.** 2002. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Genet.* **36**:361-388.
14. **Datsenko, K. A. y B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640-6645.
15. **Díaz-Quiñonez, A., N. Martin-Orozco, A. Isibasi y V. Ortiz-Navarrete.** 2004. Two *Salmonella* OmpC K^b-restricted epitopes for CD8⁺-T-Cell recognition. *Infect. Immun.* **72**:3059-3062.

16. **Dorman, C. J., S. Chatfield, C. F. Higgins, C. Hayward y G. Dougan.** 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* **57**:2136-2140.
17. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff y J. Fierer.** 1993. Epithelial cells secrete the chemokine Interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* **61**:4569-4574.
18. **Fernández-Mora, M., J. L. Puente y E. Calva.** 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J. Bacteriol.* **186**:2909-2920.
19. **Fierer, J.** 2001. Polymorphonuclear leukocytes and innate immunity to *Salmonella* infections in mice. *Microbes Infect.* **3**:1233-1237.
20. **Flores-Valdez, M., J. L. Puente y E. Calva.** 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* **185**: 6497-6506.
21. **Francis, C. L., M. N. Starnbach y S. Falkow.** 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. 1992. *Mol. Microb.* **6**:3077-3087.
22. **Fraser, G. M. y C. Hughes.** 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:630-635.
23. **Galán, J. E. y R. Curtiss III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6383-6387.
24. **Galdiero, M., M. D'Isanto, M. Vitiello, E. Finamore, L. Peluso y M. Galdiero.** 2001. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induce TNF- α , IL-6 and IL-8 release by CD14-independent and CD11a/CD18-dependent mechanisms. *Microbiol.* **147**:2697-2704.
25. **Galdiero, M., M. D'Isanto, M. Vitiello, E. Finamore, L. Peluso y M. Galdiero.** 2003. Monocytic activation of protein tyrosine kinase, protein kinase A and protein kinase C induced by porins isolated from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Infect.* **46**:111-119.
26. **Galdiero, M., M. Galdiero, E. Finamore, F. Rossano, M. Gambuzza, M. R. Catania, G. Teti, A. Midiri y G. Mancuso.** 2004. *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect. Immun.* **72**:1204-1209.
27. **Garmendia J., C. R. Beuzón, J. Ruiz-Albert y D. W. Holden.** 2003. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiol.* **149**:2385-2396.
28. **González, C. R., A. Isibasi, V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, J. A. García, F. Blanco y J. Kumate.** 1993. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* **37**:793-799.
29. **Govoni, G. y P. Gros.** 1998. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflam. Res.* **47**:277-284.

30. **Gupta, S., D. Kumar, H. Vohra y N. K. Ganguly.** 1999. Involvement of signal transduction pathways in *Salmonella typhimurium* porin activated gut macrophages. *Mol. Cell Biochem.* **194**:235-243.
31. **Hopkins, S. A. y J. P. Kraehenbuhl.** 1997. Dendritic cells of the murine Peyer's patches colocalize with *Salmonella typhimurium* avirulent mutants in the subepithelial dome. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**:105-109.
32. **House, D., A. Bishop, C. M. Parry, G. Dougan y J. Wain.** 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**: 573-578.
33. **Hurley, B. P. y B. A. McCormick.** 2003. Translating tissue culture results into animal models: the case of *Salmonella typhimurium*. *Trends in Microbiol.* **11**:562-569.
34. **Isibasi, A., V. Ortíz, M. Vargas, J. Paniagua, C. González, J. Moreno y J. Kumate.** 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice alter immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. *Infect. Immun.* **56**:2953-2959.
35. **Isibasi, A., V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, R. Pelayo, C. R. González, J. A. García y J. Kumate.** 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* **10**:811-813.
36. **Jones, B. y S. Falkow.** 1996. SALMONELLOSIS: Host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:533-561.
37. **Kelsall, B. L. y W. Strober.** 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.* **183**:237-247.
38. **Kim, C. C. y S. Falkow.** 2004. Delineation of upstream signaling events in the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 transcriptional activation pathway. *J. Bacteriol.* **186**:4694-4704.
39. **Kim, W., T. Killam, V. Sood y M. G. Surette.** 2003. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J. Bacteriol.* **185**:3111-3117.
40. **Kim, W. y M. G. Surette.** 2004. Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **54**:702-714.
41. **Kingsley, R. A., A. D. Humphries, E. H. Weening, M. R. de Zoete, S. Winter, A. Papaconstantinopoulou, G. Dougan y A. J. Bäumler.** 2003. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect. Immun.* **71**:629-640.
42. **Kirby, A. C., U. Yrlid y M. J. Wick.** 2002. The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J. Immunol.* **169**:4450-4459.
43. **Kusters, J. G., G. A. W. M. Mulders-Kremers, C. E. M. van Doornik y B. A. M. van der Zeijst.** 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **61**:5013-5020.

44. **Kuusi, N., M. Nurminen, H. Saxen y P. H. Mäkela.** 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparation in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **34**:328-332.
45. **Kwon, Y. M. y S. C. Ricke.** 1998. Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3458-3463.
46. **Lawley, T. D., K. Chan, L. J. Thompson, C. C Kim, G. R. Govoni y D. M. Monack.** 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog.* **2**:87-100.
47. **Lee, A. K., C. S. Detweiler y S. Falkow.** 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *J. Bacteriol.* **182**:771-781.
48. **Lindgren, S. W., I. Stojilkovic y F. Heffron.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:4197-4201.
49. **Linehan, S. A. y D. W. Holden.** 2003. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host-what can it teach us about innate immunity? *Immun. Lett.* **85**:183-192.
50. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
51. **Lundin, B. S., C. Johansson y A.-M. Svennerholm.** 2002. Oral immunization with a *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine induces specific circulating mucosa-homing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in humans. *Infect. Immun.* **70**:5622-5627.
52. **Lyczak, J. B.** 2003. Commensal bacteria increase invasion of intestinal epithelium by *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect. Immun.* **71**:6610-6614.
53. **Martin, S. J. y D. Green.** 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**:349-352.
54. **Mastroeni P., C. Simmons, R. Fowler, C. E. Hormaeche y G. Dougan.** 2000. *Igh-6^{-/-}* (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect. Immun.* **68**:46-53.
55. **McCormick, B. A., C. A. Parkos, S. P. Colgan, D. K. Carnes y J. L. Madara.** 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* **160**:455-466.
56. **Merighi, M., C. D. Ellermeier, J. M. Slauch y J. S. Gunn.** 2005. Resolvase-In Vivo Expression Technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *J. Bacteriol.* **187**:7407-7416.
57. **Mittrücker, H. y S. H. E. Kaufmann.** 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**:457-463.

58. **Mittrücker, H., B. Raupach, A. Köhler y S. H. E. Kaufmann.** 2000. Cutting edge: Role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immun.* **164**:1648-1652.
59. **Morgan E., J. D. Campbell, S. C. Rowe, J. Bispham, M. P. Stevens, A. J. Bowen, P. A. Barrow, D. J. Maskell y T. S. Wallis.** 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **54**:994-1010.
60. **Muthukumar, S. y V. R. Muthukkaruppan.** 1993. Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect. Immun.* **62**:3984-3993.
61. **Negm, R. S. y T. G. Pistole.** 1999. The porin OmpC of *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages. *Can. J. Microbiol.* **45**:658-668.
62. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 593-656.
63. **Oropeza, R., C. L. Sampieri, J. L. Puente y E. Calva.** 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* **32**:243-252.
64. **Pier, G. B., M. Grout, T. Zaidi, G. Meluleni, S. S. Mueschenborn, G. Banting, R. Ratcliff, M. J. Evans y W. H. Colledge.** 1998. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**:79-82.
65. **Prilipov, A., P. S. Phale, R. Koebnik, C. Widmer y J. P. Rosenbusch.** 1998. Identification and characterization of two quiescent porin genes, *nmpC* and *ompN*, in *Escherichia coli* B^F. *J. Bacteriol.* **180**:3388-3392.
66. **Puente, J. L., A. Verdugo-Rodríguez y E. Calva.** 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* **5**:1205-1210.
67. **Ramos de Andrade, D. y D. Jr. Ramos de Andrade.** 2003. Typhoid fever as cellular microbiological model. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **45**:185-191.
68. **Reed, L. J. y H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
69. **Rishi, P., S. Pathak y S. C. Ricke.** 2005. Short chain fatty acids influence virulence properties of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Env. Sci. and Health Part B* **40**:645-657.
70. **Salazar-González, R. M., C. Maldonado-Bernal, N. E. Ramírez-Cruz, N. Ríos-Sarabia, J. Beltrán-Nava, J. Castañón-González, N. Castillo-Torres, J. A. Palma-Aguirre, M. Carrera-Camargo, C. López-Macías y A. Isibasi.** 2004. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar *typhi* bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immun. Lett.* **93**:115-122.
71. **Salerno-Goncalves, R., M. F. Pasetti y M. B. Sztein.** 2002. Characterization of CD8(+) effector T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J. immunol.* **169**:2196-2203.

72. **Santiviago, C. A., C. S. Toro, A. A. Hidalgo, P. Youderian y G. C. Mora.** 2003. Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium major porin, OmpD. *J. of Bacteriol.* **185**:5901-5905.
73. **Scherer, C. A. y S. I. Miller.** 2004. En *Principles of Bacterial Pathogenesis*, Academic Press, New York, pp. 265-333.
74. **Schulz, G. E.** 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1566**:308-317.
75. **Secundino, I., C. López-Macías, L. Cervantes-Barragán, C. Gil-Cruz, N. Ríos-Sarabia, R. Pastelín-Palacios, M. A. Villasis-Keever, I. Becker, J. L. Puente, E. Calva y A. Isibasi.** 2006. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* **117**:59-70
76. **Segura, I., J. Casadesús y F. Ramos-Morales.** 2004. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J. Microbiol. Methods* **56**:83-91.
77. **Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli y B. B. Finlay.** 1993. Methods to study bacterial invasion. *J. Microbiol. Methods* **18**:227-240.
78. **Tenor, J. L., B. A. McCormick, F. M. Ausubel y A. Aballay.** 2004. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr. Biol.* **14**:1018-1024.
79. **Toguchi, A., M. Siano, M. Burkait y R. M. Harshey.** 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **182**:6308-6321.
80. **Verdugo-Rodríguez, A., Y. López-Vidal, J. L. Puente, G. M. Ruíz-Palacios y E. Calva.** 1993. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:248-254.
81. **Wang, Q., J. G. Frye, M. McClelland y R. M. Harsher.** 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol. Microbiol.* **52**:169-187.
82. **Wick, M. J.** 2002. The role of dendritic cells during *Salmonella* infection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:437-443.
83. **Zhang, S., R. A. Kingsley, R. L. Santos, H. Adrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R. M. Tsolis, L. G. Adams y A. J. Bäumler.** 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* **71**:1-12.

XI. APÉNDICE DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medio de cultivo LB (Luria-Bertani)

Se disolvieron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 950 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH (1M), se aforó a 1 litro y se esterilizó por autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min.

Medio nutritivo de baja osmolaridad MN

Se disolvieron 7 g de bacto caldo nutritivo, 1 g de extracto de levadura, 3.7 g de K₂HPO₄ (dibásico) y 1.3 g de KH₂PO₄ (monobásico) en 950 ml de agua desionizada, una vez disuelto se agregaron 2 ml de glicerol, se aforó a 1 litro, se filtró y se esterilizó por autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min.

Medio nutritivo con 0.3 M de NaCl de alta osmolaridad MNN

Se preparó medio MN al que se le adicionó NaCl al 0.3 M antes de aforar, filtrar y esterilizar.

Medio de cultivo celular modificado de Dulbecco (DMEM por “Dulbecco’s modified Eagle Media”)

El DMEM (Gibco) se preparó como lo indica el fabricante y se suplementó con 20% de Suero Fetal Bovino (Gibco) previamente descomplementado a 56°C por 20 minutos, 2mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO), 1mM de piruvato de sodio (Sigma, St Louis, MO) y 1.5 g/l de bicarbonato de sodio (Gibco).

Medio de cultivo celular RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)

El RPMI (Gibco) se preparó como lo indica el fabricante y se suplementó con 20% de SFB descomplementado a 56°C por 20 minutos, 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) y 1.5 g/l de bicarbonato de sodio (Gibco).

Solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) 1X

Se disolvieron 8 g de NaCl, 0.61 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de KH₂PO₄ y 0.2 g de KCl en 950 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH (1M), se aforó a 1 litro y se esterilizó por autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min.

Salmonella enterica Serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* Mutants Are Attenuated for Virulence in Mice

Olivia Rodríguez-Morales, Marcos Fernández-Mora, Ismael Hernández-Lucas, Alejandra Vázquez, José Luis Puente, and Edmundo Calva*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 18 May 2005/Returned for modification 1 July 2005/Accepted 26 October 2005

***Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants with mutations in the *ompS1* and *ompS2* genes, which code for quiescent porins, were nevertheless highly attenuated for virulence in a mouse model, indicating a role in pathogenesis. Similarly, a strain with a mutation in the gene coding for LeuO, a positive regulator of *ompS2*, was also attenuated.**

Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenesis is a complex multifactorial process that results from the activities of many bacterial gene products. It has been estimated that at least 4% of its genome is involved in virulence, and both in vitro and in vivo models have been used to better understand the infectious process (5, 17).

The *ompC* and *ompF* genes encode the two major porins of *Escherichia coli* and *S. enterica*. In *S. enterica* serovars Typhi and Typhimurium, the *ompS1* and *ompS2* genes code for two other porins that are expressed at very low levels, relative to the major porins OmpC and OmpF, under standard laboratory conditions. As for OmpC and OmpF, OmpS1 and OmpS2 are regulated by the EnvZ/OmpR two-component signal transduction system. In addition, *ompS1* is negatively regulated by the HN-S nucleoid protein, and *ompS2* is positively regulated by the LeuO regulator (10, 11, 26, 27).

Porins have been shown to trigger multiple synergistic signal transduction pathways in *Salmonella* infections, as they induce cellular activation, cytokine release, and the activation of protein tyrosine kinase, protein kinase A, and protein kinase C (14, 16). A role for the *S. enterica* serovar Typhimurium OmpC protein in initial recognition by macrophages and the distinction of regions of this protein that potentially participate in host cell recognition of bacteria by phagocytic cells have been documented (25). In addition, OmpS1 appears to have a role in the *Salmonella* life cycle, since mutations causing defects in swarming motility and biofilm formation have been found to map in *S. enterica* serovar Typhimurium *ompS1* (32, 34). Moreover, vaccination of mice with *S. enterica* serovar Typhi and Typhimurium porins confers protective immunity against live bacteria (18, 21, 24), and specific humoral and cellular immune responses are mounted against *S. enterica* serovar Typhi outer membrane proteins in typhoid fever patients, which has allowed the design of novel diagnostic assays (1, 6, 33).

It has been reported that porins play a role in virulence. For *Shigella flexneri*, both $\Delta ompB$ ($\Delta ompR envZ$) and $\Delta ompC$ mu-

nants were affected in two key steps for pathogenesis, i.e., in spreading from one epithelial cell to another and in host cell killing (2, 3). For *S. enterica* serovar Typhimurium, mutants lacking the *ompR* gene and a double *ompF ompC* mutant showed increased oral 50% lethal doses (LD₅₀), by >1,600- and 300-fold, respectively, relative to the wild type. Interestingly, a single *ompF* or single *ompC* mutant did not show attenuation (7, 9). Furthermore, *ompR* mutants were not cytotoxic to macrophages (23). Moreover, the EnvZ/OmpR two-component system has been shown to regulate *Salmonella* pathogenicity island 2 (15, 19, 22).

To define the role of the *ompS1* and *ompS2* genes in serovar Typhimurium regarding virulence, we constructed mutants (Table 1) of *Salmonella* in which the *ompS1* and *ompS2* genes were deleted by a one-step nonpolar gene inactivation procedure and replaced with selectable antibiotic resistance gene markers (8). The same procedure was used to obtain deletions of *ompR*, *envZ*, and *leuO* (Table 1). The antibiotic resistance gene was generated by PCR by using primers with 42-nucleotide homology extensions, and different primer sets were used to verify the presence of the antibiotic resistance gene cassette for kanamycin or chloramphenicol (Km^r and Cm^r, respectively) and of junctional sequences in the mutant, as described previously (8) (Table 2). The *ompS2* mutant was further characterized by the lack of induction of the OmpS2 porin in the presence of the cloned LeuO positive regulator (Fig. 1, lane 2). In contrast, the expression of LeuO from a cloned plasmid rendered OmpS2 expression in the wild-type control, as previously observed for *S. enterica* serovar Typhi (Fig. 1, lane 1) (10). The *ompS1* mutant was not verified in this manner, as there is no known positive regulator that causes its overexpression (11). Furthermore, both the *ompR* and *envZ* mutants lacked the presence of the OmpC and OmpF porins, which were restored upon complementation solely with the corresponding *ompR* and *envZ* cloned genes, respectively (Fig. 1, lanes 4 to 7). This observation particularly illustrated the nonpolar effects generated by the technique of Datsenko and Wanner (8), as the *ompR* and *envZ* genes are in close proximity, forming the *ompB* operon.

There were no observable differences between the wild-type strain and the isogenic *ompS1* and *ompS2* mutants of *S. en-*

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone: (52) (777) 329-1645. Fax: (52) (777) 313-8673. E-mail: ecalva@ibt.unam.mx.

TABLE 1. *S. enterica* serovar Typhimurium strains and plasmids used for this study

Strain or plasmid	Genotype and/or relevant marker(s)	Reference or source
Strains		
ATCC 14028	Wild type (Sp ^r)	American Type Culture Collection
STMS14	ATCC 14028 $\Delta ompS1::Km$	This study
STMS23	ATCC 14028 $\Delta ompS2::Km$	This study
STMR	ATCC 14028 $\Delta ompR::Km$	This study
STMZ	ATCC 14028 $\Delta envZ::Cm$	This study
STMLEUO1	ATCC 14028 $\Delta leuO::Km$	This study
STMS23S15	STMS23 $\Delta ompS1::Cm$	This study
STMD	ATCC 14028 $\Delta ompD::Km$	This study
STMA1	ATCC 14028 $\Delta invA::Cm$	This study
Plasmids		
pKD46	<i>oriR101ts</i> , λ Red recombinase system under <i>paraB</i> promoter control; Amp ^r	8
pKD4	pANTS γ derivative containing an FRT-flanked Km ^r gene from pCP15	8
pKD3	pANTS γ derivative containing an FRT-flanked Cm ^r gene from pSC140	8
pFMtrc12	P15A1 <i>lacI trcp</i> Ap ^r	10
pFMtrcleuO	Vector pFMtrc12-derived plasmid carrying the <i>leuO</i> gene	10
pFM2001	Vector pACYC184-derived plasmid carrying the <i>ompR</i> gene	This study
pROZ	Vector pMPMA6-derived plasmid carrying the <i>envZ</i> gene	This study

terica serovar Typhimurium in growth rates in LB or nutrient broth at a low or high osmolarity, in RPMI medium, or in Dulbecco's modified Eagle's medium (data not shown).

S. enterica serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants

were compared with the wild-type strain, 14028, in a mouse model of infection. For inoculation, bacteria were grown in LB with shaking to an optical density at 540 nm of 0.6. Groups of six innately *Salmonella*-susceptible 6- to 8-week-old female

TABLE 2. Oligonucleotide primers used for this study

Primer	Sequence (5'-3')
Primers for mutant construction^a	
ompS1-H1P1	ATAATGAACAGAAAAGTTCTGGCACTGCTTGTCCCGGCGTTATTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
ompS1-H2P2	TTAGAACTGGTAGACCAGACCAACACCTACGATATCATCGGTCATATGAATATCCTCCTTAG
ompS2-H1P1	GATAAAAAATGAAAAGAAAAGTATTGGCACTTGTGCATCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
ompS2-H2P2	GAATAATTAGAACTGGTAAACCATACCCAGCGCGACGATATCCATATGAATATCCTCCTTAG
envZ-H1P1	GCCCCGACGCTGTTGCTCATCGTCACCTTGTCTGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
envZ-H2P2	TCCCCTGGACGCGACAGCAAGGAACCGGTAGCCAGGCGCGCATATGAATATCCTCCTTAG
ompR-H1P1	GAGAATTATAAGATTCTGGTGGTTGATGACGATATGCGTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
ompR-H2P2	GACGTAGCCCAGGCCCATACGGTCTGAATATAACGCGGCATATGAATATCCTCCTTAG
leuO-H1P1	AAAACCGAAAAGCCGCATCTTTTAGATATGGGCAAACCACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
leuO-H2P2	TATCGCTTACAACAGAGACTAATAAATCTTCCATCCATATGAATATCCTCCTTAG
ompD-H1P1	TTGAGGAAACACGCTAAGAAAATATAAAGGATTATTAATAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
ompD-H2P2	CCCTGAAAGGACTGGCTTTGTATTACAGACTACAACAAAATTACATATGAATATCCTCCTTAG
invA-H1P1	CTATAGTGCTGCTTTCTACTTAACAGTGCTCGTTTACGACCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
invA-H2P2	CCTTATATTGTTTTATAACATTCACCTGACTTGCTATCTGCTACATATGAATATCCTCCTTAG
Primers for mutant verification^b	
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
k2	CGGTGCCCTGAATGAAGTGC
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC
c1	TTATACGCAAGGCGACAAGG
c2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG
ompS1-F	CATAATCAAAGCATCAAATAC
ompS1-R	CATCCATCATCTATAGTGGCA
ompS2-F	ACATAATAACAAATATATTACCATAAATA
ompS2-R	TCTGTGCCAGGGAAGTGTGCGTTCTGTT
envZ-F	ATGAGGCGAATGCGCTTCTC
envZ-R	GCGCCGACCGAAGCTGTAA
ompR-F	CATAACGTGATCGTCCCGACA
ompR-R	TAAGTGGTGGCCGTCCTCCAG
leuO-F	CATTATGAATCGCAATGGTGTGAC
leuO-R	TTACGCCTTGATCGATAAGCGATC
ompD-F	CAGTCCCTATTTGAATTAATAC
ompD-R	CATAGACATCCAGCATTTCGA
invA-F	GATATTGCCTACAAGCATGAAATGG
invA-R	AAATGTTGCATAGATCTTTTCCTTA

^a The nomenclature follows that used by Datsenko and Wanner (8) to indicate the forward (P1) and reverse (P2) primers with their homology extensions.

^b The k and c primers correspond to the Km^r and Cm^r cassettes, as described previously (8); forward (F) and reverse (R) primers flank each gene.

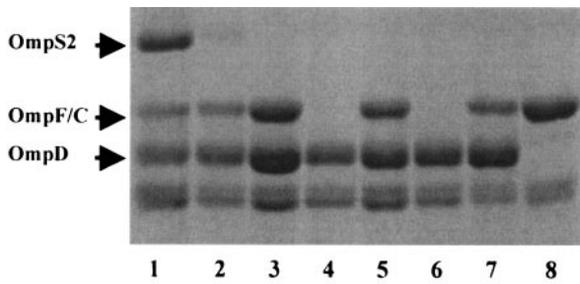


FIG. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel showing outer membrane protein profiles for various *S. enterica* serovar Typhimurium strains. Lanes: 1, STM14028 (wild type)/pFMtrcleuO (plus 50 μ M IPTG); 2, STMS23 ($\Delta ompS2::Km$)/pFMtrcleuO (plus 50 μ M IPTG); 3, STM14028 (wild type)/pFMtrc12 (plus 50 μ M IPTG); 4, STMR ($\Delta ompR::Km$); 5, STMR ($\Delta ompR::Km$)/pFM2001 (*ompR*); 6, STMZ ($\Delta envZ::Cm$); 7, STMZ ($\Delta envZ::Cm$)/pROZ (*envZ*); and 8, STMD ($\Delta ompD::Km$).

BALB/c mice (Harlan Sprague-Dawley Inc., Mexico) were inoculated orally with serial 10-fold dilutions of bacteria, and deaths were recorded over the following 28 days. Thirty minutes prior to oral infection, the gastric pH was neutralized by oral administration of 0.1 ml of 1% sodium bicarbonate. LD₅₀s were calculated by the method of Reed and Muench (28) in three to four repetitions. Mice inoculated with only phosphate-buffered saline (pH 7.4; PBS) were used as controls. *S. enterica* serovar Typhimurium strains STMS14 ($\Delta ompS1::Km$), STMS23 ($\Delta ompS2::Km$), and STMLEUO1 ($\Delta leuO::Km$) were highly attenuated for oral infection (Fig. 2A).

To begin to understand the basis of the attenuation, mixed oral and mixed intraperitoneal infections (IPI) of mice were performed to establish a competitive index (CI) between the wild type and each particular mutant (4). Groups of six mice were inoculated either orally or intraperitoneally with 0.3 ml of an equal mixture of the strains, with total inocula of 10⁸ and 10⁵ bacteria, respectively. Mice were euthanized 6 and 3 days after oral and intraperitoneal infections, respectively, and

spleens and livers were collected. Organs were homogenized in 5 ml of PBS. Resuspended cells were lysed by the addition of an equal volume of 0.5% sodium deoxycholate in PBS and incubated at room temperature for 15 min. Dilutions of cell lysates were plated on LB agar plates both with Km (40 μ g/ml) or Cm (25 μ g/ml) for enumeration of the CFU/mg of organ for the mutant strain and without antibiotics for enumeration of the mixture of the mutant and wild-type strains. CIs were calculated as described previously (4).

As shown in Table 3, the CIs in spleens and livers after oral infection for the *ompS1* and *ompS2* mutants indicated >250-fold reductions in survival, with 4- to 5-fold reductions in both spleens and livers after IPI. Furthermore, attenuation of the double $\Delta ompS1::Cm \Delta ompS2::Km$ (STMS23S15) mutant was the predicted combined effect of the single mutations, suggesting that each mutation results in the loss of independent functions (Table 3). In addition, both the *ompS1* and *ompS2* mutants were impaired in the ability to cause bacteremia at an early time after infection (2 days), with CIs of $<1 \times 10^{-4}$. These results point towards a role of the *ompS1* and *ompS2* genes mainly in the initial stages of infection, since the virulence of these strains was not as severely compromised during IPI.

Bacterial shedding was determined by measuring the proportions of the wild type and the *ompS1*, *ompS2*, or *ompS1 ompS2* mutant in the feces after mixed oral inoculation as described above. Both the wild type and the mutants were shed in equal numbers at 1, 4, 8, 12, and 24 h postinfection: shedding was maximal at 4 h, at $3 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ per mg of feces. The shed *Salmonella* cells were identified on MacConkey plates by the use of spectinomycin, and the mutants were identified by the use of spectinomycin and kanamycin. The identity of the shed *Salmonella* was further verified by streaking onto LB plates with the appropriate antibiotics. Groups of four mice were used for each mixed inoculation, and the experiment was done twice. In accordance with the shedding experiments, no particular sensitivity of the *ompS1*, *ompS2*, or double *ompS1*

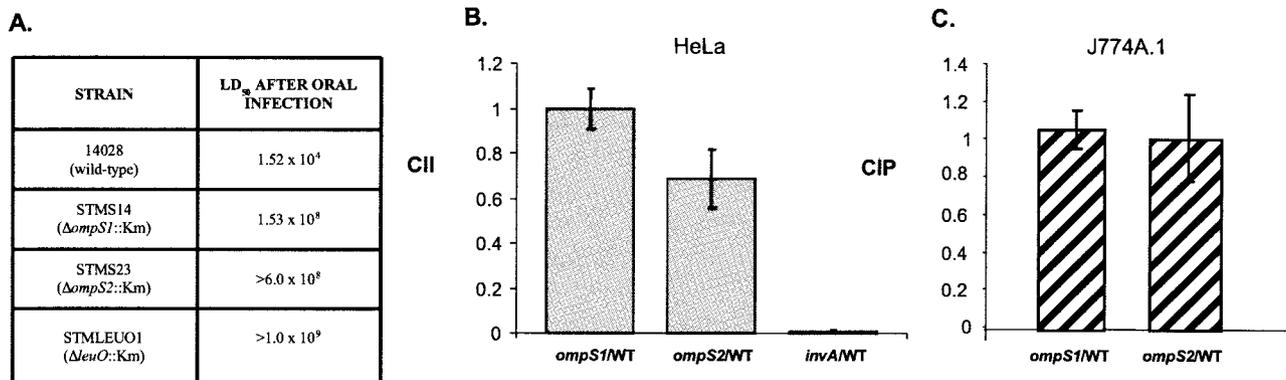


FIG. 2. Phenotypes of *S. enterica* serovar Typhimurium STMS14 ($\Delta ompS1::Km$) and STMS23 ($\Delta ompS2::Km$) mutant strains. (A) LD₅₀s of *S. enterica* serovar Typhimurium strains in BALB/c mice after oral infection. The values are the means of three to four independent experiments. The LD₅₀ of the mutant with a deletion of the gene for LeuO, the positive regulator of *ompS2*, is also shown. (B) CII of mutants upon mixed infection with the wild-type strain in cultured HeLa cells. The CII was calculated by obtaining the ratio between the two strains in the output (intracellular bacteria recovered 3 h after infection) and dividing it by their ratio in the input (initial mixed inoculum). (C) CIP upon mixed infection of the J774.A1 macrophage line with either the STMS14 or the STMS23 mutant and the wild type. The CIP was calculated by obtaining the ratio between the two strains 24 h after infection and dividing it by their ratio 1 h 5 min after infection. For panels B and C, all values are means \pm standard deviations of at least two experiments done in triplicate ($P < 0.001$ by Student's *t* test).

TABLE 3. Competitive indices of mixed oral and mixed intraperitoneal *S. enterica* serovar Typhimurium infections in BALB/c mice

Mutant mixed with wild type	Infection route ^a	CI of infection in indicated organ ^b	
		Spleen	Liver
<i>ompS1</i>	Oral	$3.8 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	$3.8 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$
	i.p.	0.25 ± 0.11	0.28 ± 0.17
<i>ompS2</i>	Oral	$3.4 \times 10^{-3} \pm 9.0 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-3} \pm 9.3 \times 10^{-4}$
	i.p.	0.19 ± 0.11	0.26 ± 0.12
<i>envZ</i>	Oral	$2.3 \times 10^{-5} \pm 9.0 \times 10^{-6}$	$2.6 \times 10^{-5} \pm 1.7 \times 10^{-5}$
	i.p.	$4.8 \times 10^{-4} \pm 1.4 \times 10^{-4}$	$6.8 \times 10^{-4} \pm 3.2 \times 10^{-4}$
<i>ompR</i>	Oral	$6.6 \times 10^{-6} \pm 5.7 \times 10^{-6}$	$8.7 \times 10^{-6} \pm 9.0 \times 10^{-6}$
	i.p.	$2.2 \times 10^{-4} \pm 4.2 \times 10^{-5}$	$4.4 \times 10^{-4} \pm 4.0 \times 10^{-4}$
<i>leuO</i>	Oral	$2.0 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3}$
	i.p.	0.12 ± 0.051	0.11 ± 0.041
<i>ompS1 ompS2</i>	Oral	$3.4 \times 10^{-5} \pm 1.6 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5} \pm 2.4 \times 10^{-5}$
	i.p.	$9.0 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-2}$

^a Organs from oral infections were collected at 6 days postinoculation; organs from IPI infections were collected at 3 days postinoculation.

^b The CI was calculated as the ratio between the mutant strain and the wild type in the output divided by the ratio of the two strains in the input. All values are means ± standard deviations of at least two independent experiments. Differences between the wild type and each mutant were statistically significant ($P < 0.001$) by Student's *t* test.

ompS2 mutant was observed to a battery of stress factors compared to the wild type. The stress factors tested were as follows: lactic acid, 0.1 to 0.5%; pH, 3.5 to 6; bile salts, 3 to 7.5%; polymyxin B, 1 to 3 µg/ml; propionate, butyrate, and acetate, 50 to 200 mM; and deoxycholate or Triton X-100, 0.1 to 0.5%. Thus, attenuation of these mutants does not appear to be due to reduced survival in the gastrointestinal tract.

The CIs for the *envZ* and *ompR* mutants showed about 40,000- and 120,000-fold reduced abilities to colonize both the spleen and liver after oral infection, respectively, and about a 3,000-fold reduction after IPI (Table 3). Hence, the *ompR* mutant behaved as in previous studies, being highly attenuated in accordance with the proposed pleiotropic role for the OmpR regulator (7, 9, 19, 22, 23). Interestingly, the *envZ* mutant was also highly attenuated, indicating that it is the main phosphorylase for OmpR and that phosphorylation by other regulators or by acetyl-phosphate is not as relevant in vivo, in agreement with studies of the regulation of the *ssrAB* genes in *Salmonella* pathogenicity island 2 (19). Complementation in mice of the phenotypes of the *ompS1* and *ompS2* mutants was not feasible, although it was possible for bacteria grown in laboratory media (Fig. 1), since the vector plasmids were not stable in the host. Thus, future studies are aimed at generating stable constructs that will allow such complementation in the mice, although the technique of Datsenko and Wanner (8) has been designed to avoid polar effects.

Strains 14028 (wild type), STMS14 ($\Delta ompS1::Km$), and STMS23 ($\Delta ompS2::Km$) were used in mixed infections in vitro to determine the competitive indices of invasion (CII) of the human epithelial HeLa cell line (ATCC CCL-2) and in survival/proliferation (CIP) in the murine phagocytic cell line J774.A1 (ATCC TIB-67) (29). Invasion assays were done with a modified version of a previously described gentamicin protection assay (30), using 5×10^4 cells per well (90% confluent). Bacteria were grown under low-oxygen conditions and collected at the early/mid-logarithmic growth phase (optical density at 590 nm, ~0.2) as described previously (12, 20). A 1:1 mixture of the mutant and wild-type bacterial strains was applied at a multiplicity of infection of 100. For the survival/proliferation assay, a 1:1 mixture of two bacterial strains was prepared in PBS and added to the macrophages at a multiplicity

of infection of 10 (30). As shown in Fig. 2B, no significant differences were observed between the mutants and the wild type regarding epithelial cell invasion compared with the *invA* mutant (STMA1 strain), which was severely impaired (13). Likewise, no difference was observed regarding survival/proliferation in mouse macrophages (Fig. 2C).

Thus, the attenuated phenotypes in the host were not evident upon assays in vitro. In this respect, the observations presented here are similar to those of other studies, where some *S. enterica* serovar Typhimurium mutants have been identified as being attenuated intraperitoneally and intragastrically yet show comparable invasion of cultured epithelial cells and survival in macrophages to those of the wild-type strain (5).

In agreement with the role of LeuO as a positive regulator of *ompS2* expression, it also appears to play a role in the initial stages of infection (Table 3). The CIs for the *leuO* mutant indicated 500- to 1,000-fold reduced survival in the spleen and liver, respectively, after oral infection and a <10-fold reduced survival after IPI in both the spleen and liver. However, it remains to be seen if LeuO regulates the expression of other genes required for the initial virulence events during *Salmonella* infection. This is in accordance with the recent identification of LeuO as a virulence factor in the *Caenorhabditis elegans* model of *Salmonella* infection (31).

We acknowledge Irma Martínez-Flores for her advice and help during the initial stages of this work, Armando Isibasi and Ismael Secundino for helping us to set up the virulence assays in mice, and Ricardo Oropeza for plasmid pROZ. We are grateful to Elizabeth Mata, Sergio González, and Bárbara Mondragón for assistance with mouse care and housing.

All experimental animal work for this study was carried out under protocols approved by the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Institutes of Health, publication no. 93-23.

O.R.-M. was supported by a Ph.D. fellowship (117004) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and by the Sistema Nacional de Investigadores (SNI) (833). J.L.P. is a Howard Hughes International Research Scholar. This work was supported by grants to J.L.P. and E.C. from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN230398, IN229001, and IN223603) and from CONACyT (25187-N, 37738-N, and 46115-Q).

REFERENCES

1. Aron, L., G. Faundez, C. González, E. Roessler, and C. Cabello. 1993. Lipopolysaccharide-independent radio-immunoprecipitation and identification of structural and *in vivo* induced immunogenic surface proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Vaccine* **11**:10–17.
2. Bernardini, M. L., A. Fontaine, and P. J. Sansonetti. 1990. The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**:6274–6281.
3. Bernardini, M. L., M. G. Sanna, A. Fontaine, and P. J. Sansonetti. 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **62**:3625–3635.
4. Beuzón, C. R., and D. W. Holden. 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes Infect.* **3**:1345–1352.
5. Bowe, F., C. J. Lipps, R. M. Tsois, E. Groisman, F. Heffron, and J. G. Kusters. 1998. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect. Immun.* **66**:3372–3377.
6. Calderón, I., S. R. Lobos, H. A. Rojas, C. Palomino, L. H. Rodríguez, and G. C. Mora. 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* **52**:209–212.
7. Chatfield, S. N., C. J. Dorman, C. Hayward, and G. Dougan. 1991. Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **59**:449–452.
8. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
9. Dorman, C. J., S. Chatfield, C. F. Higgins, C. Hayward, and G. Dougan. 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* **57**:2136–2140.
10. Fernández-Mora, M., J. L. Puente, and E. Calva. 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J. Bacteriol.* **186**:2909–2920.
11. Flores-Valdez, M., J. L. Puente, and E. Calva. 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* **185**:6497–6506.
12. Francis, C. L., M. N. Starnbach, and S. Falkow. 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* **6**:3077–3087.
13. Galán, J. E., and R. Curtiss III. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6383–6387.
14. Galdiero, M., M. D'Isanto, M. Vitiello, E. Finamore, L. Peluso, and M. Galdiero. 2003. Monocytic activation of protein tyrosine kinase, protein kinase A and protein kinase C induced by porins isolated from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Infect.* **46**:111–119.
15. Garmendia, J., C. R. Beuzón, J. Ruiz-Albert, and D. W. Holden. 2003. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* **149**:2385–2396.
16. Gupta, S., D. Kumar, H. Vohra, and N. Kumar Ganguly. 1999. Involvement of signal transduction pathways in *Salmonella typhimurium* porin activated gut macrophages. *Mol. Cell Biochem.* **194**:235–243.
17. Hurley, B. P., and B. A. McCormick. 2003. Translating tissue culture results into animal models: the case of *Salmonella typhimurium*. *Trends Microbiol.* **11**:562–569.
18. Isibasi, A., V. Ortíz, M. Vargas, J. Paniagua, C. González, J. Moreno, and J. Kumate. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. *Infect. Immun.* **56**:2953–2959.
19. Kim, C. C., and S. Falkow. 2004. Delineation of upstream signaling events in the *Salmonella* pathogenicity island 2 transcriptional activation pathway. *J. Bacteriol.* **186**:4694–4704.
20. Kusters, J. G., G. A. W. M. Mulders-Kremers, C. E. M. van Doornik, and B. A. M. van der Zeijst. 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **61**:5013–5020.
21. Kuusi, N., M. Nurminen, H. Saxen, and P. H. Mäkelä. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparation in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **34**:328–332.
22. Lee, A. K., C. S. Detweiler, and S. Falkow. 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **182**:771–781.
23. Lindgren, S. W., I. Stojilkovic, and F. Heffron. 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4197–4201.
24. Muthukumar, S., and V. R. Muthukkaruppan. 1993. Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect. Immun.* **62**:3984–3993.
25. Negm, R. S., and T. G. Pistole. 1999. The porin OmpC of *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages. *Can. J. Microbiol.* **45**:658–668.
26. Oropeza, R., C. L. Sampieri, J. L. Puente, and E. Calva. 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* **32**:243–252.
27. Puente, J. L., A. Verdugo-Rodríguez, and E. Calva. 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* **5**:1205–1210.
28. Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493–497.
29. Segura, I., J. Casadesús, and F. Ramos-Morales. 2004. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J. Microbiol. Methods* **56**:83–91.
30. Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli, and B. B. Finlay. 1993. Methods to study bacterial invasion. *J. Microbiol. Methods* **18**:227–240.
31. Tenor, J. L., B. A. McCormick, F. M. Ausubel, and A. Aballay. 2004. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr. Biol.* **14**:1018–1024.
32. Toguchi, A., M. Siano, M. Burkait, and R. M. Harshey. 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **182**:6308–6321.
33. Verdugo-Rodríguez, A., Y. López-Vidal, J. L. Puente, G. M. Ruiz-Palacios, and E. Calva. 1993. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:248–254.
34. Wang, Q., J. G. Frye, M. McClelland, and R. M. Harshey. 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol. Microbiol.* **52**:169–187.