



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y
SU INFLUENCIA SOBRE LA RESPUESTA DE
ANTICUERPOS INDUCIDOS POR PORINAS DE
Salmonella enterica SEROVAR TYPHI.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

OSCAR ARTEAGA RUIZ



MEXICO, D.F.

2005



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

0349663



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespecial.

NOMBRE: Oscar Arteaga Ruiz

FECHA: 10-11-05

FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente	Profra. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
Vocal	Prof. Rodolfo Pastelin Palacios
Secretario	Prof. Constantino III R. López Macías
1er. Suplente	Prof. Saturnino de León Chapa
2º. Suplente	Prof. Armando Isibasi Araujo.

El presente trabajo fue desarrollado: En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.


Dr. Constantino III Roberto López Macías

ASESOR


Oscar Arteaga Ruiz

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mis papás por el gran amor que siempre me han dado, por todos los consejos que me brindaron para seguir a delante, gracias por darme una linda familia, los quiero mucho y estoy muy orgulloso de ustedes.

A ti Alda, mi hermanita mayor que te ha tocado luchar incansablemente, te quiero mucho gracias. Samuel, por que eres un gran hombre y siempre has sido un excelente ejemplo a seguir, gracias. Horacio, tu superación es un ejemplo para salir delante de todos los retos que la vida te ha puesto, se que conseguirás grandes cosas, gracias. Verito mi pareja, la mas estudiosa y dedicada, hermanita gracias por la infancia tan linda, y por ser también un gran ejemplo de lucha y perseverancia. Israel, como olvidar tantos momentos que compartimos, el beis, el cuarto, las trasvesuras, gracias. Lupis, la consentida, hermanita gracias por darme tanta alegría y con tu temura y nobleza. A mis sobrinos Sami, Marianita y Yóse, A mis cuñados Lilia, Pancho y Chave, A cada uno de ustedes, gracias.

A mi esposa Juani, mi amor gracias por apoyarme siempre, por aceptar ser la compañera de mi vida y por impulsarme a seguir a delante; este triunfo también es tuyo. Te amo con todo mi corazón.

A mis suegros Dón Juan y Sra. Emi, por recibirme tan bien en su familia.

A mis amigos del laboratorio, Dr. isibasi, Dr. Constantino, Dr. Antonio, Dr. Manuel, Dr. Rodolfo, Néstor, Eduardo, Mauricio, Ismael, Osvaldo, Aarón, Cris, Mari, Rébe, Eli, Luisa, Isa, Vero. Por siempre brindarme su apoyo y su amistad.
gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi por brindarme su confianza y afecto, por que me ha dado la oportunidad de conocer a personas muy especiales y que son un ejemplo muy importante para mi, en el laboratorio a su cargo, en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica en el CMN Siglo XXI.

Al Dr. Constantino López por su amistad, apoyo y gran disposición para poder realizar este trabajo.

A la M. en C. Cristina Gil, por el apoyo y en la realización y discusión de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Pastelin y a mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.

A la Dra. Ingebor Becker del laboratorio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Sr. Ricardo Vargas Orozco y el MVZ Daniel Sánchez Almaraz del Bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme utilizar las instalaciones del bioterio y por su colaboración sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

A los Doctores Edmundo Calva y José Luis Puente por proporcionar las cepas de STYC 171 y STYF302 de *Salmonella typhi* utilizadas en este trabajo.

El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyectos número 45261 y Salud 2004-0132.

INDICE

I. ABREVIATURAS

II. RESUMEN

III. ANTECEDENTES

1. Células de la resistencia innata
2. Macrófagos
3. Células dendríticas
4. Reconocimiento (PRRs y PAMPs)
 - a. PRR's que median la fagocitosis
 - b. PRR's secretados
 - c. Sistemas de reconocimiento intracelular
 - d. Receptores tipo Toll (TLR's)
5. Moléculas coestimuladoras
 - a. Familia B7-CD28
 - b. TNF-TNFR
6. Activación de la inmunidad adaptativa
7. Adyuvantes
8. Moléculas inmunoestimuladoras
 - a. Productos bacterianos y sus análogos
 - b. Lipopolisacárido (LPS)
 - c. β -Glucanas
 - d. CpG DNA bacteriano

- e. Membrana de las bacterias GRAM (-)

IV. MODELO EXPERIMENTAL

1. Porinas
 - a. Omp C y Omp F
 - b. Actividad biológica de las porinas
2. Respuesta inmune contra porinas de *S. typhi*
 - a. Inmunogenicidad de OmpC y OmpF de *S. Typhi*
3. Respuesta de anticuerpos vitálicos inducidos por porinas de *S. typhi*.

V. PANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

VI. HIPÓTESIS

VII. OBJETIVOS GENERALES

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

IX. MATERIALES BIOLÓGICOS

1. Cépas bacterianas
2. Animales de laboratorio
3. Biológicos
 - a. Obtención de sueros de ratón
 - b. Obtención de monocitos de médula ósea de ratón y su diferenciación a células dendríticas
 - c. Evaluación de la captación de porinas de *S. typhi* por mácrofagos derivados de médula ósea.

4. Evaluación del efecto adyuvante inducida por las porinas, OmpC y OmpF de *S. typhi*.
 - a. Esquema de inmunización para OVA y HEL
 - b. Determinación del título de anticuerpos anti-OVA y anti-HEL
5. Producción y caracterización de antígenos.
 - a. Obtención de las Porinas de *S. typhi*
 - b. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry
 - c. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE
 - d. Determinación de lipopolisacárido por el método de Karkhanis

X. RESULTADOS

1. Las porinas de *S. typhi* pueden ser captadas por macrófagos *in vitro*.
2. Las porinas de *S. typhi* son capaces de activar células dendríticas induciendo su maduración *in vitro*.
3. Las porinas tienen efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos inducida por antígenos modelo.

XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

XII. CONCLUSIONES

XIII. PERSPECTIVAS DE TRABAJO

XIV. BIBLIOGRAFÍA

I ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ABS	Albúmina Sérica Bovina
APC	Células presentadoras de antígeno
BCR	Receptor del linfocito B
BPI	Proteína de incremento de la permeabilidad
CFA	Adyuvante completo de Freund
CpGs	Secuencias de citocina fosfato guanina
CTLA-4	Receptor de alta afinidad de las moléculas B7 en las células T
DC	Células dendríticas
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM – CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos/monocitos
HEL	Lisozima de Huevo de Gallina
IFA	Adyuvante Incompleto de Freund
IFN - γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulinas
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IKK	Cinasa de I κ B
IL	Interleucina

ip	Intraperitoneal
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL – 1
iv	Intravenoso
I κ B	Fracción inhibidora del factor nuclear κ B
JAK/STAT	Cinasa tipo janus
JNK	Cinasa N- Terminal de JUN
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxioctulónico
LBP	Proteína de unión a LPS
LPS	Lipopolisacárido
LRRs	Repeticiones ricas en leucina
MAM	Moléculas asociadas a microorganismos
MAPK	Cinasa activada por mitógeno
MDMO	Macrófagos de derivados de Médula ósea
MBL	Proteína de unión a manosa
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
MPL	Monofosforil lípido A
MRR	Receptores de reconocimiento de microorganismos
MyD88	Proteína de diferenciación mieloide 88
NF – κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Células asesinas naturales
NQD	Dominios de unión a oligonucleótidos
OmpC	Porina OmpC

OmpF	Porina OmpF
OPD	o-fenilendiamina
OVA	Ovoalbumina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Proteína C reactiva
PE	Ficoentrina
PGRP's	Proteína de reconocimiento a péptido glicana
PRR's	Receptores de reconocimiento de patógeno
SAM	Suero amieloide A
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SP-A y D	Proteína surfactante A y D
SSI	Solución salina isotónica
TAB	Proteína de unión a TAK – 1
TAK	Cinasa activada por TGF - β
TBS	Solución amortiguadora Tris salina
TD	Timo dependiente
TE	Solución amortiguadora Tris EDTA
Th	Linfocito T cooperador
TI	Timo independiente
TIR	Dominio Toll/IL – 1R
TLR	Receptor tipo Toll
TNF - α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF

II Resumen

El presente trabajo tuvo como finalidad estudiar algunos de los mecanismos de la respuesta inmune innata inducidos por las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi. y su influencia en la respuesta de anticuerpos.

Las Porinas son antígenos capaces de inducir protección contra el reto con *S. typhi* en ratones, las porinas, OmpC y OmpF a demás de la protección inducida por cada una de ellas, se observa que inducen la generación de altos títulos de anticuerpos de por vida y que estos anticuerpos tienen capacidad bactericida y neutralizante. [1]

En el presente trabajo, se muestra que las porinas de *S. typhi* también inducen la maduración de células dendríticas en términos del aumento de sus moléculas coestimuladoras, generando en células dendríticas la sobreexpresión de CD80, CD86, CD40, además de sobreexpresarse otras moléculas como MHC clase II y CD69 (marcador de activación) este incremento en dichas moléculas está relacionado con capacidad adyuvante, en la respuesta inmune humoral contra antígenos modelo, por lo que se midió esta capacidad in vivo inmunizando porinas, OmpC y OmpF junto con dos antígenos modelo HEL y OVA, en los cuales se volvió a observar que efectivamente el aumento de moléculas coestimuladoras encontrado en las células dendríticas *in vitro* corresponde al efecto adyuvante encontrado contra estos antígeno *in vivo*. [2]

Estos resultados nos indican, que las porinas son antígenos que además de inducir una respuesta inmune adaptativa, observamos que tiene la capacidad de activar a los mecanismos de la respuesta inmune innata es decir un (PAMP) y ser adyuvantes de la respuesta de anticuerpos contra antígenos modelo. [3]

III ANTECEDENTES

La Inmunidad se refiere a la habilidad global de un hospedero de resistir a microbios que de otra manera serían capaces de acabar con él. Sin embargo, por razones de estudio la inmunidad como tal se ha dividido en dos ramas principalmente la llamada inmunidad adaptativa, que ha sido estudiada desde hace mas de un siglo y la inmunidad innata, la cual se dejo de lado por mucho tiempo y desde hace algunos años ha empezado a retomar su importancia.

Debido a la importancia tomada por la inmunidad innata en los últimos años Beutler [4] en el 2004 haciendo analogía con el sistema nervioso decide dividir a los componentes de la respuesta inmune cómo Aferentes (sensores) y Eferentes (efectores), los cuales a su vez se encuentran divididos en humorales (aquellos que sen encuentran de forma soluble) y celulares (aquellos que se encuentran en la célula) de tal manera que esta clasificación nos permite tener una idea en cuanto a la función y localización de los componentes de este sistema, esto puede apreciarse mas claramente en la figura 1. [4]

De tal manera que entre los componentes humorales aferentes encontramos a LBP, Pentrexinas, colectinas CD14, y entre los aferentes celulares se encuentran los TLR's, CD 14 membranal, NOD, entre otros, todos estos componentes sensores, se conocen genéricamente como PRR's (Receptores de reconocimiento patrón), últimamente se les ha dado el nombre de MRR's sin embargo esta nomenclatura nos es utilizada comúnmente por lo cual en este trabajo se les seguirá nombrando PRR's.

RESPUESTA INMUNE INNATA	HUMORAL	AFERENTE (SENSORIA)	LBP, CD14, colectinas properdina, C3b, pentraxinas.
		EFERENTE (EFECTORA)	Citocinas, defensinas, BPI, complemento, lactoferrina, reactantes de fase aguda.
	CELULAR	AFERENTE (SENSORIA)	TLR's, Dectin-1, MR, DEC205, PKR, NOD 1y 2.
		EFERENTE (EFECTORA)	Péptidos antimicrobianos, proteasas, lipasas, glicosidasas, moléculas de adhesión, H ₂ O ₂ , radical hidroxilo, ión superóxido, NO, peroxinitrito.

Fig 1. Componentes de la respuesta inmune innata, modificado de, [4]

1. Células de la respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata utiliza diferentes tipos de células para responder ante el ataque de microorganismos. Estas células despliegan una serie de actividades efectoras con el fin de controlar la infección, atraer al sitio a más células de la resistencia innata y activar a la respuesta inmune adaptativa [4]. Algunas de estas actividades consisten en la fagocitosis del antígeno, la liberación de mediadores inflamatorios y factores quimiotácticos, la presentación de antígeno a los linfocitos T, entre otras [4]. Muchas de estas actividades pueden ser desempeñadas por la misma células, aunque hay células que preferentemente solo realizan algunas de ellas, por ejemplo, los neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas que son células fagocíticas, siendo ésta la

especialidad del el neutrófilo; los macrófagos y células dendríticas son presentadoras de antígeno aunque se reconoce a las últimas como las especialistas; la mayoría de ellas son capaces de liberar mediadores inflamatorios. A continuación se presenta una breve explicación de las células de la resistencia innata que son relevantes en esta investigación.

2. Macrófagos.

Se encuentran presentes en todos los tejidos del organismo, a los cuales proveen de una vigilancia constante [5]. Derivan de precursores mieloides en la médula ósea, el bazo y el hígado fetal hacia una forma de macrófagos inmaduros denominados monocitos. Al dejar el ambiente de la médula ósea migran hacia los diferentes tejidos probablemente dirigidos por quimiocinas [6]. Al entrar al parénquima del tejido el ambiente circundante influirá significativamente en la función del macrófago, ya que los macrófagos residentes de diferentes tejidos despliegan una serie de funciones diferentes. Después de alguna agresión hacia el tejido, los macrófagos residentes pueden contribuir a la resistencia innata mediante el despliegue de una serie de actividades inflamatorias y efectoras [7].

Los macrófagos son capaces de detectar la presencia de microorganismos mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAM's) a través de receptores de reconocimiento de microorganismos (MRR's) [8] presentes en la superficie de la célula. Posterior al reconocimiento el macrófago se activa y despliega sus funciones efectoras, dentro de las cuales se encuentra la fagocitosis y destrucción del patógeno, la producción de una serie de citocinas [9] y quimiocinas que ayudaran a la comunicación entre las células, tanto

de la resistencia innata como de la inmunidad adaptativa y finalmente la presentación de antígeno a los linfocitos CD4+ con lo cual se inicia la respuesta inmune adaptativa [10].

Una vez que se ha activado la respuesta inmune adaptativa los linfocitos CD4+ pueden incrementar las funciones de los macrófagos mediante la liberación de citocinas que, al unirse a su receptor presente en los macrófagos, prenden una serie de genes que hacen al macrófago más eficiente en sus funciones. Los macrófagos también tienen en su superficie receptores para anticuerpos y complemento los cuales contribuyen a la destrucción del antígeno.

3. Células dendríticas (DC).

Son componentes cruciales del sistema inmune teniendo un rol esencial en la inducción y control de la activación de los linfocitos T así como la modulación de la respuesta de los linfocitos B y células NK [11]. La potencia de las células dendríticas en inducir la activación de los linfocitos T, depende de su capacidad de capturar, internalizar y procesar antígenos llevando a la presentación de péptidos asociados a las moléculas de MHC a linfocitos T antígeno específicos, además, una vez que reconocen al antígeno a través de PRRs, lo fagocitan y se induce su maduración la cual consiste en un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40 necesarias para una efectiva activación de linfocitos T naïve, y moléculas de MHC y una disminución en su capacidad fagocítica. El proceso de maduración de las células dendríticas incluye un cambio en la expresión de receptores para quimiocinas [12] y moléculas de adhesión [13] el cual le permite viajar del sitio de infección al órgano linfoide más

cercano, lugar en el que se lleva a cabo la presentación de antígeno y en donde la DC es capaz de producir una serie de citocinas cruciales para las funciones efectoras de los linfocitos T [14].

Las células dendríticas se encuentran en todos los tejidos periféricos del organismo, lo que le permite detectar rápidamente la presencia de antígenos.

Se ha visto que existen diferentes subpoblaciones de DC. Estudios anteriores sustentan la idea de que estas subpoblaciones se generaban debido a que las células dendríticas podían generarse a partir de precursores mieloides y precursores linfoides. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que DC con el mismo fenotipo pueden generarse tanto de precursores mieloides como linfoides. Otros estudios han mostrado evidencia de que verdaderas subpoblaciones de DC pueden originarse paralelamente de estos precursores. Por esta razón es que el enfoque central acerca del tema se ha centrado en las diferencias entre las poblaciones conocidas de DC, ahora llamadas colectivamente células dendríticas convencionales (CDC) y las nuevas integrantes y poco conocidas del grupo, las células dendríticas plasmacitoides (PDC) [5], las cuales han sido identificadas por su capacidad de producir grandes cantidades de IFN tipo I como respuesta a las infecciones virales y se ha visto que tienen una fisiología compleja y diferente de las CDCs puesto que difieren de éstas en el control génico de la expresión de moléculas de MHC así como en la rápida producción de IFN tipo I después del reconocimiento del antígeno a través de TLR's. [15].

4. Reconocimiento (PRRs y PAMPs)

La estrategia de reconocimiento de la inmunidad innata se basa en la detección de estructuras moleculares conservadas, presentes en los patógenos pero no en el organismo huésped. Existen múltiples diferencias entre las rutas metabólicas de las células procariotas y eucariotas, al igual que en las de protozoarios y huéspedes multicelulares, que llevan a la generación de productos que son esenciales para las funciones fisiológicas y que, por lo tanto, se encuentran presentes en todos los microorganismos (PRR's) de cierta clase . [16]

Los productos de estas rutas metabólicas se conocen como patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP's) [16] y representan los blancos de reconocimiento por parte de la resistencia innata, a través de receptores llamados receptores de reconocimiento de patógeno (PRR's).

Dentro de los PAMP's se encuentran los ácidos nucleicos como el RNA de doble cadena el cual es generado por virus que se encuentran replicándose, N-formil metionil péptidos que son típicos en las proteínas bacterianas, lípidos complejos y carbohidratos que son sintetizados exclusivamente por los microorganismos, como el lipopolisacárido en las bacterias Gram negativas, los ácidos teicoicos en las bacterias Gram positivas y los oligosacáridos ricos en manosa que se encuentran en las glicoproteínas bacterianas [17].

La inmunidad innata utiliza una variedad de PRR's los cuales pueden encontrarse expresados en la superficie de la célula, en compartimentos intracelulares o secretados en el torrente sanguíneo o fluidos tisulares. Las principales funciones de los PRR's incluyen la opsonización, activación del complemento y cascadas de coagulación, fagocitosis, apoptosis y cascadas de

señalización que llevan a una respuesta proinflamatoria . De acuerdo a lo anterior los PRR's se puede dividir en dos clases funcionales [17].

a. PRR's que median la fagocitosis (anclados a la membrana)

Se expresan en la superficie de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas y como su nombre lo indica, reconocen PAMP's en la superficie de los microorganismos [18] y median la fagocitosis de los mismos, los cuales posteriormente, son transportados a compartimentos lisosomales en donde existen una gran cantidad de mecanismos disponibles para su destrucción [19]. En caso de las células dendríticas y los macrófagos, la fagocitosis es seguida por el procesamiento de antígenos y su presentación a linfocitos T en el contexto de moléculas del MHC. Algunos integrantes de este grupo son: receptores scavenger (SR's) como SR – A y MARCO, miembros de la familia de las lectinas tipo C [20, 21], como el receptor de manosa en macrófagos (MR) y DEC205 expresado en CD, y receptores de β - glucanos, como Dectin–1. [22]

b. PRR's secretados (solubles)

Esta clase de PRR's dan lugar a tres tipos de funciones: activan al complemento, opsonizan células para facilitar su fagocitosis y, algunas de ellas, funcionan como proteínas accesorias para el reconocimiento de PAMP's por receptores transmembranales. Son producidos principalmente por el hígado y en menor grado por células como fagocitos. Estos PRR's son conocidos como proteínas de fase aguda. Dentro de este grupo se encuentran: colectinas (como la

proteína de unión a manosa (MBL) [23], proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D), pentraxinas como la proteína C reactiva (PCR) y el suero amiloide A (SAM), transferasas de lípidos (como la proteína de unión a LPS (LBP), la proteína de incremento de la permeabilidad (BPI), etc. y las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP's). [24]

c. Sistemas de reconocimiento intracelular:

Están involucrados en el reconocimiento de patógenos intracelulares, en particular virus, con el fin de activar mecanismos que bloqueen su replicación. Los dos sistemas mejor caracterizados son el de la proteína cinasa R (PKR) y la oligoadenilato sintasa (OAS), los cuales juegan un papel muy importante en la protección antiviral del hospedero. Las proteínas de la familia de Dominio de unión a oligonucleótidos NOD (NOD1 y NOD2) también pertenecen a este tipo de PRRs y recientemente se ha demostrado que participa como un sensor general de bacterias intracelulares Gram positivas y Gram negativas. [16][25][26]

También los TLR's 7, 8 y 9 pertenecen a este tipo de receptores sin embargo, se hablara de sus características generales en el siguiente punto.

d. Receptores tipo Toll (TLR's):

El término Toll del alemán (estupendo), originalmente se refería a un receptor presente en la superficie de la célula que dirigía la orientación dorso/ventral en las larvas de *Drosophila*. [27] Al final del siglo XX, Toll mostró ser un receptor esencial en la defensa de *Drosophila* contra la infección por hongos y otros microorganismos [28]. Al secuenciar el genoma de este insecto se encontraron

nueve proteínas pertenecientes a la familia Toll. En los 90's un homólogo al receptor Toll fue encontrado en mamíferos (TLR4) y se observó que inducía la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria.

Debido a su similitud con los receptores Toll de *Drosophila*, se les dio el nombre de TLR (siglas en inglés de Toll – like receptors) [29].

Los TLRs de los mamíferos comprenden una familia que consiste en al menos 11 miembros en humano y 13 en ratón [30].

Los primeros 9 se conservan entre el humano y el ratón, ya que se ha visto que el TLR-10, el cual es presumiblemente funcional en humano, presenta una mutación en ratón que ocasiona que la secuencia sea no productiva indicando que el TLR-10 en ratón no es funcional, por otra parte, el TLR-11 de ratón es funcional mientras que en humano la secuencia presenta un codón de terminación que resulta en una carencia en la producción de este TLR en humanos [31][32].

Se ha observado la presencia de estos receptores en la mayoría de las células del sistema inmune, tales como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B.

Funcionalmente, se ha demostrado una importante participación de estos receptores en el reconocimiento de componentes microbianos específicos derivados de patógenos incluyendo hongos, parásitos, virus y bacterias.

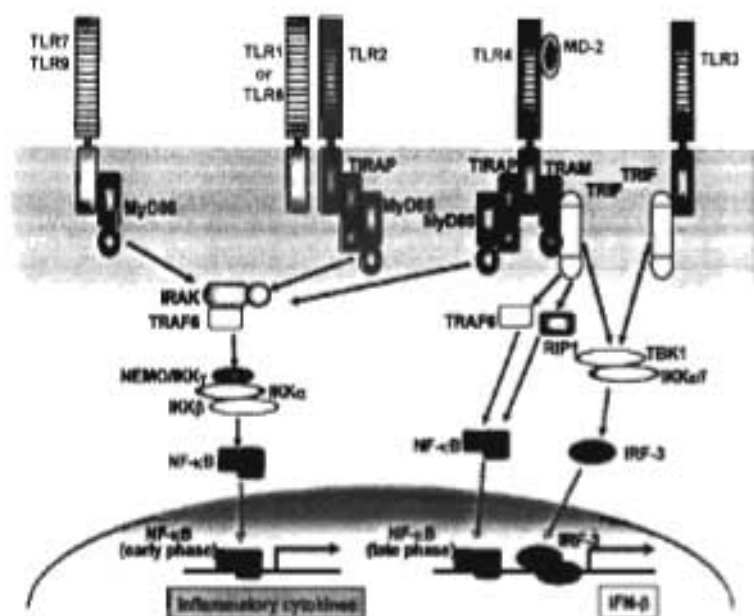


Fig. 2 Ligandos de los TLRs. [33]

5. Moléculas coestimuladoras

La activación de los linfocitos T depende del reconocimiento específico de péptidos antigénicos unidos a las moléculas del MHC, presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno, por parte del TCR. Sin embargo, esta unión es insuficiente para activar al linfocito T y en cambio puede producir la apoptosis de la célula o un estado de energía.

La adecuada activación y proliferación de los linfocitos T requiere, además de la interacción entre el TCR y las moléculas de MCH, de señales de coestimulación proporcionadas por moléculas presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno.

Actualmente se conoce un gran número de moléculas coestimuladoras de los linfocitos T cuyas funciones pueden ser distintas o sobreponerse [34]. La señal de coestimulación es proporcionada principalmente por las integrantes de tres familias: la superfamilia (B7-CD28), factor de necrosis tumoral-receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-TNFR), la cual carece de dominios de muerte, y la superfamilia CD2.

a. Familia B7-CD28 [35].

Son cruciales para la activación de los linfocitos T, para la prevención de la tolerancia y para un adecuado desarrollo de la inmunidad mediada por los linfocitos T. Estas moléculas no solo proveen de señales positivas que estimulan el crecimiento de los linfocitos T, también aumentan la producción de citocinas y promueven la diferenciación de estas células. Sin embargo, también mandan señales negativas que limitan, terminan o atenúan la respuesta de T. Son dos las moléculas pertenecientes a esta familia CD80 y CD86 y sus receptores, presentes en los linfocitos T, CD28 y CTLA- 4.

b. TNF-TNFR [36][37].

La principal molécula coestimuladora perteneciente a esta familia es CD40. Es expresada en una gran variedad de células como linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, fibroblastos. El ligando de CD40-CD154 es expresado principalmente en linfocitos T CD4+ activados. Después de la unión de CD40 un gran número de vías de señalización son activadas llevando a cambios en la expresión y función de los genes. Éstos incluyen NF- κ B, MAP cinasas, proteínas TRAF, P13K y la vía de señalización JAK/STAT, las cuales aumentan la expresión de otras moléculas coestimuladoras, la producción de múltiples

citocinas y quimiocinas y recientemente se ha demostrado que la interacción de CD40 con su receptor promueve la producción de factores angiogénicos.

6. Activación de la inmunidad adaptativa

Una vez activadas, las DCs migran al órgano linfoide secundario donde presentarán el antígeno a los linfocitos T CD4+ y CD8+. El cambio fenotípico que sufren las células dendríticas durante la migración implica la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86 [38]. Algunos adyuvantes junto con el antígeno pueden llegar al órgano linfoide secundario y activar a los linfocitos B de manera TI y TD.

La respuesta inmune celular adquirida comprende a los LT CD8+ y CD4+, estos son activados cuando los antígenos, previamente procesados, son presentados por las APC's (DC's, LB y macrófagos) en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I o de clase II (MHCI y MHCII) respectivamente, los cuales son reconocidas a través del receptor del linfocito T (TCR). [39][40]

Los LT CD4⁺ reconocen a los antígenos exógenos que son presentados en moléculas del MHC de clase II, cuando esto ocurre, los LT CD4⁺ se diferencian a células denominadas LT cooperadores 1 (Th1) o LT cooperadores 2 (Th2) [41][42]. La diferencia entre estas dos poblaciones radica en el perfil de citocinas que secretaran, siendo el interferón gamma (IFN- γ) la citocina característica para los Th1 mientras que la Interleucina 4 (IL-4) es la citocina característica para los Th2.

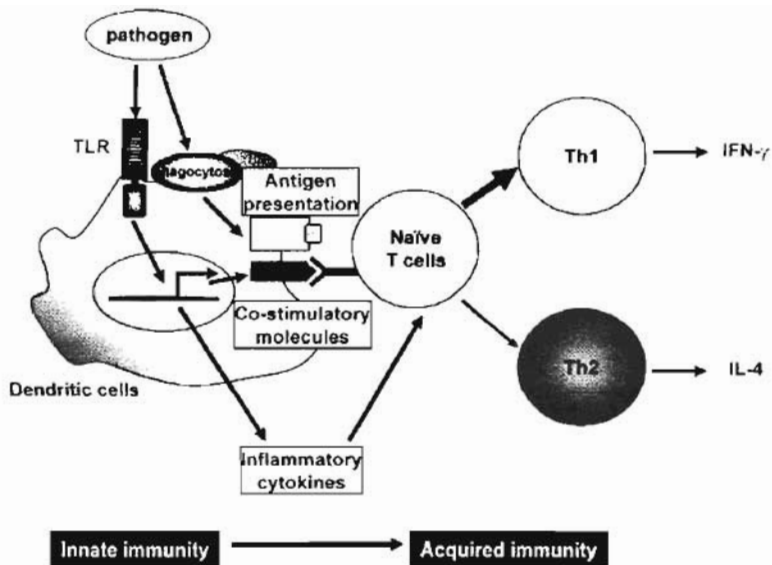


Figura 3. Interacción entre la inmunidad innata y adaptativa. [32]

Los LT CD8⁺ reconocen antígenos endógenos asociados a las moléculas del MHC de clase I, la forma en que realizan sus funciones efectoras puede ser por medio de la liberación de IFN- γ y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o bien por un proceso citolítico directo [43]. El IFN- γ juega un papel importante en el mecanismo que indica la capacidad adyuvante, el IFN- γ incrementa la capacidad fagocítica de las DC's y macrófagos así como la expresión de moléculas coestimuladoras [44].

Para que los linfocitos B sean activados se requiere que su receptor de antígeno (BCR) reconozca a su antígeno, si el reconocimiento de la estructuras es repetitivo, entonces: Induce la activación de linfocitos B y la producción de IgM [45][46]. Las citocinas generadas por los LT cooperadores promueven el cambio

de isotipo en los linfocitos B produciendo así las otras clases de anticuerpos. (tabla 1).

Humano		Ratón	
Interleucina	Isotipo	Interleucina	Isotipo
IL-10	IgG1	IL-4	IgG1
¿?	IgG2	IFN- γ	IgG2a
IL-10	IgG3	TGF- β	IgG2b
IL-4 + IL-13	IgG4	INF- γ	IgG3
IL-4 + IL-13	IgE	IL-4	IgE
IL-10 + TGF- β	IgA1 e IgA2	TGF- β , IL-4, IL-6	IgA

Tabla 1. Efecto de las citocinas sobre el cambio de isotipo en linfocitos B. [47][48]

7. Adyuvantes.

Promueven la generación de una respuesta inmune elevada y de larga duración.

Los adyuvantes pueden ejercer su efecto inmunopotenciador a nivel de la respuesta inmune innata, estimulando a las DC's y macrófagos a tomar antígeno del medio. La activación de estas células es a través de los PRR's. El adyuvante también facilita la endocitosis del antígeno evitando que este se diluya, es decir localizándolo [49].

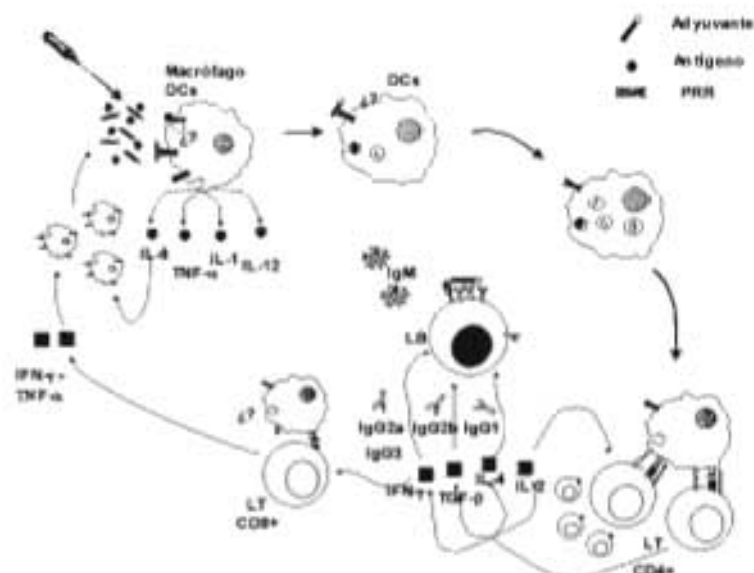


Figura 4. Mecanismo de acción de los adyuvantes. [50]

Existen diferentes tipos de adyuvantes:

8. Moléculas inmunoestimuladoras

Este tipo de adyuvantes activan al sistema inmune innato principalmente por medio de los PRR's, en especial los TLR's. [51][52][53]

a. Productos bacterianos y sus análogos

Comprende una gran variedad de adyuvantes que van desde los que contienen al microorganismo completo inactivado, como *Mycobacterium* en el Adyuvante Completo de Freund (CFA), hasta los que están compuestos de estructuras subcelulares, como el lipopolisacárido (LPS), CpG-DNA bacteriano, β -glucanas, toxinas inactivadas (LTk63, CTB) [54][55].

b. Lipopolisacárido (LPS).

El LPS, componente de la membrana de las bacterias Gram negativas, tiene una región hidrofílica compuesta de polisacáridos y una región lipofílica compuesta de un fosfolípido (Lípido A) [56].

El lípido A en pequeñas dosis puede estimular la producción excesiva de citocinas proinflamatorias provocando el efecto adyuvante y en dosis mayores choque séptico [55].

El efecto adyuvante del LPS se debe en parte a que inicialmente, el LPS libre o el complejo soluble LPS-Proteína de unión al LPS (LBP) se unen a CD-14, una proteína que se puede encontrar soluble o en la membrana celular, activando la unión al TLR-4. Se requiere una tercer proteína, MD-2, para que se active la cascada de señalización inducida por el LPS [57][58].

Si se elimina un residuo de fosfato del LPS se obtiene el Monofosforil lípido A (MPL), esta molécula mantiene la adyuvancia pero tiene menor toxicidad. Se ha visto que la $\beta(1-6)$ diglucosamina hexacilada con tres residuos 3-n-alcanoiloxitetradecanoil o con seis ácidos grasos es necesaria para la adyuvancia [59].

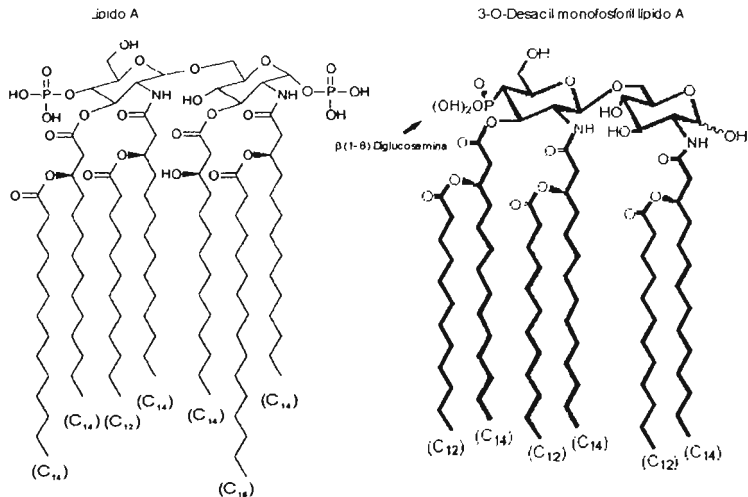


Figura 5. Diferencias estructurales entre el Lípido A y MPL.

c. β -Glucanas

Las β -glucanas, polisacáridos de levaduras, son polímeros de $\beta(1-3)$ glucosa que pueden presentar cadenas laterales de glucosa $\beta(1-6)$ adquiriendo una conformación de hélice o triple hélice [60].

Las propiedades inmunomoduladoras de las β -glucanas dependen del tamaño, ramificaciones y conformación, siendo las conformaciones de una sola hélice las más efectivas [61].

Las β -glucanas de alto peso molecular pueden ser reconocidas por el receptor de complemento tipo 3 (CR3) presente en monocitos y neutrófilos, activando la degranulación y liberación de citocinas en ausencia de los LT.

Las β -glucanas de bajo peso molecular pueden unirse al CR3 activando a macrófagos, neutrófilos y células NK para ejercer su actividad citotóxica en patógenos o células opsonizados con iC3b [61].

Investigaciones recientes han demostrado que las β -glucanas activan un receptor que contiene un dominio de receptor Toll / Interleucina 1 (TIR) y que producen TNF- α . Ésta producción de TNF- α es dependiente de NF- κ B [62].

d. CpG DNA bacteriano

El DNA bacteriano contiene motivos CpG poco comunes en el DNA de eucariotes, estos motivos son reconocidos intracelularmente por el TLR 9 activando a la respuesta inmune innata y promoviendo la liberación de citocinas de tipo Th1 [63]. Debido a las diferencias en la secuencia de aminoácidos que conforman el dominio de unión a motivos metil-CpG (MBD1) del TLR 9 de diferentes especies, la afinidad del TLR-9 por los oligonucleótidos de CpG dependerá de la secuencia óptima de nucleótidos para cada especie [64].

Los CpGS se han podido clasificar de acuerdo al tipo de respuesta inmune que estimulen, los CpG's tipo D estimulan la producción de interferón alfa (IFN- α) e IFN- γ por las DC's y células NK, no estimulan eficientemente a las células B y tienen una cadena quimérica con un núcleo de CpG con enlaces fosfodiéster flanqueado por secuencias de PTO-poliguanosina; los CpG's tipo K estimulan la proliferación de los linfocitos B y la liberación de IL-6 por los monocitos [65].

La respuesta Th1 de mayor especificidad inducida por los CpGs—Oligodesoxinucleótidos (ODNs), se consigue cuando se inmunizan los CpGs unidos covalentemente al antígeno [66]. Los CpGs son candidatos prometedores a ser aplicados en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas debido a sus múltiples efectos inmunológicos y bajos efectos secundarios [67]

e. Membrana de las bacterias GRAM (-).

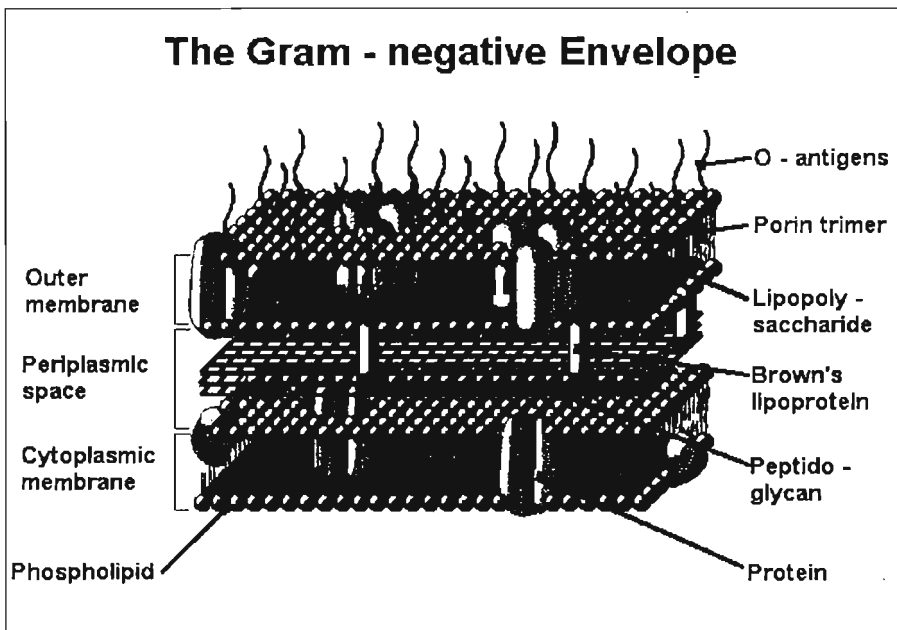


Fig. 6 Esquema de la membrana de las bacterias Gram-negativas [68].

IV. MODELO EXPERIMENTAL.

1. Porinas

Las porinas son poros o canales protéicos no específicos que pueden ser atravesados por pequeñas moléculas hidrofílicas. En la membrana externa se encuentran otras proteínas que funcionan como canales de difusión específicos y facilitan el paso de di, tri y oligosacáridos.

Las porinas se encuentran formando parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos. Forman canales o poros que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas con límite de exclusión de solutos aproximadamente de 600Da. Estas proteínas transmembranales se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a un barril y cada homotrímero es muy estable ante la acción de detergentes y proteasas (Figura 7) [69]

a. En condiciones de laboratorio *S. typhi* sintetiza OmpC, OmpF y OmpA [70].

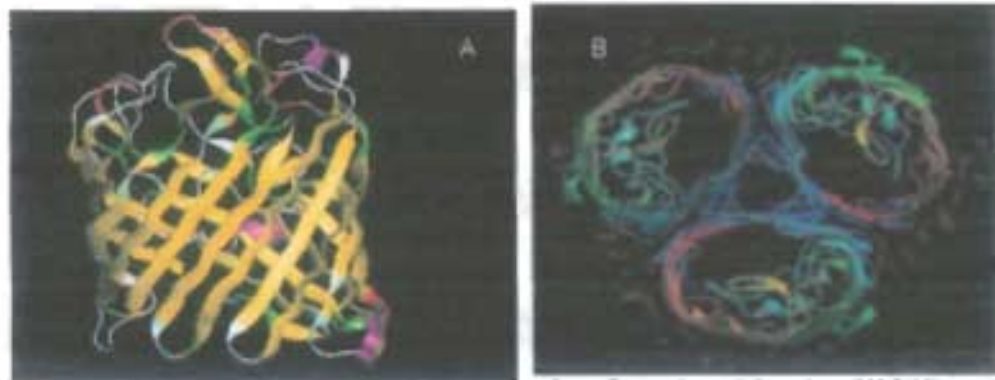


Fig. 7 A) Modelo del monómero de la porina OmpF de *E. coli* [70] B) Modelo del trímero de la porina OmpF de *E. coli* [71].

La cantidad de porinas presente en la membrana externa es relativamente constante aproximadamente de 2×10^5 siendo además una de las proteínas más abundantes en términos de masa que pueden llegar a representar hasta un 2% de las proteínas totales en la célula [72].

b. Actividad Biológica de las porinas.

Las proteínas de las bacterias Gram-negativas se han utilizado como acarreadores para mejorar la respuesta inmune a diferentes antígenos o como antígenos candidatos a vacuna [73][74].

Durante la interacción con el hospedero, las porinas de gran parte de las bacterias Gram-negativas, incluyendo *Salmonella*, activan al sistema inmune tanto innato como adaptativo y tienen actividades biológicas diversas en diferentes células eucarióticas. Por ejemplo, la inoculación de porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la pata de ratas induce edema de manera dosis dependiente, también se ha visto que las porinas son pirogénicas en conejos y que este fenómeno no se encuentra relacionado con contaminación de LPS. Se tiene evidencia de que las porinas de *S. typhimurium* inducen aumento de TNF α , interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 6 (IL-6) en monocitos humanos y de IFN- γ e interleucina 4 (IL-4) en linfocitos humanos [75].

Entre los efectos generados por las porinas se encuentra el de inducir aumento de NO en macrófagos peritoneales de ratón tratados con IFN- γ .

Utilizando células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y células de sangre periférica humana se encontró que las porinas de *S. typhimurium* pueden estimular la migración de leucocitos a través del endotelio previamente activado con IL-1 β o sin activar, y tienen influencia en el aumento de la expresión de B7-2 en los linfocitos B. [75].

Recientemente se demostró que las porinas de *Neisseria*, se unen a uno de los receptores de la familia de PRR (receptores de reconocimiento patrón), el toll like receptor-2 (TLR-2) que unen a moléculas llamadas Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) [76][77], y se ha demostrado también que esta proteína es capaz de aumentar la expresión tanto de TLR-2 como de TLR-6 en células B2 peritoneales.

Por otro lado , Galdiero [78], reportaron recientemente que las porinas de *S. typhimurium* activan los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en la línea celular U937, a través de la vía de señalización de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK), participando de manera muy importante p-38. Esta activación es diferente en tiempo y elementos a la activación generada por el LPS en la misma célula, mediante la utilización de inhibidores [78].

Estudios de Avinjit [79], han demostrado recientemente que las porinas de *Shigella dysenteriae* a demás de aumentar la expresión de TLR-2 y TLR-6, inducen la expresión de IgG2a e IgA y que esta porina tiene la capacidad de aumentar la expresión de CD-86 molécula esencial en la activación de linfocitos T y por lo tanto relacionada con el efecto adyuvante que ejercen diferentes ligandos.

2. Respuesta inmune contra Porinas de *Salmonella typhi*.

Debido a que uno de los blancos de la respuesta inmune contra *S. typhi* son las porinas, éstas se purificaron y los estudios de protección en ratones demostraron que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. typhi* [80]. También se demostró que estas proteínas son el blanco no sólo de los anticuerpos sino también de linfocitos T en humanos que se recuperan de la enfermedad y en individuos vacunados con la cepa atenuada Ty21a. Los resultados obtenidos en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio indican que la vacuna oral de Germanier [81], induce respuesta inmune celular contra porinas y OMP's de *S. typhi* probablemente debida a una infección autolimitada producida por la cepa Ty21a capaz de generar protección a través de respuestas celulares y humorales similares a aquellas que se generan en pacientes convalecientes de fiebre tifoidea. Estos resultados también muestran que las porinas son buenos inmunógenos y que fungen como blanco de la respuesta inmune celular contra *S. typhi*. Tanto las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con fiebre tifoidea como las PBMCs de voluntarios humanos vacunados oralmente con Ty21a respondieron contra porinas y proteínas de membrana externa de *S. typhi* [81].

Por ello en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, se diseñó una vacuna a base de porinas de *S. typhi* a la que se le denominó Isipor, que además de inducir la protección, por su naturaleza proteica, es capaz de producir memoria y no requiere de cadena fría por ser estable a temperatura ambiente. Esta vacuna se encuentra actualmente en estudio clínico fase I [82].

a. Inmunogenicidad de OmpC y OmpF de *S. typhi*

El estudio molecular demostró que la preparación de porinas está constituida por una mezcla proteica donde fueron identificadas OmpC y OmpF.

Para estudiar los mecanismos de protección inducidos por estas proteínas se identificó y clonó el gen *ompC* de *S. typhi* dentro del plásmido pST13. La porina OmpC de *S. typhi* fue expresada en *E. coli* (UH302) carente de sus propias porinas. La OmpC purificada de esta bacteria fue capaz de conferir protección hasta de un 40% contra el reto con 100 DL50 de *S. typhi* en el modelo del ratón[83].

Sin embargo para entender realmente la contribución de estas proteínas en la protección, se obtuvieron de *S. typhi*, primero se caracterizó la respuesta inmune humoral inducida por OmpF y OmpC y se observó que ambas inducen la producción de altos títulos de anticuerpos, de larga duración y de todos los isotipos, posteriormente se caracterizó la funcionalidad de los mismos por medio de ensayos de fijación de complemento y neutralización en los cuales se encontró que los anticuerpos anti-OmpC tienen una mayor capacidad bactericida y que esta se conserva a lo largo del tiempo mientras que para OmpF, no se obtuvo una respuesta bactericida tan marcada ni de larga duración; en cuanto a la capacidad neutralizante, se observó que los anticuerpos inducidos por ambas poseen esta capacidad [83].

Cómo se comentó anteriormente, todos los antecedentes que se tienen a cerca de las porinas de *S. typhi* están relacionados con la parte adaptativa de la respuesta, sin embargo no se conocen los mecanismos de la respuesta inmune innata inducidos por las porinas de *S. typhi*.

3. Respuesta de Ab's vitalicios inducidos por porinas de *S. typhi*

Anticuerpos Vitalicios.

Se ha examinado la capacidad de las porinas de *S. typhi* para la inducción de anticuerpos de larga duración en ratones BALB/c, estas proteínas desencadenan una importante producción de inmunoglobulinas de clase IgG de larga duración, esta inducción se lleva a cabo en ausencia de adyuvantes externos, se observó que se producen todas las subclases de IgG durante la respuesta de larga duración (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), como se mencionó anteriormente las porinas tienen un alto grado de homología entre diferentes especies bacterianas sin embargo los anticuerpos generados por las porinas de *S. typhi* no presentan reacción cruzada con *S. typhimurium*. El suero antiporinas demuestra actividad bactericida de larga duración en contra de la cepa tipo silvestre de Salmonella aunque los títulos de anticuerpos que se observan por ELISA han disminuido a lo largo del tiempo. [84]

Anteriormente se mencionó que las porinas de *S. typhi* están compuestas mayoritariamente por OmpC y OmpF y se evaluó la contribución de éstas en la inducción de la respuesta inmune humoral de larga duración, y los anticuerpos inducidos por estas proteínas se observaron por 300 días además de que son capaces de inducir altos títulos de anticuerpos bactericidas y en el caso de OmpC estos son de larga duración, por lo cual OmpC estaría mediando la capacidad bactericida de larga duración que se había observado en las porinas. [85]

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconocen los mecanismos celulares y moleculares innatos y su influencia en la respuesta humoral, que median la protección y la producción de Ab's vitalicios inducidos por porinas de *S. typhi*.

VI. HIPOTESIS

Las porinas de *S. typhi* tienen la capacidad de ser reconocidas y activar a las células de la respuesta inmune innata y de inducir un efecto adyuvante sobre la respuesta inmune debido a anticuerpos específicos contra porinas u otras proteínas.

VII. OBJETIVOS GENERALES.

Evaluar las características de la respuesta inmune innata inducida por las porinas de *S. typhi*, y su efecto adyuvante sobre la respuesta de Ab's.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar la capacidad de las porinas, OmpC y OmpF de *S. typhi* de activar células dendríticas mediante la identificación del patrón de citocinas generado por éstas *in vitro*.

2. Observar la maduración de células dendríticas *in vitro* inducida por las porinas de *S. typhi*.

3. Evaluar la capacidad adyuvante de las porinas, OmpC y OmpF de *S. typhi* sobre dos antígenos modelo OVA y HEL *in vivo*.

IX Materiales y biológicos

1. Cepas Bacterianas:

Salmonella enterica serovar Typhi cepa ATCC 9993 (cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC).

Salmonella enterica serovar Typhi cepa STYF 302 (Cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi carente de OmpF).

Salmonella enterica serovar Typhi cepa STYC 171 (Cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhi carente de OmpC).

2. Animales de laboratorio.

Se utilizaron ratones de cepa BALB/c (lty sensible) hembras y machos de 8-10 semanas (Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental UNAM)

3. Biológicos.

Porinas purificadas por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* ATCC 9993.

OmpF purificada por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* STYC 171.

OVA grado VI se obtuvo de SIGMA (# cat. A-2512 lote: 91K7057).

HEL

a. Obtención de los sueros de ratón

Los ratones fueron sangrados por cavidad retroorbital colectando la sangre en tubos microtainer con gel separador (Becton Dickinson).

La sangre se centrifugó a 9739 g; durante 5 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero fue almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.

b. Obtención de monocitos de médula ósea de ratón y su diferenciación a células dendríticas.

Los ratones de la cepa BALB/c se sacrificaron mediante dislocación cervical y se fijaron a una plantilla para ratón y se obtuvieron los fémures. En la campana de seguridad biológica se lavaron los fémures con alcohol al 70% durante 10 segundos y posteriormente 3 veces con PBS. Se cortaron los extremos de cada fémur dejando un canal para eluir la médula ósea empleando 2.5 mL de medio DMEM suplementado para cada extremo. El eluido se colectó en tubos cónicos estériles de 15 mL y se centrifugó a 112 g/1min./4°C. El sobrenadante de cada tubo se transfirió a otro tubo cónico estéril y se centrifugaron a 112g/10 min./4°C. Se desechó el sobrenadante, se colectaron los botones de los tubos en uno solo y se resuspendió en un volumen final de 6mL con medio adecuado de médula ósea. Se colocó 1 mL de la suspensión celular en cajas para cultivo celular de baja adherencia y se completó a un volumen final de 20mL con medio de médula ósea. Las cajas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 6 días.

Al tercer día se agregó a cada caja 5 mL de medio de médula ósea. Al sexto día se desechó el medio de las cajas y se lavaron 2 veces con 10 mL de PBS frío y se dejaron en hielo con 10 mL de PBS. Se despegaron las células y las suspensiones se colocaron en tubos cónicos estériles de 15 mL los cuales se

centrifugaron a 112g/10 min./4°C. Se desechó el sobrenadante, se colectaron todos los botones en un solo tubo y se resuspendió en DMEM suplementado a un volumen conocido. Se obtuvo el número de células en el hematocitómetro asegurándose que más del 80% del cultivo se encontrara viable. Para obtener el número de células por mL se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células} \times \text{Dilución} \times 10^4 = \text{No. de células / mL}$$

Se colocó en una placa de 6 pozos la cantidad necesaria de suspensión de células para que en cada uno de ellos hubieran 1×10^6 células y se completó el volumen en cada pozo a 2mL con DMEM suplementado. Se incubó toda la noche antes del experimento a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂.

c. Evaluación de la captación de porinas de *S. typhi* por macrófagos derivados de médula ósea.

Se evaluó la captación de porinas de *S. typhi* a MDMO, obtenidas por el método antes descrito, por microscopía confocal.

- Se coloca en un cubreobjetos circular 200,000 MDMO.
- Se dejar toda adherir toda la noche
- Se estimulan las células con porinas 1µg/mL durante 45 min.
- Se lavan (con PBS+SFB 2%) para eliminar las porinas que no fueron internalizadas.
- Se saca el cubreobjetos

- Se lava (con PBS+SFB 2%) para eliminar las porinas que no fueron internalizadas.
- Se fija con formaldehído al 3% por 20 min. a 4°C
- Se lavan (con PBS+SFB 2%) para eliminar las porinas que no fueron internalizadas.
- Se colocan el 1er. Ab dil. 1:100, α Porinas de conejo
- Se incuba 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda
- Se lavan (con PBS+SFB 2%) para eliminar las porinas que no fueron internalizadas.
- Se adiciona el 2º Ab dil. 1:100, α Conejo TRITC (500-600 nm).

4. Evaluación del efecto adyuvante inducida por las Porinas, OmpC y OmpF de *S. typhi*.

a. Esquema de inmunización para OVA y HEL

Grupos de 3 ratones BALB/c hembra de entre 8 y 10 semanas de edad fueron inmunizados vía i.p.

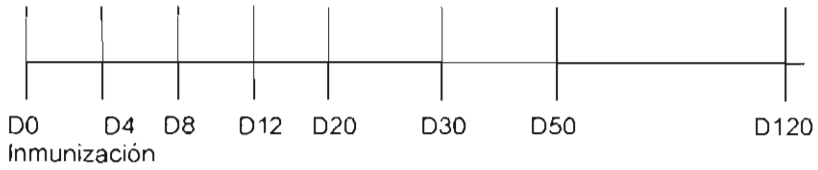
La distribución de los grupos se muestra en el siguiente cuadro.

El volumen final de los antígenos administrados se ajustó a 500 μ L con SSI.

El grupo control de SSI se inoculo con 500 μ L de SSI.

Las muestras de sangre se obtuvieron por sangría retroorbital en los días señalados.

Esquema de inmunización



Sangría

Grupo	Antígeno	Adyuvante
1	OVA (2mg)	Porinas (10µg)
2	OVA (2mg)	OmpC (10µg)
3	OVA (2mg)	OmpF (10µg)
4	OVA (2mg)	FIA
5	OVA (2mg)	FCA
6	OVA (2mg)	LPS <i>E. coli</i> (5µg)
7	OVA (2mg)	-----
8	HEL (1mg)	Porinas (10µg)
9	HEL (1mg)	OmpC (10µg)
10	HEL (1mg)	OmpF (10µg)
11	HEL (1mg)	FIA
12	HEL (1mg)	FCA
13	HEL (1mg)	LPS <i>E. coli</i> (10µg)
14	HEL (1mg)	-----
15	SSI	-----

Cuadro 2. Esquema de inmunización para la respuesta de Ac's . con distintos adyuvantes. IgG contra OVA fig. 11 y 12 e IgG contra HEL fig.13 y 14

b. Determinación del título de anticuerpos anti-OVA y anti-HEL

Las placas para ELISA de 96 pozos se fijaron adicionando 100µL de solución de unión por pozo (15µg de OVA/100µL y 5µg de OmpCr/100µL). Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron cuatro veces con solución de lavado. Posteriormente se bloquearon las placas adicionando a cada pozo 100µL de solución de bloqueo. Se incubaron una hora a 37°C y posteriormente se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

Los sueros a ser analizados se diluyeron 1:20 en solución de bloqueo con un volumen final de 100µL. Se adicionaron 100µL de los sueros diluidos a los primeros pozos de las placas de diluciones, se hicieron diluciones seriadas 1:2 con solución de bloqueo. Los sueros se transfirieron cuantitativamente y en el orden correspondiente a la placa de ELISA previamente sensibilizada. Se incubaron 1 hora a 37°C y al término de ese tiempo se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

Posteriormente se agregaron 100µL del anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón correspondiente, marcado con peroxidasa de rábano diluido 1:1000 en solución de bloqueo. La incubación de las placas se realizó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

El revelado de las placas se realizó adicionando 100µL de solución de revelado a cada pozo. Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente 15 minutos y la reacción se detuvo con 10µL de H₂SO₄ 2.5N por pozo.

La formación de color fue determinada a una longitud de onda de 490nm en un lector de ELISA (Lector para placas de ELISA Dynex Technologies Modelo MRXII). Los resultados se graficaron como título de anticuerpos (-log₂ x 40) vs tiempo. La preparación de las soluciones empleadas se detalla en los anexos I a IV.

5. Producción y caracterización de antígenos.

Las porinas, OmpC y OmpF se obtuvieron por medio del método de Nikaido modificado [86],

La cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Lowry, para evaluar su pureza e integridad se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras, por último la determinación de LPS se realizó por el método modificado de Karkhanis [94]. Las metodologías detalladas de los métodos antes mencionados se describen a continuación.

a. Obtención de la Porina OmpC y OmpF a partir de la cepa STYF302 de *S. typhi*, a través del método de Nikaido modificado. [87]

Se cultivó *S. typhi* STYF302 en 10 L de medio mínimo A (70g K₂HPO₄, 30g KH₂PO₄, 10g (NH₄)₂SO₄, 5g citrato de sodio, 10g extracto de levadura, 50g glucosa, 0.1% MgSO₄) hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 540 nm que corresponde a la fase logarítmica tardía del crecimiento de la bacteria. Se cosechó

centrifugando a 9500g/15 minutos a 4°C, y se lavó 2 veces con una solución de Tris-HCl 0.05M (pH 7.7). La pastilla bacteriana se pesó y se resuspendió en solución de Tris-Cl 0.05M (pH 7.7) hasta obtener 50 mL de suspensión bacteriana. Se rompió la bacteria en un molino Dyno-mill y la suspensión se centrifugó a 9500g/30 minutos a 4°C .

El sobrenadante se retiró y se trató con 25µL de DNAsa 10000 U/mL y 25µL de RNAsa 10000 U/mL y 2.77 mL de solución de MgCl₂ 1M por cada 10g de biomasa húmeda obtenida de la cosecha, por 30 minutos a 37°C 12.2g para eliminar el DNA y RNA.

Se ultracentrifugó a 203,347g durante 45 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 100ml de solución de Tris HCl-SDS 2%, se incubó 30 minutos a 32°C 12.2g y se ultracentrifugó a 160,669g, 30 minutos a 20°C. El botón resultante se resuspendió en 25 mL de solución de Tris HCl-SDS 2%, se incubó nuevamente por 30 minutos a 32°C 12.2g y se ultracentrifugó a 160.669g 30 minutos 20°C. El botón se resuspendió en 20 mL de amortiguador de Nikaido SDS 1% (Tris 0.05M, NaCl 0.4M, EDTA 0.005M) pH 7.7. Se incubó 2 horas a 37°C 12.2g y se ultracentrifugó a 160,669g/45 minutos a 20°C. Se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante se purificó en una columna de Sephacryl S-200 (XK100 Pharmacia) a un flujo de 5mL/min con amortiguador de Nikaido SDS 0.5% pH 7.7. Se colectó el primer pico obtenido en el cromatograma y se dializó en PBS pH 7.2 durante 4 días para eliminar el SDS.

b. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry [88]

La cantidad de proteína obtenida de la producción de OmpCr se cuantificó por el método de Lowry para ello se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) 0.05 – 0.60 mg/mL. Se tomó 0.1mL de la solución de proteína respectivamente y se precipitaron con 20µL de ácido tricloroacético al 72%, se centrifugaron a 16085g, por 30 minutos y después, con mucho cuidado, se decantó el sobrenadante.

Se adicionaron 200µL de NaOH 0.5N y se hirvieron por 10 minutos. Se adicionó 1mL de una solución de Na₂CO₃ al 2%, CuSO₄ al 0.01% y tartato de sodio al 0.01%, y 100µL de reactivo de Follin-Cicalteau 1N, se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. La lectura de la formación de color se realizó a 750nm. El cálculo de la concentración de proteínas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{mg / mL de proteina} = 1.751 Z (100 - \%H) (\%N_2) / (0.2802 V R) \quad \text{donde:}$$

Z = cantidad de µg de ABS de la interpolación de la DO de cada una de las muestras con la curva patrón.

%H = porcentaje de humedad de la ABS.

%N₂ = porcentaje de nitrógeno de la ABS.

V = Volumen de la muestra problema en µL.

R = JK

J = factor de corrección del porcentaje de humedad.

K = factor de corrección del porcentaje de nitrógeno.

c. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

La SDS-PAGE de proteínas se efectuó de acuerdo al método de Laemmli en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Biorad) y sistemas de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.2% de acrilamida, 0.32% de bis-acrilamida, 0.10% de SDS en amortiguador de tris-HCl 0.35 M pH 8.8. El gel introductor contenía 4.2% de acrilamida, 0.12% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 m pH 6.8 que contenía SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. Las muestras se analizaron en condiciones reductoras y no reductoras. Para las condiciones reductoras, el amortiguador de muestra contenía además (β -mercaptoetanol al 5%. El corrimiento electroforético se llevó a cabo con 10mA en el gel introductor y 15mA en el separador.

d. Determinación de lipopolisacárido por el método de Karkhanis [89]

La cantidad de lipopolisacárido (LPS) contaminante de los antígenos producidos a partir de bacterias se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis. Empleando una curva patrón de KDO (Sigma Co.) de 1-20 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Se tomó la cantidad correspondiente de la solución y se llevó a 500mL con H_2SO_4 0.2N, se hirvió por 30 minutos. Se agregaron 0.25mL de NaAsO_2 2.6N, cuando el color café desapareció se agregó 0.5mL de ácido tiobarbitúrico 0.6% y se hirvió por 15 minutos. Se agregó 1mL de dimetilsulfóxido y se leyó la absorbancia a 548nm. La cantidad de KDO se calculó interpolando la absorbancia de la muestra en la curva patrón.

X Resultados.

1. Las porinas de *S. typhi* pueden ser captadas por macrófagos *in vitro*.

Para empezar a estudiar la interacción de la porinas con los componentes del sistema inmune innato se estudió la capacidad que tienen los macrófagos derivados de médula ósea de captar estas proteínas.

Se estimularon MDMO con 1µg/mL, posteriormente se pusieron en evidencia las porinas captadas utilizando un anticuerpo anti-porinas de conejo y un segundo anticuerpo anti-conejo marcado con TRITC, las muestras se analizaron por microscopia confocal.

En las células que fueron estimuladas se observa una gran cantidad de fluorescencia en color rojo correspondiente a las porinas que fueron captadas por la célula, en comparación con las células que no fueron tratadas con porinas, sin embargo, en las células sin tratamiento también se pudo observar la presencia de fluorescencia, esto debido a la unión inespecífico del anticuerpo, a pesar de este fenómeno, la fluorescencia observada en las células estimuladas es mucho mayor lo cual nos indica que además del la unión inespecífico las porinas si se encuentran en la célula.

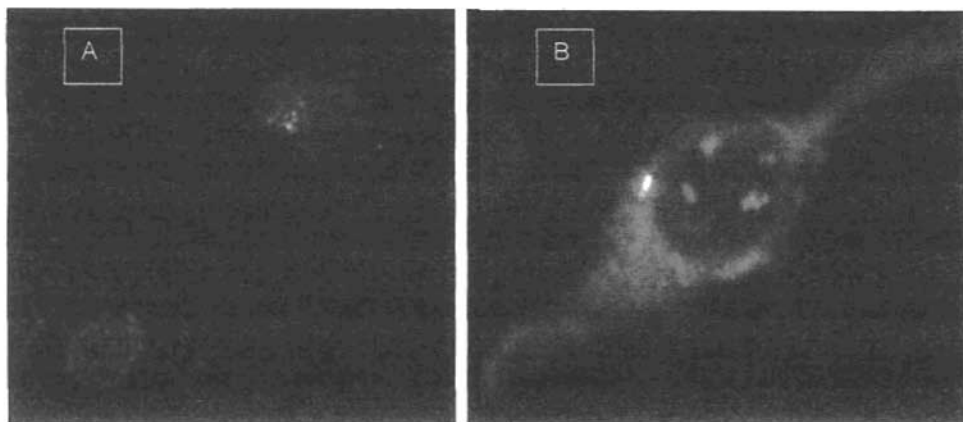
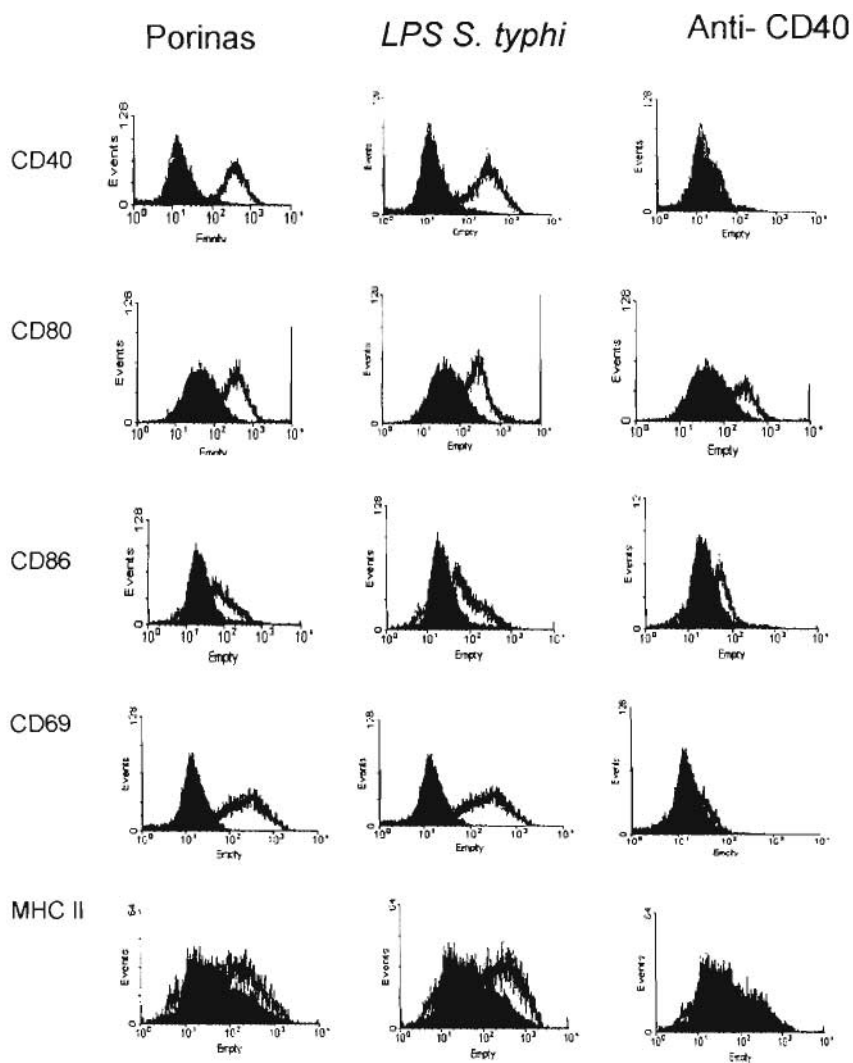


Figura 8(A) y 9(B). Los MDMO son capaces de captar porinas de *S. typhi* *in vitro*. Se estimularon 1×10^6 macrófagos derivadas de médula ósea de ratón con $1 \mu\text{g/mL}$ de porinas, por 45 minutos, posteriormente se cosecharon las células y se tiñeron utilizando un anticuerpo primario anti-porinas hecho en conejo y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti conejo marcado con TRITC, para su análisis por microscopía confocal. a) MDMO sin estimular, b) MDMO estimuladas con porinas durante 45min.

2. Las porinas de *S. typhi* son capaces de activar células dendríticas induciendo su maduración *in vitro*.

Cómo se mencionó en la introducción, una de las características que distinguen a los PAMPs como tales es su capacidad adyuvante, y una de las formas de evaluar dicha capacidad es por medio del aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Por lo cual se diseñó un experimento en el cual se colocaron células dendríticas de médula ósea de ratones Balb/C y se estimularon con porinas, LPS y anti-CD40, los últimos dos como controles de maduración, después de 12h de estímulo se buscaron diferentes marcadores: CD80, CD86(Coestimulación), CD40, CD69(activación), MHC clase II. Estos marcadores se midieron por citometría de flujo.



En 10,000 eventos

Figura 10: Se estimularon 1×10^6 células dendríticas derivadas de médula ósea con $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de porinas, 500ng de LPS de *S. typhi* o anti-CD40 durante 12h posteriormente se cosecharon las células y se tiñeron para su análisis por citometría de flujo, se tomaron para este las células CD11c positivas, se midieron los siguientes marcadores en las mismas CD40, CD80, CD86, clase II, todos estos marcados con FITC.

Cómo podemos observar en los histogramas las porinas son capaces de inducir la maduración de células dendríticas *in vitro*, es decir aumento en las moléculas coestimuladoras, y de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II, el hecho de que las células dendríticas estén madurando nos indica que hay una mayor capacidad de la mismas de presentar antígeno y por lo tanto inducir respuestas mas efectivas, también se puede observar que hubo un aumento de CD40 molécula esencial en la interacción de las células presentadoras de antígeno con células T, lo cual nos indicaría de forma indirecta, que las porinas están activando a estas células y que esta activación podría generar un ambiente adecuado de citocinas ideal para el cambio de isotipo y la generación de una respuesta inmune humoral adecuada.

El aumento en las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 nos indica que las porinas podrían estarse comportando como un adyuvante ya que es una característica de estas sustancias el inducir la sobre expresión de estos dos marcadores para inducir una mejor respuesta inmune, es decir de mayor intensidad y con una mayor duración.

Al comparar con los grupos control, se puede observar que las porinas inducen una mayor expresión de CD69 que el LPS *S. typhi* y una menor expresión de CD80 lo cual nos indica que las porinas inducen un estímulo diferente al inducido por el LPS. En el caso del anticuerpo anti-CD40 se comprobó lo reportado en la literatura, al estimular vía CD40 se produce un aumento en las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, lo cual nos indica que el sistema funciona de manera eficiente.

3. Las porinas tienen efecto adyuvante sobre la respuesta inmune de anticuerpos inducida por antígenos modelo.

En el experimento anterior se observó que las porinas inducen la sobre expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), lo cual está relacionado con la capacidad adyuvante que tienen los PAMPs, sin embargo para comprobar el hecho de que las porinas de *S. typhi* realmente estén actuando como tal se probó un sistema *in vivo*. Se inmunizaron grupos de tres ratones con dos antígenos modelo OVA o HEL los cuales se sabe que son débilmente inmunogénicos y que se necesitan dosis muy altas de los mismos para inducir una respuesta de anticuerpos,.

La inmunización se llevó a cabo del día 0 por vía intraperitoneal y se obtuvo sangre de los animales de la cavidad retro orbital los días 0,4,8,12,20,30,90 y 120, posteriormente se obtuvo el suero y se almacenó a -20°C para su análisis por el método de ELISA.

Se realizaron mediciones de anticuerpo contra HEL u OVA de clase IgG respectivamente, obteniéndose los siguientes resultados.

Inducción de anticuerpos anti OVA de clase IgG

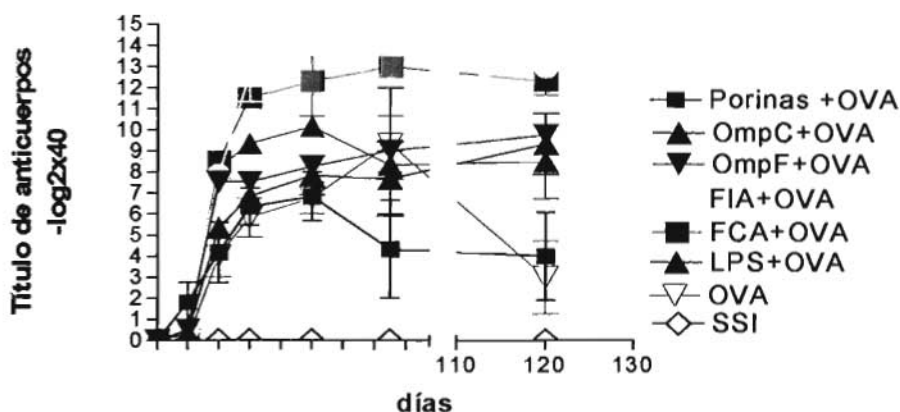


FIG 11. Evaluación del efecto adyuvante de las porinas en la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgG contra OVA. Se inmunizaron grupos de 3 ratones BALB/c, con distintos adyuvantes mas OVA, se realizaron sangrías en los días indicados. los sueros fueron analizados por ELISA.

Efecto adyuvante sobre OVA d 120

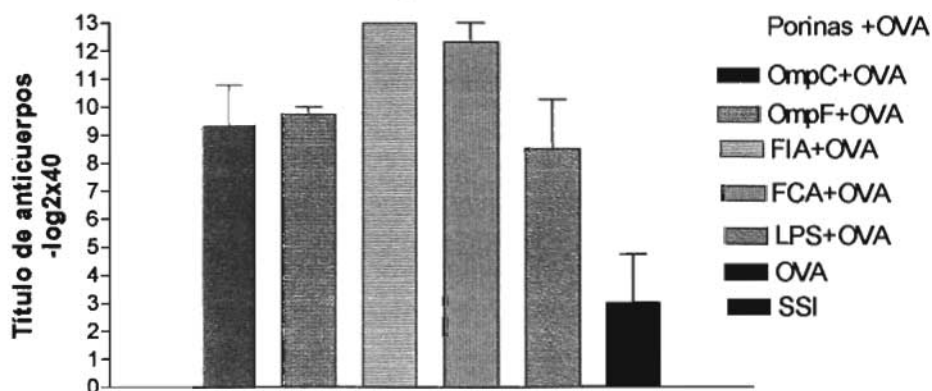


FIG. 12. Evaluación del efecto adyuvante de las porinas en la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgG contra OVA. Se inmunizaron grupos de 3 ratones BALB/c, con distintos adyuvantes mas OVA, se realizaron sangrías en los días indicados. los sueros fueron analizados por ELISA.

Al evaluar el efecto adyuvante de las Porinas, OmpC y OmpF sobre OVA podemos observar que al día 8 la única de estas capaz de inducir un efecto adyuvante muy importante es OmpF, este efecto adyuvante de la misma intensidad por el inducido por el FCA, nuestro control positivo de grupo, a este día; sin embargo este efecto se pierde en el día doce y no encontramos efecto adyuvante de nuevo sino hasta el día 120 en el cual podemos observar que OmpC y OmpF inducen este efecto, a diferencia de las porinas que no lo inducen, este fenómeno es muy importante, debido a que sabemos que muchos de los antígenos modelo como OVA inducen una respuesta de anticuerpos de corta duración, en este caso podemos observar que títulos alrededor de 3, sin embargo OmpC y OmpF son capaces de potenciar esta respuesta a días tardíos, lo cual nos indica que su actividad como adyuvantes no sólo están aumentando la intensidad de la respuesta sino probablemente también aumentando su duración.

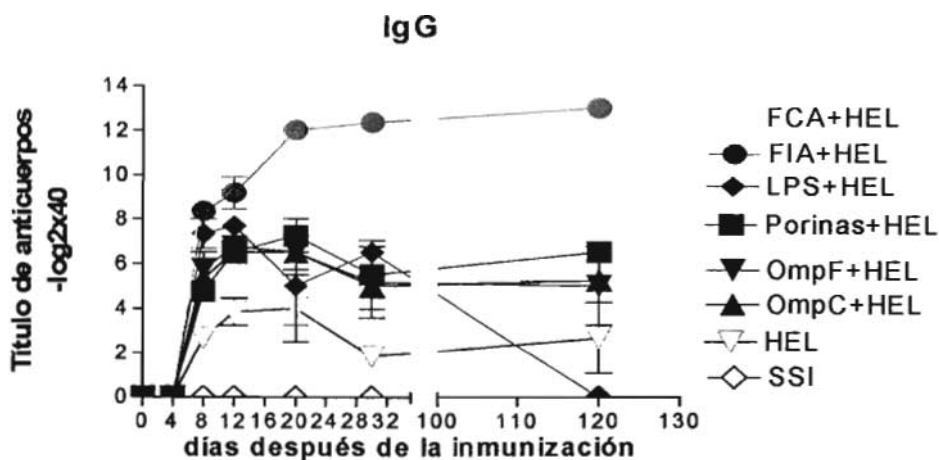


FIG. 13. Evaluación del efecto adyuvante de las porinas en la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgG contra HEL. Se inmunizaron grupos de 3 ratones BALB/c con distintos adyuvantes mas HEL, se realizaron sangrías en los días indicados. Los sueros fueron analizados por ELISA.

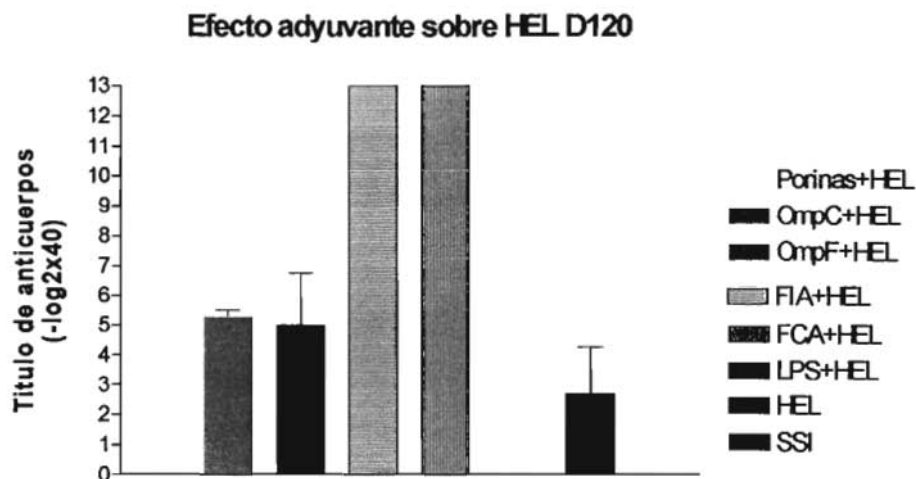


FIG. 14 Evaluación del efecto adyuvante de las porinas en la respuesta inmune de anticuerpos de clase IgG contra HEL. Se inmunizaron grupos de 3 ratones BALB/c con distintos adyuvantes mas HEL, se realizaron sangrías en los días indicados. Los sueros fueron analizados por ELISA.

XI Análisis de Resultados.

En el presente trabajo se reporta la activación de algunos componentes del sistema inmune innato inducida por las porinas de *Salmonella typhi*. Se habían realizado estudios en el laboratorio en los cuales se describía la capacidad de estas proteínas como fuertes inductoras de una respuesta inmune humoral de larga duración, y que los anticuerpos generados tenían capacidad bactericida, por otro lado, se describió, que estas proteínas son capaces de inducir protección de ratones hasta contra 500DL₅₀ de *S. typhi* por lo cual en este trabajo lo primero que se hizo fue ver si las porinas eran capaces de ser captadas por células del sistema inmune innato en este caso MDMO, y se observó que efectivamente estas células son capaces de captarlos, el tipo de tinción que se manejó en esta prueba (tinción simple) no se puede saber si las porinas se encuentran dentro o fuera de la célula o si se encuentran en una vesícula, por lo cual, sería necesario realizar una tinción doble con algún marcador de membrana o de alguna vesícula para poder observar la localización de éstas.

Una vez que se caracterizó que las porinas de *S. typhi* podían ser captadas por células de la respuesta inmune innata, la siguiente pregunta a responder es,

si estas proteínas son capaces de activar a los macrófagos, una de las formas por las cuales se puede observar esta activación es, mediante la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras, estas moléculas son de gran importancia en la presentación de antígeno a los linfocitos T para la generación de una respuesta inmune adecuada, se sabe que la señalización a través de algunos PRR's conlleva al aumento de este tipo de moléculas, dados los resultados obtenidos se observa que las porinas son capaces de inducir un aumento en este

tipo de moléculas (CD80, CD86 y CD40) además de inducir la sobreexpresión de moléculas del MHC II y de un marcador de activación temprana CD69, un punto importante a aclarar en estos resultados es el hecho de que la activación inducida por las porinas es similar a la que genera el LPS de *S. typhi* sin embargo la cantidad de LPS que contienen las porinas es 0.02% de las mismas, tomando en cuenta las condiciones en que se realizó el experimento (1µg/mL y un total de 10mL por placa) las células solamente entraron en contacto con 2ng de LPS mientras que en el control había 1µg de LPS en total, por lo cual la cantidad de LPS que existía en las porinas es despreciable, sin embargo sería adecuado estimular las células con una cantidad equivalente a la contenida por las porinas para que la comparación de la activación fuera válida; estos hallazgos nos llevan a pensar que las porinas se están comportando como un PAMP's debido a que el aumento de estas moléculas, es un indicio de su unión a PRR's, por otra parte dada la importancia de la coestimulación para la generación de una respuesta adecuada, se han denominado a las moléculas capaces de inducir el aumento de las mismas como adyuvantes por lo cual tomando en cuenta este criterio las porinas tienen propiedades adyuvantes característica intrínseca de los PAMPs, sin embargo era importante poner de manifiesto esta característica no solamente en la interacción de las células presentadoras de antígeno y el linfocito T, sino en un contexto general es decir *in vivo* por lo que las porinas, OmpC y OmpF, fueron utilizadas como adyuvantes sobre la respuesta inmune humoral de dos antígenos modelo poco inmunogénicos OVA y HEL, se observó que las porinas OmpC y OmpF son capaces de inducir un aumento en la respuesta de IgG inducida por ambas

proteínas aun en una respuesta de memoria al día 120, aunque esta respuesta es menor a la inducida por los adyuvantes completo e incompleto de Freund, sin embargo hay que tomar en cuenta que estos adyuvantes son una mezcla de lisado de micobacterias y aceite mineral, lo cual genera una alta respuesta inflamatoria, mientras que las porinas son antígenos solubles y únicamente se administraron 10 μ g por ratón en comparación de los 2mg de OVA y 1.5mg de HEL utilizados para obtener respuesta, esta diferencia de concentraciones administradas nos habla de que las porinas tienen una alta eficiencia como inmunoestimuladores, además de estos resultados nos hablan de que no solamente son reconocidas por el sistema inmune innato *in vitro* sino también *in vivo* lo cual les da una gran importancia biológica.

Con todos estos resultados y los antecedentes que indican la inducción de una respuesta inmune humoral de larga duración, podemos decir que las porinas están siendo reconocidas tanto por el sistema inmune innato como por el adaptativo, y que probablemente esta característica sea, la que les confiera su capacidad protectora y de inducir memoria, estas dos cualidades apoyan el uso de estas proteínas en el desarrollo de una nueva vacuna contra la fiebre tifoidea.

Por otra parte el hecho de que estén siendo reconocidas por el sistema inmune innato y con las evidencias mencionadas anteriormente nos da la posibilidad de utilizar a las porinas como adyuvantes para el desarrollo de nuevas vacunas así como el mejoramiento de vacunas ya existentes que no inducen una respuesta de memoria. Utilizando una vacuna de tipo Porinas-Vi.

XII CONCLUSIONES

- Las porinas son capaces de activar a las células de la respuesta inmune innata.
- Las porinas de *S. typhi*, pueden inducir un efecto adyuvante en la respuesta humoral contra un antígeno modelo.
- Las porinas presentan características de Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's); entonces probablemente podremos usarlo como adyuvante.
- Las porinas son adyuvantes en la respuesta de anticuerpos contra un antígeno modelo.
- Las porinas presentan propiedades adyuvantes intrínsecas.

XIII PERSPECTIVAS DE TRABAJO

- Se sabe que porinas de otros microorganismos señalizan a través de TLR-2 y TLR-4, por lo que es importante conocer las porinas de *S. typhi* interaccionan con algún TLR.
- Estudiar la activación de DC, macrófagos y linfocitos B *in vivo*.
- Estudiar la capacidad adyuvante de las porinas sobre una vacuna, que ya se encuentra en uso el antígeno Vi, utilizando un conjugado de Porinas-Vi.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

XIV BIBLIOGRAFIA

- [1] Gil Cruz Cristina del Carmen. (2004). Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de la Porina *Omp-C* de *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHI.
- [2] Silva Sanchez Aarón . (2004). Estudio De la capacidad adyucante del virus de mosaico de la papaya (PapMV).
- [3] Pérez Flores Rebeca. (2005). Estudio de los mecanismos de la resistencia innata inducidos por el virus de mosaico de la papaya (PapMV).
- [4] Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* 2004;40(12):845-59.
- [5] Germain RN. An innately interesting decade of research in immunology. *Nat.Med.* 2004;10(12):1307-20.
- [6] Verghese MW, Snyderman R. Endotoxin (LPS) stimulates in vitro migration of macrophages from LPS-resistant mice but not from LPS-sensitive mice. *J.Immunol.* 1982;128(2):608-13.
- [7] Fang F. C. & Vazquez-Torres A. (2002) Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **282**, L941-L943.
- [8] Imber MJ, Pizzo SV, Johnson WJ, Adams DO. Selective diminution of the binding of mannose by murine macrophages in the late stages of activation. *J.Biol.Chem.* 1982;257(9):5129-35.
- [9] Chang JH, Ryang YS, Morio T, Lee SK, Chang EJ. *Trichomonas vaginalis* inhibits proinflammatory cytokine production in macrophages by suppressing NF-kappaB activation. *Mol.Cells* 2004;18(2):177-85.
- [10] Chattergoon MA, Robinson TM, Boyer JD, Weiner DB. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J.Immunol.* 1998;160(12):5707-18.
- [11] Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2004;22:33-54.
- [12] Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 2004;21(2):279-88.

- [13] Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat.Rev.Immunol.* 2004;4(6):432-44.
- [14] Germain RN. An innately interesting decade of research in immunology. *Nat.Med.* 2004;10(12):1307-20.
- [15] Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat.Immunol.* 2004;5(12):1219-26.
- [16] Beutler B. Not "molecular patterns" but molecules. *Immunity.* 2003;19(2):155-6.
- [17] Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 2002;20:197-216.
- [18] Underhill DM, Gantner B. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes.Infect.* 2004;6(15):1368-73.
- [19] Henneke P, Golenbock DT. Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity. *J.Exp.Med.* 2004;199(1):1-4.
- [20] Henneke P, Golenbock DT. Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity. *J.Exp.Med.* 2004;199(1):1-4.
- [21] McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol.Immunol.* 2004;41(11):1109-21.
- [22] Henneke P, Golenbock DT. Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity. *J.Exp.Med.* 2004;199(1):1-4.
- [23] Presanis J.S., Kojima M., & Sim R.B. (2003) Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochem.Soc.Trans.* **31**, 748-752.
- [24] Janeway CA, Jr.(2002) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91(3):197-216.
- [25] Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr.Opin.Microbiol.* 2004;7(1):25-32.
- [26] Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol.Immunol.* 2004;41(11):1099-108.
- [27] Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52(2):269-79.

- [28] Keith FJ, Gay NJ. The Drosophila membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J.* 1990;9(13):4299-306.
- [29] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-7.
- [30] Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;430(6996):257-63.
- [31] McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol.Immunol.* 2004;41(11):1109-21.
- [32] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 2005;17(1):1-14.
- [33] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2001;2(8):675-80.
- [34] Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol.Rev.* 2004;199:227-50.
- [35] Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004;21(3):401-13.
- [36] Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav.Immun.* 2004;18(1):7-12.
- [37] Nguyen VT, Walker WS, Benveniste EN. Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta. *Eur.J.Immunol.* 1998;28(8):2537-48.
- [38] Benvenuti F, Lagaudriere-Gesbert C, Grandjean I, et al. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J.Immunol.* 2004;172(1):292-301.
- [39] Grewal I.S. & Flavell R.A. (1996) The role of CD40 ligand in coestimulation and T-cell activation. *Immunol.Rev* **153**, 85-106.
- [40] Roosnek E., Demetz S., Corradin G., & Lanzavecchia A. (1988) Kinetics of MHC-antigen complex formation on antigen-presenting cells.

- [41] Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., & Salluso F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* **1**, 311-316.
- [42] Salluso F., Lanzavecchia A & Mackay C.R. (1988) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and TH1/TH2-mediated responses *Immunol.Today* **19**, 568-574.
- [43] Sela M. (1969) Antigenicity: some molecular aspects. *Science* **166**, 1365-74.
- [44] Grewal I.S. & Flavell R.A. (1996) The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol.Rev.* **153**, 85-106.
- [45] Parker D.C. (1993) The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin.Immunol.* **5**, 413-420.
- [46] Parker D.C. (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu.Rev.Immunol.* **11**, 331-360.
- [47] Tangye, S. G., Ferguson, A., Avery, D. T., Ma, C. S., and Hodgkin, P. D. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J.Immunol.* 169(8), 4298-4306. 15-10-2002.
- [48] William E.Paul. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins. 5th. 2003. Philadelphia.
- [49] Marciari DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov.Today* 2003;8(20):934-43.
- [50] Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm.Res.* 2002;19(6):715-28.
- [51] O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2003;2(9):727-35.
- [52] Singh, M. and O'Hagan, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm.Res.* 19(6), 715-728. 2002.
- [53] Acosta-Ramírez, E.C. Evaluación de la capacidad inmunogénica del virus del mosaico de la papaya. 2003;
- [54] Peppoloni S, Ruggiero P, Contomi M, et al. Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines. *Expert.Rev.Vaccines.* 2003;2(2):285-93.
- [55] Rappuoli R, Pizza M, Douce G, Dougan G. Structure and mucosal adjuvant activity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins. *Immunol.Today* 1999;20(11):493-500.

- [56] Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov.Today* 2003;8(20):934-43.
- [57] da Silva Correia J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. *J.Biol.Chem.* 2001;276:21129-35.
- [58] Re F, Strominger JL. Monomeric recombinant MD-2 binds toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J.Biol.Chem.* 2002;277:23427-32.
- [59] Johnson DA, Keegan DS, Sowell CG, et al. 3-O-Desacyl monophosphoryl lipid A derivatives: synthesis and immunostimulant activities. *J.Med.Chem.* 1999;42(22):4640-9.
- [60] Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K. Activation of macrophages by linear (1→3)-β-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J.Biol.Chem.* 2002;277(39):36825-31.
- [61] Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvickova J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* 1999;42(1-3):61-74.
- [62] Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov.Today* 2003;8(20):934-43.
- [63] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2001;2(8):675-80.
- [64] Yu D, Kandimalla ER, Cong Y, et al. Design, synthesis, and immunostimulatory properties of CpG DNAs containing alkyl-linker substitutions: role of nucleosides in the flanking sequences. *J.Med.Chem.* 2002;45(20):4540-8.
- [65] Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J.Immunol.* 2001;166(4):2372-7.
- [66] Maurer T, Heit A, Hochrein H, et al. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2002;32(8):2356-64.
- [67] Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K. CpG DNA in the prevention and treatment of infections. *BioDrugs.* 2002;16(6):419-31.
- [68] www.brunel.ac.uk/depts/bl/project/.../gramnegi.htm . 2002.
- [69] Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J.Biol.Chem.* 1994;269(6):3905-8.

- [70] Puente JL, Verdugo-Rodriguez A, Calva E. Expression of Salmonella typhi and Escherichia coli OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on Escherichia coli OmpR. *Mol. Microbiol* 1991;5(5):1205-10.
- [71] http://medical.faculty.ncl.ac.uk/biomed/sbg/HomePages/HomePage?HomePageID=Lakey_JH. 2000. (GENERIC) Ref Type: Electronic Citation
- [72] Neidhardt, F.C.E. **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. second. ASM Press. 1996; 1.
- [73] Gilleland HE, Jr., Gilleland LB, Matthews-Greer JM. Outer membrane protein F preparation of Pseudomonas aeruginosa as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* 1988;56(5):1017-22.
- [74] Rauly I, Goetsch L, Haeuw JF, et al. Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of Klebsiella pneumoniae. *Infect. Immun.* 1999;67(11):5547-51.
- [75] Galdiero M, Vitiello M, Galdiero S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;226(1):57-64.
- [76] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001;2(8):675-80.
- [77] Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* 2002;168(4):1533-7.
- [78] Galdiero M, Vitiello M, Galdiero S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;226(1):57-64.
- [79] Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D.T., & Wetzler, L.M. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* **168**, 1533-1537 (2002).
- [80] Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, et al. Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 1992;10(12):811-3.
- [81] Blanco F, Isibasi A, Raul GC, et al. Human cell mediated immunity to porins from Salmonella typhi. *Scand. J. Infect. Dis.* 1993;25(1):73-80.

- [82] Rosa María Salazar-González CM-BJCNCJAP-AMCCL-MaAl. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella typhi* Bactericidal Antibodies in human volunteers by immunization with strain specific Porins. Accepted for publication Immunol Letters 2003;
- [83] Isibasi,A., Paniagua,J., Rojo,M.P., Martin,N., Ramirez,G., Gonzalez,C.R., Lopez-Macias,C., Sanchez,J., Kumate,J., & Ortiz-Navarrete,V. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **730**, 350-352 (1994).
- [84] Secundino Vazquez I., López MaciasC., Cervantes Barragán L., Gil-Cruz Cristina,; Rios Sarabia N. Pastelín Palacios R,; *Salmonella* porins induce a sustained life-long specific bactericidal antibody monomery response. *Immunology* 17-17,2005. En prensa.
- [85] Gil-Cruz C. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serova Typhi. 2004. Centro Médico Nacional S.XXI, Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.
- [86] Nikaido,H. Isolation of outer membranes. *Methods Enzymol.* **235**, 225-234 (1994).
- [87] Clifford M.Snapper and Fred D.Finkelman in *Fundamental Immunology*, Edn. 4. ed. William E.Paul 831-862 (Liippincott-Raven,1999).
- [88] Lowry,O.H., Rosebrough,N.H., Farr,A.L., & Randall,R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- [89] Karkhanis,Y.D., Zeltner,J.Y., Jackson,J.J., & Carlo,D.J. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* **85**, 595-601 (1978).