

00524
146



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INFLUENCIA DE LAS MODIFICACIONES
ESTRUCTURALES DEL LÍPIDO A DEL
LIPOPOLISACARIDO DE *Salmonella typhimurium*
SOBRE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS
ANTIGENO ESPECÍFICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARICELA RAMÍREZ SALDÑA



MEXICO, D.F.



EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



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.

JURADO

Presidente: Profr. Mónica Berenice Heras Chavarría.

Vocal: Profr. Armando Isibasi Araujo.

Secretario: Profr. Constantino III Roberto López Macías.

1er. Suplente: Profr. Sonia Mayra Pérez Tapia.

2o. Suplente: Profr. Rodolfo Pastelin Palacios.

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

M. en C. Rodolfo Pastelin Palacios
SUPERVISOR TÉCNICO


Maricela Ramírez Saldaña
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

•
El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyecto No. 33137-M. Y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN214302-2 de la UNAM.

Agradezco el fundamental y valioso apoyo para el desarrollo del presente proyecto brindado por el 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.

Agradezco el apoyo brindado por la Dra. Ingebor Becker del laboratorio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al M. en C. Rodolfo Pastelin Palacios por la paciencia, consejos, apoyo, supervisión, corrección de mis errores y la constante transmisión de conocimientos a lo largo del desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Armando Isibasi Araujo por darme la oportunidad de participar en este trabajo.

Al Dr. Constantino López Macías por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A todos mis amigos gracias por todos los momentos juntos.

A mis maestros gracias por sus enseñanzas.

A mis compañeros del laboratorio gracias por su apoyo.

DEDICATORIA.

A mi Padre y a mi Madre.

Con todo el amor y cariño que mi ser es capaz de dar.

A mis hermanas.

Las quiero.

A José Luis Sánchez Acenjo.

A pesar de todo.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCIÓN.....	5
III. ANTECEDENTES.....	8
• <i>Salmonella</i>	8
• Infección por <i>Salmonella</i>	9
• Respuesta inmune contra <i>Salmonella</i>	10
• Mecanismos de supervivencia de <i>Salmonella</i>	13
• Lipopolisacárido.....	14
• Reconocimiento del LPS.....	18
• Modificaciones estructurales del lípido A.....	20
• Cepas de <i>S. typhimurium</i> con LPS modificado.....	22
V. HIPÓTESIS.....	26
VI. OBJETIVOS.....	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
IX. DISCUSIÓN.....	47
X. CONCLUSIONES.....	56
XI. REFERENCIAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BCR	Receptor del Linfocito B
CAMP	Péptidos Catiónicos Antimicrobianos
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
IFN-γ	Intereferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i. p.	Intraperitoneal
KDO	Ácido 3-desoxi-2-octulosóico
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolisácarido
LT	Ácidos Lipoteicoicos
NaOH	Hidróxido de sodio
OPD	o-fenilendiamina
OVA	Ovoalbúmina
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PG	Péptido Glicano

PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrón
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
pH	Potencial de H⁺
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SAC	Solución Amortiguadora de Carbonatos
SBC	Solución Amortiguadora de Citratos
SSI	Solución Salina Isotónica
SPF	Libre de Patógenos Específicos
TCR	Receptor de Linfocito T
TLRs	Receptores similares a Toll
TLR2	Receptor 2 similares a Toll
TLR4	Receptor 4 similares a Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

I. RESUMEN

Salmonella typhimurium causa una infección sistémica en ratones similar a la fiebre tifoidea humana por lo cual se utiliza como modelo experimental para estudiar tanto los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *Salmonella* como la respuesta inmune involucrada en la protección contra estos microorganismos. Al ingresar al hospedero, *Salmonella* induce respuestas específicas del sistema inmune, pero también activa sus mecanismos de virulencia, para resistir la defensa del organismo. Una de las múltiples estrategias utilizadas por *Salmonella* es la activación de genes que codifican para enzimas que le permiten modificar el lípido A de su lipopolisacárido (LPS). Como consecuencia de estos cambios, *Salmonella* combate la respuesta inmune innata a través de adquirir resistencia a los péptidos catiónicos antimicrobianos, inhibiendo parcialmente la expresión de E-selectina en células endoteliales, lo que evitaría el reclutamiento de linfocitos al sitio de la infección, además induciendo una menor secreción de TNF- α en monocitos por lo que se disminuye el estímulo inflamatorio. Sin embargo, no se han estudiado los efectos de estas modificaciones estructurales del LPS sobre la respuesta inmune adaptativa como la respuesta de anticuerpos, por lo cual en este trabajo se estudió la influencia de las modificaciones en la estructura del lípido A del LPS de *Salmonella typhimurium* en la producción de anticuerpos. La co-inmunización de Ovoalbúmina (OVA) y LPS induce un incremento en la respuesta de anticuerpos, sin embargo, el LPS que presenta la adición de aminoarabinosa al lípido A disminuye parcialmente y en los primeros días los títulos de anticuerpos de clase IgG contra OVA con respecto a la respuesta inducida por LPS de la cepa silvestre.

II. INTRODUCCIÓN

En la inmunidad contra las infecciones participan tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa. La inmunidad innata utiliza receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para identificar diversas moléculas especialmente de microorganismos las cuales se les identifica de manera general como patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) ^{1,2}. Los PAMPs al ser reconocidos por los PRRs inducen la activación de la célula que tiene como consecuencia el inicio de la respuesta inmune contra el patógeno.

Se conocen diferentes PAMPs, entre los cuales están el lipopolisacárido (LPS), los ácidos lipoteicoicos (LT), la peptidoglicana (PG) de bacterias Gram-positivas, la lipoarabinomanana (LAM) de *Mycobacterium*, la flagelina, las CpGs no metiladas, y el RNA de doble cadena, siendo el LPS el más estudiado ^{1,3}. El LPS es la endotoxina de las bacterias Gram negativas y está ubicado en la membrana externa de las bacterias. Generalmente los lipopolisacáridos bacterianos consisten en un dominio hidrofóbico conocido como lípido A, un oligosacárido constante o "core" y un polisacárido distal (o antígeno O)⁴. Durante la infección por *S. typhimurium*, la bacteria es capaz de modificar el lípido A de su LPS sin embargo, no se han estudiado los efectos que estos cambios pueden ejercer sobre la respuesta inmune adaptativa.

En la inmunidad adaptativa, la protección esta dada principalmente por los linfocitos B para la producción de anticuerpos y de los linfocitos T para la

producción de interleucinas y perforinas, de esta manera el sistema inmune adaptativo es capaz de reconocer a los microorganismos patógenos y actuar en contra de éstos y de sus productos. La consecuencia de la activación y acción del sistema inmune es el control de los patógenos y de sus efectos nocivos.

Las células del sistema inmune adaptativo cuentan con receptores que reconocen antígenos de manera específica. Los linfocitos B cuentan con la inmunoglobulina de superficie (Igs) como receptor conocido como BCR para el reconocimiento del antígeno, en tanto que los linfocitos T cuentan con el receptor de linfocito T (TCR). El repertorio de estos receptores es muy amplio de tal forma que le permite al sistema inmune reconocer a un gran número de antígenos ⁵.

Los patógenos al ingresar al organismo activan al sistema inmune al ser reconocidos por los receptores presentes en las células del hospedero^{2,6}. En respuesta a la acción del sistema inmune, los microorganismos patógenos se defienden activando sus mecanismos de patogenicidad y virulencia ^{7,8}. En el caso de *S. typhimurium* uno de los múltiples mecanismos de virulencia que se activa es la modificación del Lípido A del LPS. Algunas modificaciones estructurales del Lípido A del LPS le confieren a *Salmonella* resistencia a péptidos catiónicos, tales son los casos de la adición de 4-amino-arabinosa y la incorporación de un ácido graso adicional ⁸. Estas modificaciones son reguladas por un sistema de dos componentes PhoP/PhoQ que controla la transcripción de a un grupo de aproximadamente 40 genes implicados en la síntesis de proteínas requeridas para la virulencia y supervivencia de *Salmonella* dentro de macrófagos ^{9,10}. El sistema

regulador PhoP/PhoQ juega un papel importante en la resistencia a efectores de la respuesta inmune innata, sin embargo, se ha visto que en cepas resistentes a polimixina B y a péptidos catiónicos es requerido un segundo sistema de dos componentes PmrA/PmrB el cual es activado por PhoP/PhoQ mediante la proteína PmrD en respuesta a bajas concentraciones de magnesio. Aunque PmrA/PmrB puede ser activado independientemente de PhoP/PhoQ debido a condiciones ácidas o altas concentraciones de hierro ^{7,8,11}.

Se ha reportado que las cepas de *S. typhimurium* PhoP^c inducen menor expresión de E-selectina en células endoteliales y de TNF- α en monocitos (ambos de humanos) comparados con las cepas PhoP⁻ y de tipo silvestre⁸. Sin embargo, no se ha reportado el efecto que ejercen las modificaciones estructurales del lípido A de *S. typhimurium* de estas cepas sobre la respuesta de anticuerpos. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar los efectos de estas modificaciones estructurales en la respuesta de anticuerpos para dos cepas modificadas genéticamente.

Las cepas de *S. typhimurium* JSG 430 tiene como característica ser PhoP constitutiva y PmrA deficiente (PhoP^c y PmrA⁻) lo cual induce la adición de ácido palmítico al lípido A. La cepa JSG 435, es PmrA constitutiva (PmrA^c) que tiene como consecuencia la adición de amino arabinosa en el lípido A. Finalmente se cuenta con la cepa JSG 210 que es de tipo silvestre, como controles contamos con: *S. typhi* tipo silvestre y *E. coli* O111:B4.

III. ANTECEDENTES

- ***Salmonella.***

La clasificación más reciente basada en la similitud entre el DNA clasifica el género *Salmonella* en dos especies *bongori* y *enterica*. Esta última especie se subdivide después en subespecies denominadas por un número romano. La subespecie I conserva aun los nombres anteriores para designar la subespecie así, el nombre de *S. typhimurium* es: *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*¹².

El género *Salmonella enterica* comprende bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que infectan a humanos y animales. Es una especie patógena, intracelular facultativa cuya infección es adquirida por la ingestión, colonización e invasión de la mucosa del intestino delgado¹³.

- ***Salmonella enterica* serovar *Typhimurium***

Salmonella typhimurium es un bacilo no esporulado, Gram-negativo, móvil, con flagelos peritricos mide dos a tres micras, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es lactosa y sacarosa negativos además de producir ácido sulfhídrico¹⁴.

La bacteria tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno "H" o flagelar y el antígeno somático "O" que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica ¹⁵.

- ***Salmonella enterica serovar Typhi***

Salmonella typhi es un bacilo Gram-negativo, móvil, de flagelos peritricos mide dos a tres micras, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos además de producir ácido sulfhídrico ¹⁴.

- **Infección por *Salmonella***

En humanos *Salmonella typhi* es agente causal de la fiebre tifoidea mientras *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*, las cuales pueden ser transmitidas por animales domésticos a humanos, causa en estos últimos gastroenteritis ¹⁶. La fiebre tifoidea es una infección aguda generalizada del sistema retículo-endotelial, tejido linfoide intestinal y vesícula biliar que se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con *Salmonella typhi* ¹⁷. Esta bacteria es un patógeno altamente adaptado al ser humano por lo que no se conocen otros reservorios naturales ¹⁵.

La infección de ratones por *Salmonella typhi* no produce fiebre tifoidea como en el caso de los humanos, sin embargo, *S. typhimurium* es causante de

una infección sistémica en ratones, la cual es similar a la fiebre tifoidea humana por lo cual es utilizada como modelo experimental de la fiebre tifoidea ^{9,13,18}.

Después de la ingestión oral de la bacteria, usualmente mediante comida o agua contaminada, ésta puede viajar a través del tracto digestivo, sobreviviendo al pH bajo del estómago; llega y coloniza el intestino delgado y penetra el epitelio intestinal ¹⁹ hasta alcanzar las placas de Peyer a través de las células M ¹⁶ que son una población de células especializadas asociadas con la captación de antígenos del lumen intestinal ^{19,20}. *Salmonella* es drenada de las placas de Peyer a los nódulos linfáticos mesentéricos donde es distribuida para posteriormente alcanzar la circulación sistémica produciendo una bacteriemia primaria. Las bacterias son rápidamente fagocitadas por el sistema fagocítico mononuclear principalmente en hígado y bazo ¹³. Después de esta etapa pasan de 8 a 14 días en los que la bacteria se reproduce intracelularmente lo que conduce a una bacteriemia secundaria la cual se acompaña del síndrome febril ^{13,15,21}.

- **Respuesta inmune contra *Salmonella***

Después del contacto con la membrana, la internalización de la bacteria ocurre a través de un mecanismo denominado macropinocitosis²². La fagocitosis ocurre rápidamente y es caracterizada por el rearreglo localizado del citoesqueleto y membrana tipo "ruffling". En las células epiteliales el "ruffling" está localizado al área adyacente a la bacteria mientras que en el macrófago es difuso, las bacterias que hacen contacto con la superficie son internalizadas. La fagocitosis de *S.*

typhimurium por macrófagos ocurre a través de un mecanismo de entrada especial que da lugar a la formación de vacuolas grandes conteniendo a la *Salmonella* y son denominados fagosomas gigantes (2-5 μ m) ²².

En el modelo de tifoidea en ratones, el crecimiento de *Salmonella* es controlado en los macrófagos por el gene Nramp1 durante los primeros días de la infección. Nramp1 codifica para una fosfoglicoproteína transmembranal NRAMP1 con actividad de canal de cationes divalentes (Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺) que es rápidamente reclutada por el fagosoma que contiene a la bacteria ^{13,16}. Su función es bombear los cationes del interior hacia el exterior del fagosoma. El Mn²⁺ es un cofactor esencial para ciertas isoformas de la superóxido dismutasa, una enzima que neutraliza a las especies reactivas del oxígeno (ROS) ²³.

La respuesta inmune secundaria contra *Salmonella typhi* esta mediada principalmente por Linfocitos T específicos, que por su perfil principalmente de Th1 producen IFN- γ el cual activa la habilidad de los macrófagos para destruir a la *Salmonella* ²⁴, además regulan la activación y maduración de linfocitos B para la producción de anticuerpos. También participan linfocitos T citotóxicos ya sea para eliminar los macrófagos infectados dejando desprotegida a la bacteria o directamente eliminándola ²⁵.

En años recientes la visión de que la respuesta inmune mediada por anticuerpos protege contra patógenos extracelulares y que la respuesta inmune mediada por células protege contra los patógenos intracelulares, ha sido

modificada. Gracias a los experimentos realizados con *E. chaffensis* la cual tiene una fase extracelular en la cual es presumiblemente sensible a los anticuerpos, se sugiere que otros patógenos intracelulares obligados también pueden tener fases extracelulares durante las cuales son susceptibles a la respuesta inmune humoral²⁶. Los anticuerpos en el lumen intestinal principalmente IgM e IgA bloquean la entrada de la bacteria, probablemente por la inhibición de la adhesión de ésta a las células M y epiteliales²⁷, también la opsonizan para provocar la fagocitosis²⁵.

Los principales agentes antibacteriales son los intermediarios de oxígeno reactivo y los intermediarios de nitrógeno reactivo. Al parecer los fagocitos eliminan a la bacteria con una fase inicial oxidativa dependiente de NADPH oxidasa, seguida de una fase nitrosativa prolongada mediante la cual el crecimiento de la bacteria es inhibido por el producto de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)^{9,16}. Las bacterias en respuesta producen enzimas antioxidantes y sistemas de reparación²⁸ por lo que algunas logran sobrevivir dentro del fagosoma e incluso multiplicarse dentro de él. No se conocen los mecanismos que determinan la muerte o supervivencia de la bacteria dentro del fagocito, sin embargo, la activación de los macrófagos por interferón γ (IFN- γ) o factor de necrosis tumoral α (TNF- α) parece ser un prerrequisito para la destrucción de la bacteria. Las que logran sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos provocan una segunda bacteremia que en casos fatales puede provocar un choque endotóxico y muerte^{13,29}.

El sistema inmune innato en humanos usa una variedad de factores para

destruir bacterias incluyendo productos tóxicos del estallido respiratorio, enzimas bacteriolíticas tales como la lisozima y la fosfolipasa A2; los componentes terminales del sistema del complemento y péptidos antimicrobianos que alteran la membrana citoplásmica de la bacteria ⁷. Los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) son factores de defensa altamente conservados ampliamente distribuidos en plantas y animales³⁰. Los humanos producen varios tipos de CAMPs de los cuales los más importantes son las Defensinas, las Catelicidinas y las Trombocidinas ⁷.

- **Mecanismos de supervivencia de *Salmonella*.**

La *Salmonella* sobrevive por dilución de los compuestos tóxicos lisosomales o atenuación de los factores antimicrobianos, incluyendo inhibición en la acidificación del fagosoma. El primer estadio en la patogenicidad es dependiente de un bloque de 4.0-Kb de genes constituidos por el SPI1 (Isla 1 de genes de patogenicidad de *Salmonella*) ^{9,31}. Muchas de las propiedades que contribuyen a la supervivencia intracelular de *Salmonella* e inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes son controladas por el sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ ^{9,31}. PhoQ es una proteína integral de la membrana con actividad de histidina-cinasa que responde a señales transfiriendo fosfatos a un residuo conservado de la porción aminoterminal de PhoP ³²⁻³⁴.

El PhoP fosforilado se une a un promotor específico e induce o reprime la expresión de más de 40 genes llamados PhoP activados (Pags) y PhoP

reprimidos (Prgs) respectivamente ^{8,33,35,36}. Los genes PhoP-activados incluyen más de 10 proteínas de secreción, una proteína de membrana externa, una fosfatasa ácida inespecífica y transportadores de magnesio de gran afinidad⁴. Ciertos genes PhoP activados, juegan un papel en la modificación de la estructura de la membrana externa creando cambios estructurales en el lípido A del LPS ³⁷. Estudios con cepas de *S. typhimurium* resistentes a polimixina han mostrado que la modificación del lípido A requiere de un segundo sistema regulador de 2 componentes: PmrA/PmrB. La activación de PhoP/PhoQ estimula la síntesis aumentada de PmrA/PmrB; estos regulan la expresión de PmrE, la cual codifica para un UDP-glucosa deshidrogenasa (UGD). La UGD es considerada la enzima que esta involucrada en la producción de amino-arabinosa que al unirse al lípido A le confiere resistencia a péptidos catiónicos ^{11,35}.

- **Lipopolisacárido.**

El LPS es la endotoxina de las bacterias Gram-negativas y es el principal constituyente de la membrana externa de éstas ³⁸. Figura 1.

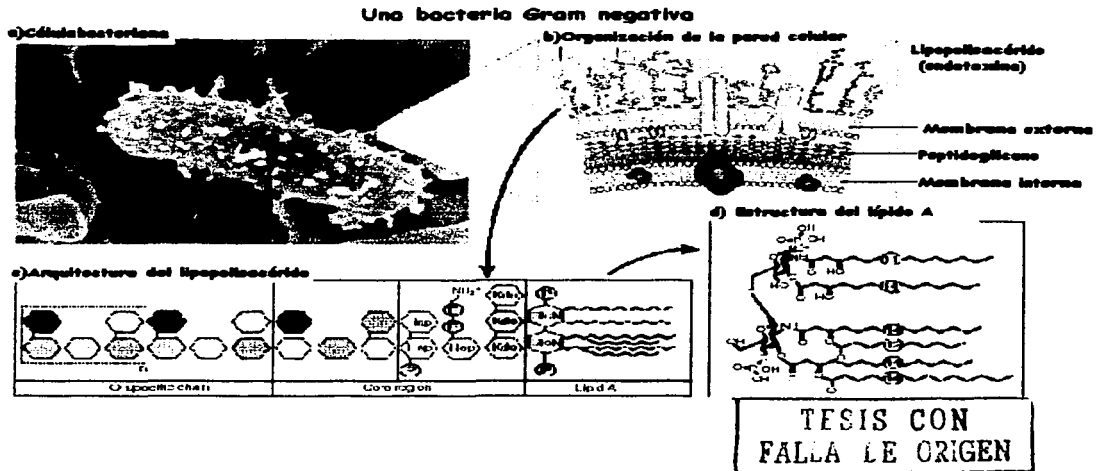


Figura 1. Micrografía electrónica de *E. coli* (a). Junto con una representación esquemática de la pared celular de las bacterias Gram negativas (b). Estructura del lipopolisacárido (c). Estructura del lípido A (d). Tomada de ³⁹.

El término endotoxina es reciente pero fue acuñado lentamente. Desde las escuelas de Hipócrates (460-370 a. C.) y Galeno (129-199 a. C.) concluyeron que los efectos de un "veneno" eran la causa de las enfermedades. Al paso del tiempo este término evolucionó adoptando el de "miasma" mismo que proviene del griego 'miainein' que significa contaminado, en el modelo del miasma el mal aire esparcía el veneno y las personas lo inhalaban enfermando así. Esta teoría sin embargo, no explicaba porque si todas las personas respiraban el mismo aire, algunas enfermaban y otras no. Una siguiente hipótesis explicaba que un material venenoso no volátil era el causante de las infecciones. A este material se le

denomino "contagion", que proviene del latín 'contigiere' que significa tocar. La teoría de que un veneno verdadero estaba presente en la materia podrida recibió un fuerte soporte de los experimentos de Albrecht von Haller (1708-1777) y François Magendie (1783-1855), quienes mostraron que la aplicación intravenosa de carne o pescado descompuestos a animales causaba síntomas de enfermedad. Peter L. Panum (1820-1885) puede ser considerado el pionero en el aislamiento y caracterización de los materiales venenosos. Jacob Henle (1809-1885) postuló que el veneno pútrido conocido como 'miasma' o 'contagión' podía reproducirse en los individuos afectados haciendo alusión a organismos vivos. Fue Pasteur (1822-1895) quién concluyó que eran gérmenes los responsables de la putrefacción y descomposición de la materia orgánica. Ludwing Brieger (1849-1919) descubrió que los gérmenes producen y secretan productos venenosos a los cuales denominó toxinas. Los primeros venenos bacterianos identificados fueron la toxina diftérica y la toxina tetánica. Pero Richard Pfeiffer (1858-1945) fue quién a raíz de los resultados obtenidos en sus experimentos con *V. cholerae*, en los cuales encontró una toxina termoestable asociada con la parte insoluble de la célula bacteriana, dio el último cincelazo al actual nombre de endotoxina ³⁹.

Gracias a los trabajos de Mary Jane Osborn y de Hiroshi Nikaido, ahora se conoce que la endotoxina es un importante componente estructural de la porción externa de la membrana externa de las bacterias gram negativas. El desarrollo de métodos de extracción adecuados fue crucial para la caracterización química de la endotoxina ³⁹.

El LPS es una molécula cargada negativamente, el cual en las cepas lisas puede ser dividido en tres regiones: a) Un lípido A, unido covalentemente a una región intermedia denominada core b) núcleo o core común y c) una cadena específica constituida por un heteropolímero formado por hasta 50 unidades de repetición de 5 azúcares cada una. El lípido A es la porción del LPS responsable de la mayoría de los efectos biológicos de esta molécula ^{4,40,41}.

La estructura química del lípido A, esta formada por un disacárido de D-glucosamina bifosforilado en 1 y 4' unidos entre si por un enlace glucosídico β 1-6 (GlcN II-GlcN I). Ambas glucosaminas están sustituidas por ácido 3-hidroximirístico [14:0(3-OH)] en las posiciones 2, 3, 2' y 3', con sustituciones de grupo acilo secundarios del grupo hidroxilo de 14 [14:0 ~-OH] en posición 3' por ácido mirístico (14:0) y en 2' por ácido laurico de la GlcN II ^{39,42}. Fig 2.

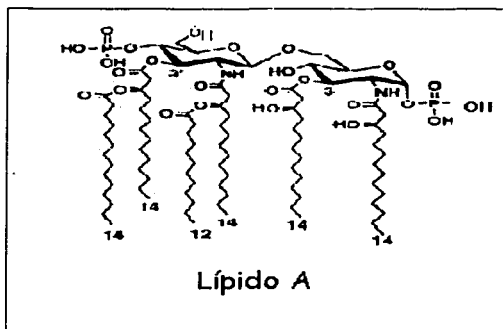


Figura 2. Esquema que representa la estructura química del lípido A del lipopolisacárido. Tomado y modificado de ⁴.

- **Reconocimiento del LPS.**

La inmunidad innata reconoce de manera selectiva moléculas principalmente de los microorganismos mediante receptores presentes en la superficie de las células efectoras del sistema inmune, a tales receptores se les conoce como receptores de reconocimiento a patrones (PRRs) y a las moléculas que son reconocidos por éstos se les denomina patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs). Los PAMPs al ser reconocidos por los PRRs inducen mecanismos de activación en el interior de la célula y esta activación tiene como consecuencia el inicio de la respuesta inmune contra el patógeno ^{1,2}.

Se han descrito una gran variedad de PAMPs, entre los cuales están el lipopolisacárido (LPS), los ácidos lipoteicoicos (LT), el peptidoglicano (PG) de bacterias Gram-positivas, la lipoarabinomanana (LAM) de *Mycobacterium*, la flagelina, las CpGs no metiladas, y el RNA de doble cadena, siendo el LPS el más estudiado ³.

El mecanismo por el cual el LPS activa al macrófago actualmente se conoce bien; la proteína que une al LPS (LBP), es una proteína de fase aguda, sintetizada en hígado, presente en la sangre, une al LPS lo extrae de micelas en las que se encuentra y lo transfiere a CD14 soluble en sangre (CD14s) y éste a CD14 membranal (CD14m). CD14m es una molécula de superficie unida a los monocitos y macrófagos a través de un ancla de glucosil fosfatidil inositol (GPI) ⁴³. El complejo LPS-CD14m inicia una serie de reacciones intracelulares a través de

los receptores tipo TOLL (TLRs) unidos a una proteína accesoria MD-2^{3,29,44}. La LBP, CD14 y TLRs son PRRs^{2,45}.

La forma en la cual interactúan TLR4-MD2 con los LPS se desconoce en la actualidad, existe una propuesta interesante que señala que dependiendo de la forma que adquiere el lipopolisacárido es la actividad biológica que muestra, si la forma es cónica la actividad es más fuerte que si adquiere una forma cilíndrica y mientras más cilíndrica sea la forma señala al través de TLR2 induciendo un patrón diferente de citocinas llegando a tener incluso propiedades antagonistas⁴⁶.

El LPS puede ser unido mediante el complejo de integrinas CD11/CD18 para facilitar su interacción con el complejo TLR-4/MD-2²⁹. TLR2 y TLR4 son los receptores que median la respuesta a diferentes tipos de LPS, *in vivo* e *in vitro*, para células fagocíticas en humanos y en ratones. El complejo LPS-CD14-TLR4-MD2 recluta y activa una proteína mielóide de diferenciación adaptadora denominada MyD88⁴⁷. Esta a su vez recluta dos serina-treoninas-quinasas denominadas receptor de IL- 1 con actividad de cinasa (IRAK e IRAK2). Ambos IRAK interaccionan subsecuentemente con la molécula adaptadora denominada factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) que se une a una proteína cinasa inductora de cinasas NF- κ B (NIK). NIK activa el complejo I κ B cinasa (1KKa e IKKb) que directamente fosforila I κ B. La fosforilación de I κ B media su degradación por el complejo I κ B ubiquitinado-proteasomas y liberando y activando al factor de transcripción NF- κ B el cual induce la producción de citocinas: IL-1, IL-6, 1L-8, TNF- α , moléculas de adhesión: VCAM-1, ELAM-1, proteínas de fase aguda como

la proteína mieloide del suero, C3, etc. Todo lo anterior conduce a la activación de la respuesta inmune innata celular con migración y reparación celular, inflamación y al final a la propia regulación de esta respuesta por medio de NF- κ B^{4,47-50}.

El LPS también puede ser internalizado en macrófagos mediante un mecanismo aun no conocido y puede unirse a un receptor intracelular Nod1, resultando en la activación de los factores de transcripción de una proteína hipotética X, la cual puede servir como un ligando para TLR4. Un grupo independiente de CD14 puede unir a LPS y es representado por Hsp70, Hsp-90, CXCR4 y GDF5, el cual también puede contribuir a la producción de TNF- α por un mecanismo aun no conocido ²⁹.

Los linfocitos B expresan en su superficie un receptor llamado RP105 que también esta involucrado en el reconocimiento de LPS. El receptor RP105 es similar a TLR4 en su dominio extracelular, el cual consiste en dominios ricos en leucinas. RP105 esta asociado en su dominio externo con MD-1 una proteína relacionada a MD-2, que es requerida para la función de RP105 ^{1,3,51}. Los TLRs expresados en linfocitos B disparan las funciones efectoras tales como la producción de anticuerpos, proporcionando una unión directa entre la respuesta inmune innata y la adaptativa ⁵².

- **Modificaciones estructurales del lípido A.**

A pesar de que el lípido A es un estructura relativamente conservada, su

variabilidad en especies dadas puede tener un impacto tremendo en su función ⁵³. El lípido A modificado reduce la expresión de E-selectina mediada por el LPS en células endoteliales y del TNF- α en monocitos humanos. Aparentemente el reemplazo de ácido mirístico por 2-hidroximirístico en el lípido A es probablemente el responsable del reconocimiento disminuido por la célula hospedera. La respuesta reducida del hospedero tiene como consecuencia una respuesta inmune innata atenuada y de esta manera se promueve la resistencia a factores antimicrobianos del hospedero ⁸.

Se ha demostrado que LPS de distintas bacterias que activan señales por diferentes TLRs inducen diversas respuestas inmunes adaptativas a antígenos pero se desconoce si modificaciones estructurales del mismo LPS también lo hacen ⁵⁴.

La sustitución del aminoácido 48 de PhoQ con isoleucina da como resultado una cepa PhoP^c constitutivo. Por otro lado la eliminación de phoP o phoQ resulta en un fenotipo PhoP⁻ nulo ³⁶. Existen diferencias estructurales importantes entre el lípido A de cepa silvestre, PhoP⁻ (sin mutación) y PhoP^c (PhoP activado constitutivamente) en cepas isogénicas de *S. typhimurium*. El análisis por espectrometría de masas y cromatografía, demostraron que el crecimiento en bajas concentraciones de Mg²⁺ resulta en la adición de aminoarabinosa y ácido 2-hidroximirístico y ácido palmítico al lípido A ^{4,8,35,36,55}. Estudios posteriores de las cepas de *S. typhimurium* resistentes a polimixina han demostrado que la modificación del lípido A requiere de un segundo sistema regulador de 2

componentes: PmrA/PmrB ³⁷.

La activación de PhoP/PhoQ o bajo pH estimulan la síntesis aumentada de PmrA/PmrB; estos regulan la resistencia a la polimixina induciendo la expresión de PmrE ⁵⁶, la cual codifica para un UDP-glucosa deshidrogenasa (UGD). La UGD es considerada la enzima que esta involucrada en la producción de amino-arabinosa al catalizar la formación de un intermediario en la biosíntesis de UDP-arabinosa ^{4,7}. Se necesita un segundo locus PmrA/PmrB para la resistencia a la polimixina, este ha sido definido como PmrF y es parte de un operón putativo que contiene genes que codifican proteínas con semejanza a la glucosiltransferasa y otros complejos relacionados con la biosíntesis de carbohidratos ³⁷.

- **Cepas de *S. typhimurium* con LPS modificado.**

La cepa de *Salmonella typhimurium* JSG-430 del Health Science Center University of Texas at San Antonio contiene un lípido A heptacilado formado por un disacárido de D-glucosamina bifosforilado en 1 y 4' unidos entre si por un enlace glucosídico β 1-6 (Glc pN II-Glc pN I). Ambas glucosaminas están sustituidas por ácido 3-hidroxi mirístico [14:0(3-OH)] en las posiciones 2, 3, 2' y 3', con sustituciones de grupo acilo secundarios del grupo hidroxilo de 14 [14:0 (~-OH)] en posición 3' por ácido mirístico (14:0) y en 2' por ácido láurico de la Glc pN II además de una sustitución en el grupo acilo secundario con ácido palmítico en la posición 2 ^{35,37}.

La cepa JSG-435 difiere de la cepa JSG 430 en que este último esta sustituido en la posición 4' por una aminoarabinosa unida por un enlace fosfoéster

37

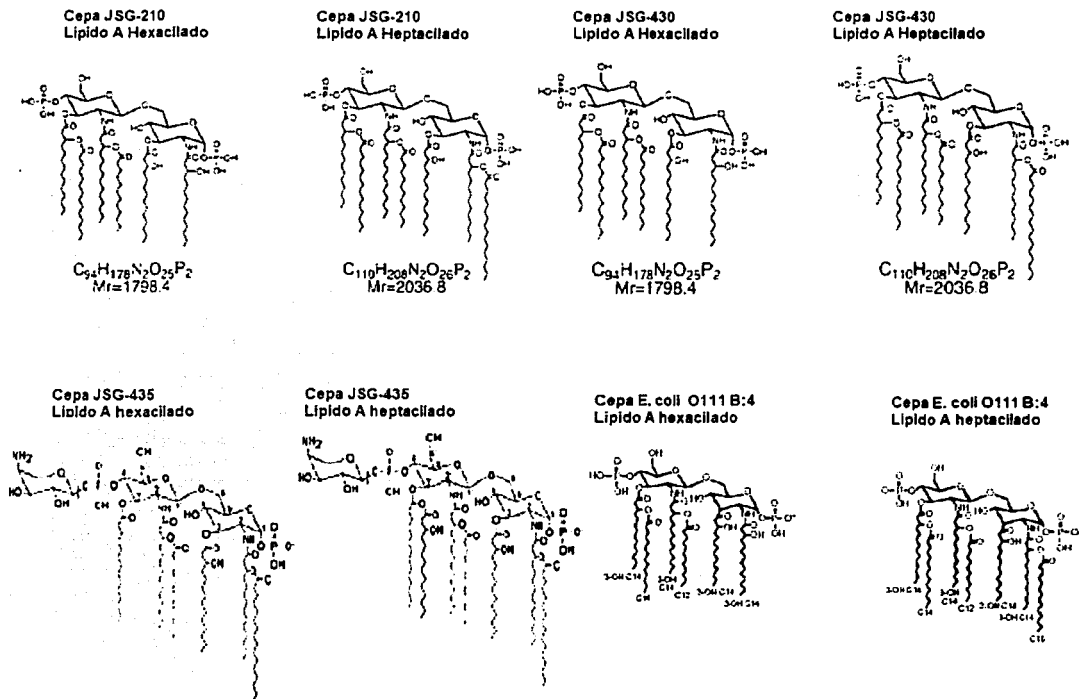


Figura 3. Estructura del lípido A de los diferentes lipopolisacáridos.

- **Ovoalbúmina**

Ovoalbúmina es una glicoproteína obtenida de huevo de pollo con un peso molecular de 45 kDa por cadena, cada macromolécula consta de cuatro cadenas idénticas. OVA es usada como un antígeno habitual en muchos estudios. La comparación de los niveles de anticuerpos anti OVA inducidos y las subclases de IgG se usan como un indicador del tipo de respuesta Th1 o Th2 ⁵⁷. Previamente se ha reportado que ratones BALB/c sensibilizados con OVA inducen una respuesta Th1 en los pulmones, pese a la considerable producción de IL-4 y IL-5 en esplenócitos de BALB/c. Sin embargo, los esplenócitos de ratones BALB/c siempre producen respuesta tipo Th2 sin tomar en cuenta la dosis usada para la sensibilización ⁵⁸.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre los mecanismos de supervivencia con los que cuenta *Salmonella* para evadir la respuesta inmune, se encuentran las modificaciones estructurales del lípido A de su LPS. Tales modificaciones son reguladas por un sistema de dos componentes (Phop/PhoQ) el cual responde a estímulos ambientales como disminución de pH y baja concentración de cationes divalentes.

En la actualidad poco se conoce sobre los efectos que produce el LPS cuando éste sufre modificaciones estructurales en el lípido A y no se conoce si estos cambios pueden ser detectados por los PRRs afectando así la respuesta inmune innata y en consecuencia la respuesta inmune adaptativa. Si *Salmonella typhimurium* modifica estructuralmente el lípido A del LPS, en respuesta al ataque del sistema inmune y estas modificaciones le permiten evadir la acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPS), los cuales interactúan con la membrana de la bacteria disgregándola y permitiendo el libre paso de sustancias al interior de la bacteria, y alterar la producción de TNF en las células de la respuesta inmune innata, entonces ¿Estos cambios tendrán algún efecto sobre la respuesta inmune humoral?

V. HIPÓTESIS

Las modificaciones estructurales del lípido A de *Salmonella typhimurium* además de modificar la respuesta inmune innata tendrán influencia sobre la respuesta inmune de anticuerpos.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar los efectos inducidos por los lipopolisacáridos de *Salmonella typhimurium*, modificados estructuralmente en el lípido A sobre la respuesta de anticuerpos contra Ovoalbúmina y caracterizar el tipo de respuesta.

Objetivos particulares

- ⊗ Estudiar la respuesta de anticuerpos anti-Ovoalbúmina (OVA) en ratones BALB/c.
- ⊗ Evaluar el efecto de las modificaciones estructurales del lípido A del lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* en la respuesta de anticuerpos anti-OVA en ratones BALB/c.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

- **1. Material biológico y antígenos.**

Ratones.

Los ratones BALB/c utilizados fueron proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, sede Hospital General de México, D. F. Los experimentos se realizaron en ratones de la misma edad y sexo mantenidos en condiciones convencionales. Los animales al inicio de cada experimento tenían una edad entre 6 y 8 semanas.

Antígenos.

Ovoalbúmina (OVA) grado VI SIGMA (A-2512) Lote 91K7057.

Cepas bacterianas.

A excepción de la cepa JSG-210 las demás cepas fueron generadas y proporcionadas por el Dr. John S. Gunn del Health Science Center University of Texas at San Antonio.

JSG-210 Cepa de *Salmonella typhimurium* tipo silvestre ATTCC 14028

JSG-430 phoP constitutiva, negativa para pmrA
(ausencia de aminoarabinosa en el lípido A)

JSG-435 pmrA Constitutiva
(presencia de amino-arabinosa en el lípido A)

LPS de *Escherichia coli* serotipo 0111B:4 (Sigma)

Anticuerpos

HRP-anti- IgM de ratón obtenido en cabra

Zymed No. cat. 61-6820

HRP- anti- IgG de ratón obtenido en conejo

Zymed No. cat. 61-6020

HRP- anti-IgG1 de ratón obtenido en conejo

Zymed No. cat. 61-0120

HRP- anti- IgG2a de ratón obtenido en conejo

Zymed No. cat. 61-0220

HRP-anti-IgG2b de ratón obtenido en conejo

Zymed No. cat. 61-0320

HRP-anti- IgG3 de ratón obtenido en conejo

Rockland No. cat. 610-4343

- **2. Inmunizaciones.**

Determinación de la dosis de antígeno a la cual se induce una mayor respuesta inmune humoral.

Se formaron cinco grupos de 5 ratones cada uno. Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal el día cero con dosis de 10 μ g, 100 μ g, 2mg y 5 mg de OVA disuelta en 300 μ L de SSI. El quinto grupo se inmunizó únicamente con SSI como grupo control.

Se realizó sangría retro-orbital a los ratones en los días 0, 4, 8, 12, 15, 21, 30, 60 y 90 recolectando la sangre en tubos microtainer (BECTON DICKINSON) con gel separador.

El seguimiento de la respuesta se llevó a cabo hasta la desaparición de anticuerpos anti OVA sangrando cada 30 días a partir del día 30.

La sangre obtenida fue centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos y los sueros se analizaron por el método de ELISA para determinar el título de anticuerpos anti-OVA de los tipos IgG e IgM.

Los resultados se graficaron como título de anticuerpos, diluciones seriadas 1:2 (-log 2) del suero prediluido 1:40, se expresó como: (-log₂ X 40) vs. tiempo expresado en días.

Caracterización de la respuesta de anticuerpos anti-OVA.

Se inmunizaron dos grupos de cinco ratones cada uno con 2 mg de OVA disuelta en SSI por vía intraperitoneal en día cero y un tercer grupo con SSI. El primer grupo recibió una reinmunización el día 15 a la misma dosis. Se obtuvo el suero y se realizó el análisis de la misma forma que se señala arriba.

Esquema de inmunización de OVA conjuntamente con los diferentes LPS.

Se formaron seis grupos de 6 ratones cada uno. El primer grupo fue inmunizado vía i. p. con una dosis de 2 mg de OVA por ratón en un volumen de 300 μ L. Los siguientes cuatro grupos de ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal (i p) el día cero con dosis de 2mg de OVA + 5 μ g de LPS disueltos en 300 μ L de SSI tal como se indica en la en las gráficas (Figuras 4-9). El sexto grupo se inmunizó únicamente con SSI como grupo control. El día 15 los ratones fueron reinmunizados usando las mismas condiciones que en día cero. La recolección de sangre y el tratamiento de ésta se llevo a cabo de la misma forma que se describe arriba.

- **3 Determinación del título de anticuerpos por el método de ELISA.**

Se fijaron las placas para ELISA de 96 pozos adicionando en cada pozo un volumen de 100 μ L de solución de unión. Las placas fueron incubadas 1 hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C, después se lavaron 2 veces con solución de lavado. Posteriormente se bloquearon las placas adicionando a cada pozo 100 μ L

de solución de bloqueo. Se incubaron una hora a 37°C y posteriormente se lavaron cuatro veces con Solución de lavado.

Se analizaron los sueros diluyendo cada uno de estos en solución de bloqueo para obtener una dilución 1:40. Se adicionaron 100 µL de los sueros previamente diluidos a los primeros pozos de las placas de diluciones, se hicieron diluciones seriadas 1:2 en las placas con solución de bloqueo. Se transfirieron cuantitativamente los sueros diluidos 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 de lavaron seis veces con solución de lavado. Se agregaron 100µL de una solución 1:1000 en solución de bloqueo de anticuerpo IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano. La incubación fue durante 1 hora a 37°C y posteriormente se lavaron con solución de lavado ocho veces.

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

La densidad óptica fue leída a 490 nm en un lector de ELISA (Lector para Placas de ELISA Dynex Technologies Modelo MRXII)

Los resultados se graficaron como título de anticuerpos $-\log_2 X 40$ vs. tiempo.

- **4 Reactivos utilizados para las determinaciones por ELISA.**

Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7g

Fosfato monobásico de sodio 0.7g

Fosfato dibásico de sodio 2.7g

Disolver en 500mL de agua Milli Q, ajustar pH y llevar a volumen de 1000mL con agua MilliQ.

Solución reguladora de Carbonatos (SAC) pH 9.5

Pese exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g

Carbonato de sodio 2.8 g

Disolver en 500 ml de agua MilliQ, ajustar el pH y llevar a volumen de 1000 mL con agua MilliQ.

Solución reguladora de citratos (SBC) pH 5.6

Pesar exactamente:

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

Disolver en 500 mL de agua MilliQ, ajustar pH y aforar con agua MilliQ a 1000mL

Solución de Unión.

Pesar OVA suficiente para elaborar una solución con una concentración de 15 μ g de OVA por cada 100 μ L de SAC pH 9.5.

Solución de lavado (agua Tween 0.1%)

A cada litro de agua agregar 1 mL de Tween 20 y disolver.

Solución de Bloqueo (PBS + leche 5%)

Pesar 5 g de leche descremada, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100 mL.

Nota: Esta solución debes ser utilizada el mismo día en que es preparada.

Solución de revelado.

Por cada 12 mL de SBC agregar 0.006g de OPD (SIGMA) y 10 μ L de H₂O₂ al 30% (SIGMA).

Nota: Esta solución debe utilizarse inmediatamente después de haberse preparado y debe mantenerse protegida de la luz.

Solución de H₂SO₄ 2.5 N

Medir 6.66 mL de ácido sulfúrico (98% pureza, δ 1.84) y transferir a un matraz volumétrico de 100mL con 50 mL de agua destilada, dejar enfriar y llevar al aforo con agua destilada.

- **5 Material y equipo de laboratorio.**

- ✂ Guantes
- ✂ Cubrebocas
- ✂ Tubos cónicos estériles de 15 ml (Corning)
- ✂ Agujas ultra finas de insulina de 25 x 16 mm
- ✂ Pipetas Pasteur estériles
- ✂ Placas de poliestireno Costar® marca Corning de 96 pozos. No. de catálogo 3590
- ✂ Puntas estériles y libres de pirógenos varios volúmenes
- ✂ Pipetas automáticas de 1 a 10 μ L
- ✂ Pipetas automáticas de 5 a 40 μ L
- ✂ Pipetas automáticas de 40 a 100 μ L
- ✂ Pipetas automáticas de 100 a 1000 μ L
- ✂ Pipetas volumétricas de 5 mL y 10 mL
- ✂ Matraces volumétricos de 500 y 1000 mL
- ✂ Probetas Pyrex de 50, 100, 200 y 500 mL
- ✂ Balanza Ohaus analytical plus
- ✂ Potenciómetro Corning Modelo 10

⌘ **Microcentrifuga Eppendorf**

⌘ **Lavador de placas Labsystems**

⌘ **Lector para Placas de ELISA Dynex Technologies Modelo MRXII**

⌘ **Incubadora 37°**

VIII. RESULTADOS

Caracterización de la respuesta inmune de anticuerpos anti OVA.

La primera parte del proyecto consistió en determinar la dosis óptima de OVA para inducir la respuesta inmune eficiente de anticuerpos en ratones BALB/c, para ello, grupos de 5 ratones BALB/c fueron inmunizados con diferentes concentraciones de OVA por vía intraperitoneal. El análisis de la respuesta de anticuerpos mostró que la dosis a la cual se despierta una mayor respuesta inmune contra el antígeno es la de 2 mg obteniéndose títulos cuantificables a partir del día 12 en IgG total y continúa incrementando el título hasta llegar a un máximo de ocho en el día 30, los títulos se mantuvieron altos hasta el día 120, mientras que se encontraron títulos de anticuerpos de clase IgM anti-OVA muy bajos únicamente en los primeros días después de la inmunización (datos no mostrados). La respuesta generada por las demás dosis evaluadas sigue el mismo patrón de comportamiento que la dosis de 2 mg en cuanto a la cinética de aparición de anticuerpos pero con títulos menores, incluso en la dosis de 5 mg (Figura 4). La inmunización con dosis de 100 y 10 μ g de OVA indujo una respuesta de anticuerpos de corta duración, los títulos de IgG totales prácticamente desaparecieron en el día 120 para el caso de la dosis de 10 μ g, mientras que en el caso de la dosis de 100 μ g todavía se observó la presencia de títulos muy bajos. Con base en estos datos, la dosis de OVA elegida para los siguientes experimentos fue la de 2 mg.

Con el fin de caracterizar la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con OVA se evaluaron los isotipos de anticuerpos inducidos por OVA (Figura 5). Únicamente se detectó la presencia de anticuerpos IgG1 en los animales inmunizados, los isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3 no se encontraron. El comportamiento de la respuesta del tipo IgG1 es semejante a la de IgG total a partir del día 12, ya que aunque no se detectaron IgG totales en el día 8 el anticuerpo anti IgG 1 sí fue capaz de medir la producción de anticuerpos. En el caso de IgG1, en dónde el sistema permitió una mayor sensibilidad de detección, también se observó una respuesta muy baja de anticuerpos al día 120 para las dosis de 100 y 10µg.

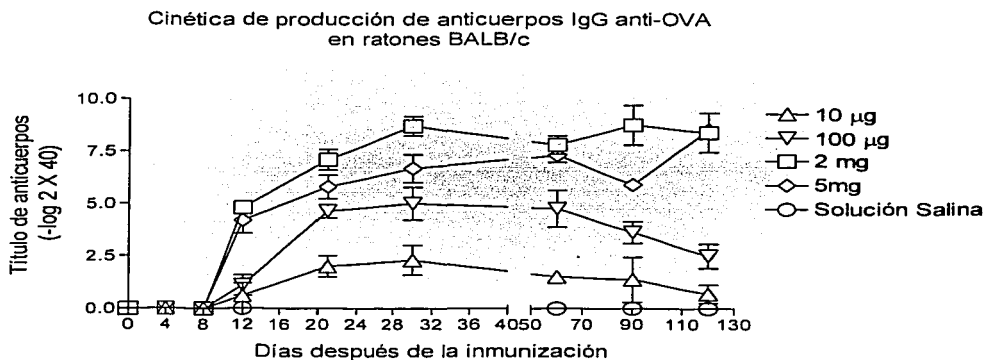


Figura 4. Se inmunizaron 4 grupos de cinco ratones con diferentes concentraciones de OVA el día cero, un quinto grupo fue inmunizado con SSI como control negativo. Los datos expresados corresponden a las sangrías de los ratones en los días 4, 8, 12, 21, 30, 60, 90 y 120.

Cinética de producción de anticuerpos IgG1 anti-OVA en ratones BALB/c.

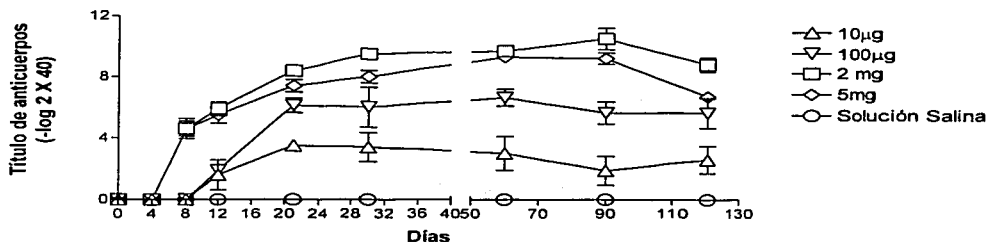


Figura 5. Se inmunizaron 4 grupos de tres ratones cada uno con diferentes concentraciones de OVA el día cero, un quinto grupo fue inmunizado con SSI como control negativo. Los datos expresados corresponden a las sangrías de los ratones en los días 4, 8, 12, 21, 30, 60, 90 y 120.

La reinmunización con OVA al día 15 incrementa la respuesta de anticuerpos alrededor de 32 veces (en la respuesta secundaria) y 4 veces (en la respuesta de larga duración).

Con el fin de incrementar los títulos de anticuerpos anti-OVA se incluyó una segunda inmunización al día 15 y se procedió a la caracterización de la respuesta de anticuerpos. Una vez más el título de anticuerpos IgM anti OVA no fue detectado por el sistema utilizado, sin embargo, la respuesta de IgG en el día 21 y 30 (secundaria) se vio incrementada aproximadamente 32 veces comparada con la respuesta obtenida con sólo una inmunización; los títulos de anticuerpos fueron disminuyendo paulatinamente, no obstante, durante la fase de larga duración (en el día 60, y 120) todavía eran 4 veces mayores que los observados después de una sola inmunización (Figura 6). La cinética de anticuerpos IgG totales fue, sin

embargo, similar a la producida con una sola inmunización durante todo el experimento. (Figura 6). Por otro lado, la presencia de anticuerpos IgG1 después de dos inmunizaciones mostró también un incremento hasta de 32 veces más que con una sola inmunización (durante la respuesta secundaria) mientras que en la respuesta de larga duración fue hasta de 4 veces más que con una sola inmunización. Los títulos de IgG1 a pesar de ser superiores después de la segunda inmunización, siguieron un comportamiento y tendencia similares a los presentados en los ratones inmunizados una sola vez (Figura 7). Las diferencias en la aparición de anticuerpos IgG1 e IgG totales en el día 8 post-inmunización, podrían ser causados por la diferencias en la sensibilidad de detección de los anticuerpos utilizados en la ELISA ya que el isotipo dominante es IgG1 (característico de una respuesta tipo Th2 comúnmente encontrada después de la inmunización con OVA) y por tanto es mejor detectado con el reactivo específico. En este experimento, una vez más no se encontraron anticuerpos de los isotipos IgG2a, IgG2b, e IgG3.

Cinética de producción de anticuerpos IgG anti-OVA en ratones BALB/c después de dos inmunizaciones

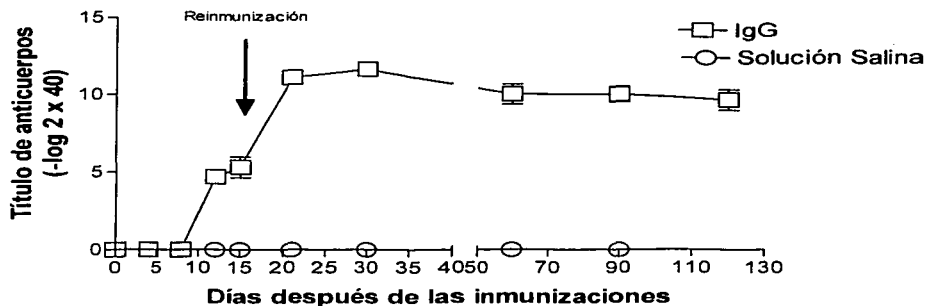


Figura 6. Se inmunizaron por vía intraperitoneal dos grupos de 3 ratones BALB/c. Un grupo fue inmunizado con una dosis 2 mg OVA y el otro grupo se inmunizó con solución salina como control en el día cero. El día 15 los ratones fueron reinmunizados utilizando la misma dosis de OVA. Las sangrías se realizaron los días 4, 8, 12, 15 y 21, 60, 90 y 120.

Cinética de producción de anticuerpos IgG1 anti-OVA en ratones BALB/c después de dos inmunizaciones

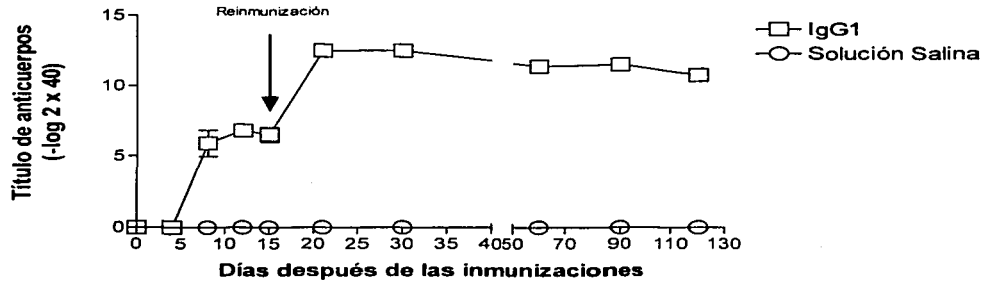


Figura 7. Se inmunizaron por vía intraperitoneal dos grupos de 3 ratones BALB/c. Un grupo fue inmunizado con 2 mg OVA y el otro grupo se inmunizó con solución salina como control en día cero. El día 15 los ratones fueron reinmunizados utilizando la misma dosis de OVA. Las sangrías se realizaron a los ratones en los días 4, 8, 12, 15 y 21, 60, 90 y 120.

La inmunización conjunta de OVA y las variantes estructurales del LPS inducen un menor incremento de la respuesta de anticuerpos anti-OVA comparada con la respuesta inducida por el LPS de tipo silvestre.

Con el fin de determinar el efecto que inducen las variantes estructurales del lípido A del LPS sobre la respuesta de anticuerpos, grupos de 6 ratones fueron inmunizados con OVA mezclada con 5 μ g de cada uno de los LPS modificados estructuralmente. Desde los primeros días después de la inmunización se observa un incremento en el título de anticuerpos anti-OVA en los animales que recibieron conjuntamente el LPS y la OVA, sin embargo, se puede distinguir que el incremento en el título de anticuerpos mediado por los LPS no es el mismo. Estas

diferencias se distinguen mejor durante la respuesta secundaria. Al día 21 después de la inmunización se observa que el incremento de anticuerpos inducido por la variante 435 es 24 veces menor que la inducida por los otros LPSs (Figura 8). De manera importante observamos que el LPS de *S. typhi* induce un incremento mínimo en el título de anticuerpos anti-OVA al compararlo con los LPS de *S. typhimurium* y *E. coli* (4096 veces menos)(Figura 8). Una vez más se detectaron títulos de IgM anti-OVA muy bajos únicamente durante los primeros días después de la primera inmunización.

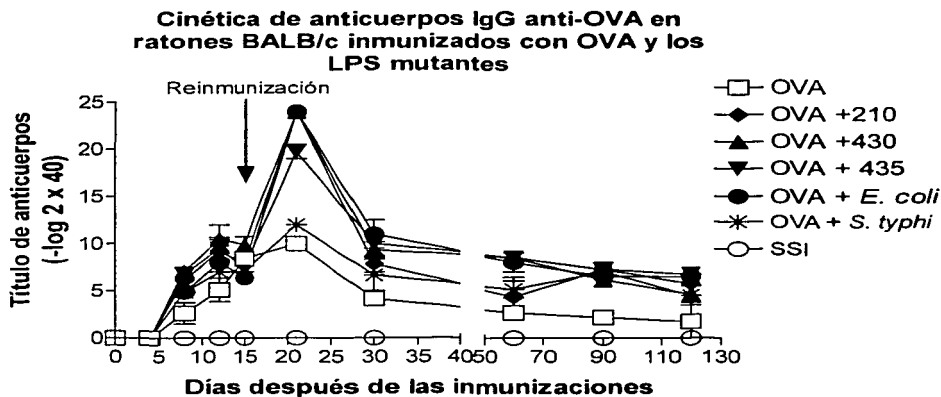


Figura 8. Se inmunizaron por vía intraperitoneal seis grupos de seis ratones BALB/c con 2 mg de OVA mezclada con 5 µg de LPS en el orden que muestra la figura. Los ratones fueron reinmunizados el día 15 con la misma dosis de antígeno y el título de anticuerpos fue determinado por medio de ELISA los días 4, 8, 12, 15, 21, 30, 60, 90 y 120.

En el caso de IgG1, la cinética de producción de anticuerpos en todos los grupos experimentales es similar durante los primeros 15 días, excepto para *S. typhi* la cual mantiene títulos por debajo de los demás pero más altos que el caso de OVA. Después de la reinmunización el título más alto corresponde al grupo inmunizado con LPS 210; mientras que el 430 y 435 mantienen títulos muy semejantes por debajo de las anteriores y finalmente *E. coli* y *S. typhi* son los que presentaron títulos más bajos, estas tendencias se conservaron durante la respuesta secundaria y de larga duración (Figura 9).

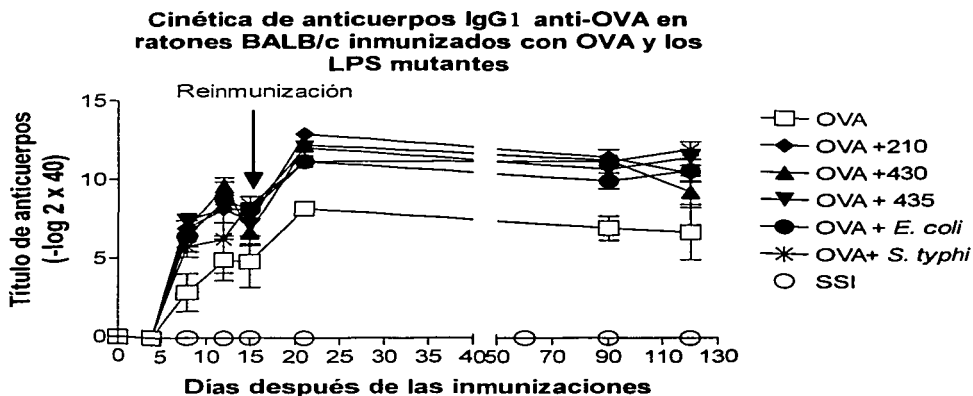


Figura 9. Se inmunizaron por vía intraperitoneal seis grupos de seis ratones BALB/c con 2 mg de OVA mezclada con 5 µg de LPS en el orden que muestra la figura. Los ratones fueron reinmunizados el día 15 con la misma dosis de antígeno y el título de anticuerpos fue determinado por medio de ELISA los días 4, 8, 12, 15, 21, 60, 90 y 120.

La aparición de anticuerpos IgG2a fue detectada a partir del día 8, en este día es muy similar el título para todos los grupos, excepto para OVA sola en el

cual no hay título. En día 12 incrementa el título para 430, 435 mientras que *E. coli*, 210 y *S. typhi* presentan títulos más bajos. En el día 15 hay desaparición del título de anticuerpos y posterior a la reinmunización, en día 21, se aprecia un notable incremento del título de anticuerpos en los grupos inmunizados con LPS 210, 430 y *S. typhi* mientras que el grupo 435 el título es 8 veces más que el del grupo 210. Durante la respuesta de larga duración, las cinéticas de los diferentes grupos siguieron un patrón similar con títulos similares. El grupo de OVA sin LPS no presentó títulos como en el caso de los experimentos previos a excepción de niveles extremadamente bajos en el día 21. La presencia de IgG2a anti-OVA no se había detectado por lo que se hace evidente la participación del LPS en la generación de este isotipo de anticuerpos anti-OVA.

Cinética de anticuerpos IgG2a anti-OVA en ratones BALB/c inmunizados con OVA y los LPS mutantes.

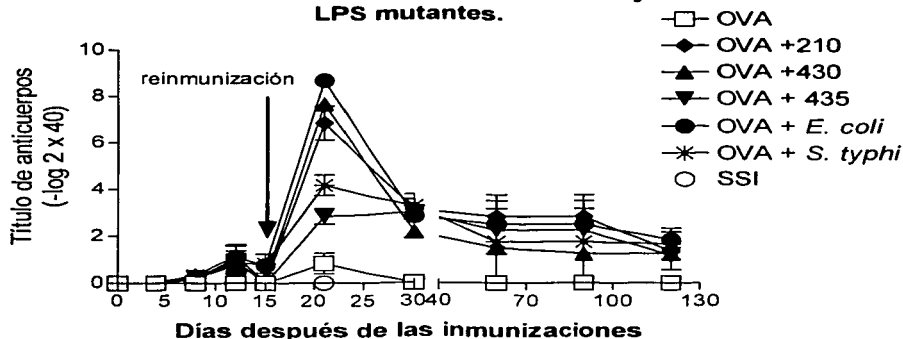


Figura 10. Se inmunizaron por vía intraperitoneal seis grupos de seis ratones BALB/c con 2 mg de OVA mezclada con 5 µg de LPS en el orden que muestra la figura. Los ratones fueron reinmunizados el día 15 con la misma dosis de antígeno y el título de anticuerpos fue determinado por medio de ELISA los días 4, 8, 12, 15, 21, 30, 60, 90 y 120.

Para el caso de IgG2b la aparición de anticuerpos fue detectada a partir del día 8, en este día, los títulos de anticuerpos son muy similares para todos los grupos, esta tendencia se conservó durante la respuesta primaria de anticuerpos. Posterior a la reinmunización, en día 21, se aprecia un notable incremento del título de anticuerpos en los grupos inmunizados con los LPS 210, 430 y en menor grado 435, *E. coli* y *S. typhi* en ese orden. La respuesta secundaria en el grupo 435 fue 4 veces menor que sus contrapartes 210 y 430. Durante la respuesta de larga duración, los títulos de anticuerpos en todos los grupos conservaron una cinética similar, sin embargo, al día 120 el grupo de la 430 fue el que mostró menor título de anticuerpos (alrededor de 4 veces) con su contraparte 210 y 435.

La presencia de IgG2b no fue detectada para OVA en experimentos previos, no obstante títulos muy bajos fueron observados en los días 90 y 120 en el presente experimento. Estos datos muestran la capacidad del LPS y sus variantes de inducir el cambio a este isotipo en los anticuerpos anti-OVA. En ninguno de los experimentos se detectó título de anticuerpos IgG3 anti-OVA.

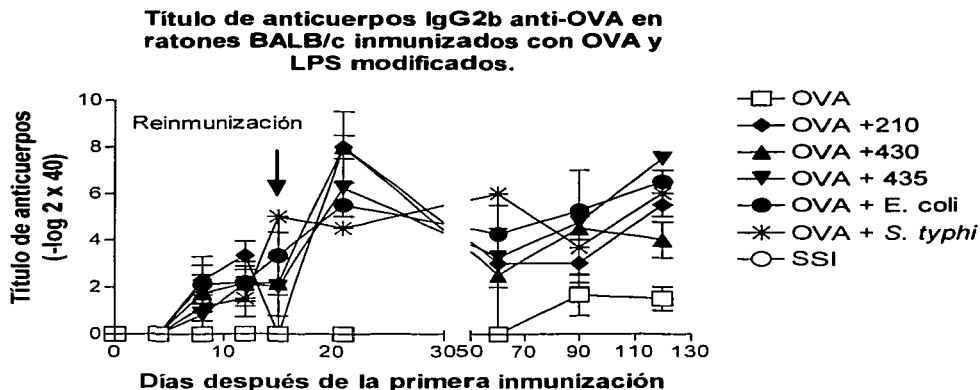


Figura 11. Se inmunizaron por vía intraperitoneal seis grupos de seis ratones con una dosis de 2 mg de OVA mezclada con 5 μ g de LPS en el orden que aparece en la gráfica, los días 0 y 15 del experimento. Se realizó sangría retro-orbital los días, 4, 8, 12, 15, 21, 60, 90 y 120 y se determinó el título de anticuerpos por el método de ELISA.

IX. DISCUSIÓN

Salmonella typhimurium es causante de una infección sistémica en ratones similar a la fiebre tifoidea humana por lo que se emplea como modelo experimental para el estudio los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *Salmonella* así como para la respuesta inmune en contra ésta.

En respuesta al ambiente hostil que le presenta el hospedero, *Salmonella* activa diversos mecanismos que le permiten contrarrestar el ataque del sistema inmune innato. La bacteria sobrevive al ambiente fagosomal por dilución de los compuestos tóxicos lisosomales o atenuación de los factores antimicrobianos, incluyendo inhibición en la acidificación del fagosoma ^{28,59,32}. Muchas de las propiedades que contribuyen a la supervivencia intracelular de *Salmonella* son controladas por el sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ ^{9,31}. PhoQ es una proteína transmembranal con actividad de histidina-cinasa que responde a señales transfiriendo fosfatos a un residuo conservado de la porción aminoterminal de PhoP ³²⁻³⁴. El PhoP activado se une a un promotor específico e induce o reprime la expresión de más de 40 genes llamados phoP activados (pags) y phoP reprimidos (prgs) respectivamente ^{8,33,35,36}. Ciertos genes phoP activados, juegan un papel en la modificación de la estructura de la membrana externa creando cambios estructurales en el lípido A del lipopolisacárido (LPS) ³⁷. Estudios con cepas de *S. typhimurium* resistentes a polimixina han mostrado que la modificación del lípido A requiere de un segundo sistema regulador de 2 componentes: PmrA/PmrB. PmrA regula la expresión de pmrE, el cual codifica para UDP-glucosa deshidrogenasa (UGD). La UGD y las enzimas codificadas en

el operón pmrHFIJKLM están involucradas en la producción de amino-arabinosa que al unirse al lípido A le confiere a la bacteria resistencia a péptidos catiónicos 11,35,37,60.

De esta manera podemos apreciar que, las modificaciones estructurales del LPS le permiten a la bacteria evadir la respuesta del sistema inmune innato.

El LPS es la molécula del patógeno con la que primero tiene contacto el sistema inmune innato al ser la molécula predominante en la cara externa de la membrana externa de la bacteria. Se ha descrito la unión del LPS a varias proteínas, entre ellas está la familia de receptores TLR los cuales se activan por una intrincada vía de señalización a factores de transcripción que controlan múltiples funciones celulares. Por ejemplo, estas señales participan en la activación, la maduración y migración de las células dendríticas quienes expresan moléculas coestimuladoras como CD80/86, producen citocinas proinflamatorias como IL-12 e incrementan la presentación de antígeno por medio de las moléculas MHCII.

Las células presentadoras de antígeno migran al órgano linfóide secundario local actuando sobre los linfocitos T, los cuales inducen principalmente una respuesta tipo Th1; de esta forma los TLRs participan en el balance Th1/Th2 regulando así, de manera importante, la respuesta inmune adaptativa ⁶¹⁻⁶³.

Aunque los TLRs son receptores característicos de la respuesta inmune

innata, su expresión no se limita a las células del sistema inmune innato. En linfocitos T de ratón ha sido reportada la presencia y la regulación de la expresión de TLR 2 y 4 después de la estimulación con LPS ⁶⁴. A su vez, se ha estudiado la presencia de TLRs en linfocitos T reguladores⁵². En estas células se ha reportado que la estimulación con LPS induce un incremento en su función reguladora ^{65,66}. En el caso de linfocitos T citotóxicos se ha descrito que la señalización a través de TLR-9, 3 5 y 7 incrementa la respuesta citotóxica ⁶⁷.

En la superficie tanto de linfocitos B de humano y de ratón se ha descrito la presencia de TLR2, TLR4, TLR9, TLR10 y RP105 ^{68,69,70}, el significado biológico de este fenómeno se empieza a explorar, y los primeros datos experimentales sugieren que la presencia de estos receptores puede indicar una cooperación de señales de estos receptores para la activación, proliferación, o supervivencia de los linfocitos B. Trabajos recientes nos muestran que al estimular Linfocitos B de Zona Marginal únicamente a través del entrecruzamiento del BCR induce la apoptosis de la célula, mientras que la estimulación por medio de LPS induce la activación, diferenciación celular y producción de anticuerpos ⁷¹.

Otros estudios nos muestran que los complejos inmunes formados por la cromatina y anticuerpos IgG2a son capaces de activar linfocitos B autorreactivos provenientes de ratones MRL/lpr que son un modelo animal para el estudio de lupus eritematoso sistémico ⁷². A su vez se ha descrito que la estimulación independiente del BCR a través de CpG mantiene la memoria sérica a través de la activación policlonal de linfocitos B humanos de memoria a través de TLR9 ^{69,73}.

La activación de linfocitos B de ratón con CpG inducen directamente la activación del factor de transcripción denominado caja T expresado en células T (T-bet), inhibiendo el cambio de isotipo a IgG1 e IgE en estas células⁷⁴. Estos datos aunque realizados *in vitro* representan el primer reporte de lo que pudiera ser el puente entre los TLRs y el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en los linfocitos B⁷⁵. Así tenemos que existen ya las primeras evidencias experimentales que indican que los TLRs se encuentran involucrados en la activación, el cambio de isotipo y en el mantenimiento de la memoria de los linfocitos B. Sin embargo, ni estos fenómenos ni los mecanismos celulares y moleculares involucrados han sido caracterizados propiamente.

En su conjunto, estas evidencias experimentales nos muestran que los TLRs se encuentran presentes en los linfocitos B y T y que pudieran participar de manera importante en algunos de los procesos biológicos en estas células. Sin embargo, la contribución de estos receptores en la respuesta inmune adaptativa no se conoce. En el caso particular del linfocito B, estos datos sugieren la participación de los TLRs en la activación y/o regulación de la actividad celular y por consiguiente en las diferentes fases de la respuesta inmune humoral. Por otro lado no se sabe si células B pueden "ver" a través de TLRs o de algún otro receptor para LPS las modificaciones estructurales de los LPS y si este evento modificaría su activación y función efectora.

El presente trabajo representa el primer acercamiento para dar respuesta de esta pregunta para lo cual se coimmunizaron ratones BALB/c

con un antígeno modelo y 2 variantes estructurales del lípido A del LPS de *S. typhimurium* que se presentan en respuesta al ambiente hostil que le establece el hospedero a la bacteria y se estudió la variación en la respuesta de anticuerpos. Para poder explicar estas variaciones el primer paso consistió en realizar una cinética de producción de anticuerpos en función a dosis y determinando los niveles de IgM, IgG y sus isotipos, las gráficas 4 y 5 nos muestran que la dosis en que obtenemos la mejor repuesta de anticuerpos son 2 mg de OVA, no se muestran las gráficas de IgM, IgG2a, IgG2b ni IgG3 porque no hubo títulos lo cual confirma el hecho de que OVA induce una fuerte respuesta tipo Th2, por lo cual se ha empleado ampliamente en estudios de hipersensibilidad (Asma).

El segundo experimento consistió en aplicar la dosis de 2 mg en dos ocasiones para poder medir la respuesta secundaria a este inmunógeno las gráficas 5 y 6 nos muestran que la reinmunización con OVA indujo una respuesta varias veces mayor que cuando sólo se inmuniza con una dosis, nuevamente el patrón de es tipo Th2 al solo presentarse títulos detectables en IgG total e IgG1, en ambos experimentos se presentan títulos detectables a partir del día 12 y en ambos casos la respuesta tiene larga duración, detectable al día 120. Sorpresivamente en ninguno de los 2 experimentos se pudo detectar IgM, probablemente, debido a que esta clase de inmunoglobulina pudo aparecer en el suero antes del día 4 y a un nivel muy bajo. Todos estos resultados concuerdan con estudios reportados en que ratones BALB/c sensibilizados con OVA inducen

una respuesta tipo Th2 sin tomar en cuenta la dosis usada para la sensibilización⁵⁸. Se debe tomar en cuenta que los ratones BALB/c exhiben un fondo genético predominante Th2.

Se sabe que el LPS tiene actividad adyuvante y que induce respuestas Th1 pero se desconoce si al presentar las modificaciones estructurales en el lípido A, las propiedades adyuvantes y la capacidad de inducir una respuesta Th1 se mantienen, así como la influencia que pueda ejercer el ambiente producido por los LPS en la respuesta a este inmunógeno.

La coinmunización de los LPS (5µg) con OVA (2mg) se puede apreciar en las figuras 8-10. en la figura 8 podemos apreciar que en la respuesta primaria de anticuerpos IgG (días 4 a 15) todos los LPS indujeron un efecto adyuvante pero sin mostrar grandes diferencias entre ellos. Durante la respuesta secundaria se ven las mayores diferencias, los lipopolisacáridos de *E. coli*, JSG 210 y 430 inducen un efecto adyuvante muy potente, en tanto que el JSG-435 aunque muestra efecto adyuvante está 4 títulos por debajo de los anteriores. Este es un resultado muy interesante ya que la respuesta de anticuerpos inducida por la coadministración del LPS de *S. typhi* y OVA es similar a la obtenida cuando se inmuniza sólo con OVA, es decir, el LPS del patógeno para el hombre prácticamente no tiene poder adyuvante cuando es administrado al ratón.

Estos resultados sugieren que el ambiente inducido por el LPS al actuar sobre CPA y linfocitos T puede tener efecto sobre los linfocitos B, o bien que al actuar

directamente los LPS sobre el linfocito B, estos pueden reconocer las diferencias y ser estimulados para la activación del cambio de isotipo o su diferenciación a células plasmáticas de manera diferente.

En la gráfica 9 podemos apreciar que durante la respuesta de anticuerpos contra OVA en el isotipo IgG1, la cinética en las respuestas primaria y secundaria no muestra diferencias significativas, no obstante el efecto adyuvante es muy marcado y se mantiene en la respuesta de larga duración, lo que apunta a que no existen diferencias en la señalización por los LPS para este isotipo.

Los primeros datos que nos señalan diferencias importantes en el efecto de los LPS sobre el cambio de isotipo se observa en la gráfica 10, la OVA que al ser administrada sin LPS no produjo títulos para el isotipo IgG2a, por efecto de éstos induce una respuesta muy intensa. Durante la respuesta primaria los títulos de anticuerpos son muy discretos y similares entre ellos, pero al ser reinmunizados los ratones con LPS y OVA, se observa una fuerte respuesta provocada por los LPS de *E. coli*, JSG 210 y 430 en tanto que los LPS de *S. typhi* y la JSG-435 muestran un efecto mucho menor al de los otros LPS. Esta podría ser la primera evidencia de que la activación de linfocitos B de ratón con LPS reprimen directamente o indirectamente la activación del factor de transcripción denominado caja T expresado en células T (T-bet), permitiendo el cambio de isotipo a IgG1 en estas células^{74,75}. Estos resultados representan el primer reporte de lo que pudiera ser el puente entre los TLRs, las modificaciones estructurales en los LPS y el cambio de isotipo de inmunoglobulinas en los linfocitos B.

La respuesta de anticuerpos IgG2b es la segunda evidencia de que los LPS inducen un isotipo que previamente no inducía la OVA, durante la respuesta primaria no se observan diferencias entre los títulos de anticuerpos, solo se observa un marcado efecto adyuvante, durante la respuesta secundaria los LPS de JSG 210 y 430 son los que inducen los mayores títulos, nuevamente la cepa JSG-435 induce un menor efecto adyuvante y los LPS de *E. coli* y *S. typhi* son los que inducen el menor título de IgG2b, lo que sugiere que esta vía también está siendo afectada por los LPS.

Los resultados indican que los diferentes LPS influyen en la respuesta de anticuerpos dirigida a OVA. Parece ser que el LPS de la cepa PhoP^c (JSG-430) es reconocido en forma similar al de la cepa silvestre (JSG-210) por las células de ratón ya que muestran un efecto adyuvante prácticamente igual; en tanto que el LPS de la cepa PhoP^r PmrA^c (JSG-435), con aminoarabínosa de manera constitutiva, es reconocido de forma diferente pues en todos los casos indujo una respuesta disminuida. Resulta también interesante el que el LPS de *S. typhi* en IgG total e IgG2a tenga menor título de anticuerpos en tanto que en IgG2b se comporte igual a todos los LPS. Estos eventos juntos sugieren que los LPS pueden influir en la respuesta de anticuerpos y nos permite especular que además de favorecer a la bacteria durante el proceso infeccioso los LPS pueden alterar la respuesta inmune adaptativa en contra de ellos y que probablemente estos cambios de isotipo observados en la respuesta contra un inmunógeno irrelevante pudieran presentarse también en la respuesta contra la bacteria que porta la modificación en el lípido A, y esto pudiese probablemente causar el que los

isotipos de las inmunoglobulinas sintetizadas no favorezcan la fijación de complemento o favorezcan la entrada de bacterias opsonizadas a células que expresen receptores para inmunoglobulinas. De esta forma, nuestros resultados sugieren la participación de las modificaciones estructurales del lípido A del LPS en la regulación de la respuesta de anticuerpos. Estos conocimientos son importantes para el entendimiento de la relación hospedero parásito.

X. CONCLUSIONES

- Las modificaciones estructurales del lipido A del LPS de *Salmonella typhimurium* influyen en la respuesta de anticuerpos contra Ovalbúmina presentando un efecto adyuvante en todos los casos.
- El LPS de la cepa JSG 210 (tipo silvestre) es la que muestra una mayor respuesta de anticuerpos contra OVA en todos los isotipos de anticuerpos.
- El LPS de la cepa JSG 430 (PhoP^c PmrA⁻) cuyo lipido A cuenta con sustituciones de ácido palmítico y laúrico sin adición de aminoarabinosa, presenta titulos muy elevados, lo cual indica que la presencia de grupos acilos secundarios potencia el reconocimiento del LPS y por tanto su efecto adyuvante.
- El LPS de la cepa JSG 435 (PmrA^c) que en su estructura presenta aminoarabinosa, modifica la respuesta de anticuerpos incrementándola respecto a la OVA sin LPS pero en menor intensidad que en las demás cepas, lo cual indica que la presencia de amino arabinosa además de hacer a la cepa resistente a CAMPs también disminuye el reconocimiento de LPS y por lo tanto su efecto adyuvante.
- El LPS influye de manera directa sobre el cambio de isotipo de las IgG durante la respuesta de anticuerpos anti-OVA.

XI. REFERENCIAS.

1. Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
2. Teixeira,M.M., Almeida,I.C. & Gazzinelli,R.T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes. Infect.* **4**, 883-886 (2002).
3. Takeuchi,O. & Akira,S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes. Infect.* **4**, 887-895 (2002).
4. Raetz,C.R. & Whitfield,C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635-700 (2002).
5. Rajewsky,K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-758 (1996).
6. Medzhitov,R. & Janeway,C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300 (2002).
7. Peschel,A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**, 179-186 (2002).
8. Guo,L. *et al.* Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**, 189-198 (1998).
9. Linehan,S.A. & Holden,D.W. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host-what can it teach us about innate immunity? *Immunol. Lett.* **85**, 183-192 (2003).
10. Wick,M.J., Harding,C.V., Twesten,N.J., Normark,S.J. & Pfeifer,J.D. The *phoP* locus influences processing and presentation of *Salmonella typhimurium* antigens by activated macrophages. *Mol. Microbiol.* **16**, 465-476 (1995).
11. Tamayo,R., Ryan,S.S., McCoy,A.J. & Gunn,J.S. Identification and genetic characterization of *PmrA*-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Infect. Immun.* **70**, 6770-6778 (2002).
12. Brenner,F.W., Villar,R.G., Angulo,F.J., Tauxe,R. & Swaminathan,B. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2465-2467 (2000).
13. Mittrucker,H.W. & Kaufmann,S.H. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 457-463 (2000).
14. Romero Cabello,R. **Microbiología y Parasitología Humana.**, pp. 298-305 (: Editorial Médica Panamericana México,1999).

15. Levine, M. Vaccines. Plotkin S.A. and Orenstein W.A. (ed.), pp. 781-814 (1999).
16. Mastroeni, P. & Menager, N. Development of acquired immunity to Salmonella. *J. Med. Microbiol.* **52**, 453-459 (2003).
17. Levine, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E. & Clements, M.L. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* **47**, 510-550 (1983).
18. Zhang, S. *et al.* Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* **71**, 1-12 (2003).
19. Hughes, E.A. & Galan, J.E. Immune response to Salmonella: location, location, location? *Immunity.* **16**, 325-328 (2002).
20. Jepson, M.A. & Clark, M.A. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol.* **6**, 359-365 (1998).
21. Levine, M.M., Tacket, C.O. & Sztein, M.B. Host-Salmonella interaction: human trials. *Microbes. Infect.* **3**, 1271-1279 (2001).
22. Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A. & Miller, S.I. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**, 601-608 (1994).
23. Govoni, G. & Gros, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.* **47**, 277-284 (1998).
24. Eckmann, L. & Kagnoff, M.F. Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes. Infect.* **3**, 1191-1200 (2001).
25. Sayers, A.A. & W.D.D. Bacterial Pathogenesis., pp. 229-243 (ASM Press. Washington, D.C., 1994).
26. Casadevall, A. Antibody-Mediated Immunity against Intracellular Pathogens: Two-Dimensional Thinking Comes Full Circle. *Infect. Immun.* **71**, 4225-4228 (2003).
27. Michetti, P. *et al.* Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by Salmonella typhimurium. *Gastroenterology* **107**, 915-923 (1994).
28. Raupach, B. & Kaufmann, S.H. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 417-428 (2001).
29. Dobrovolskaia, M.A. & Vogel, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes. Infect.* **4**, 903-914 (2002).

30. Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. & Ezekowitz, R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318 (1999).
31. Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J.C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**, 103-118 (2003).
32. Alpuche C.M. & Swanson, J.A.L.W.P.a.5.1.M. *Salmonella typhimurium* activates virulence genes transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 1079-1083 (2003).
33. Gunn, J.S., Hohmann, E.L. & Miller, S.I. Transcriptional regulation of *Salmonella* virulence: a PhoQ periplasmic domain mutation results in increased net phosphotransfer to PhoP. *J. Bacteriol.* **178**, 6369-6373 (1996).
34. Miller, S.I.K.A.M.A.J.J.M. A two component regulatory system (*PhoP-phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 5054-5058 (2003).
35. Gunn, J.S. & Miller, S.I. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* **178**, 6857-6864 (1996).
36. Guo, L. *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* **276**, 250-253 (1997).
37. Gunn, J.S. *et al.* *PmrA-PmrB*-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**, 1171-1182 (1998).
38. Nikaido, H. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C. (ed.) (ASM Press, DC, 1996).
39. Beutler, B. & Rietschel, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 169-176 (2003).
40. Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H. & Matsushima, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today* **5**, 123-132 (1999).
41. Skidmore, B.J., Chiller, J.M., Morrison, D.C. & Weigle, W.O. Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *J. Immunol.* **114**, 770-775 (1975).
42. Müller-Loennis, S.H.Z.U.S.U.K.S.U.A.J.a.E.Th.R. Endotoxin and Sepsis. (Levin, J.P.M.Y.T.a.N.M.e. (ed.), pp. 51-72 (John Wiley and Sons., 1996).

43. Lamping,N. *et al.* LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest* **101**, 2065-2071 (1998).
44. Kawai,T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* **167**, 5887-5894 (2001).
45. Barton,G.M. & Medzhitov,R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-1525 (2003).
46. Netea,M.G., van Deuren,M., Kullberg,B.J., Cavaillon,J.M. & Van der Meer,J.W. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* **23**, 135-139 (2002).
47. Medzhitov,R. *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**, 253-258 (1998).
48. Kopp,E.B. & Medzhitov,R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 13-18 (1999).
49. Underhill,D.M. Mini-review Toll-like receptors: networking for success. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1767-1775 (2003).
50. Yang,R.B. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288 (1998).
51. Ogata,H. *et al.* The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J. Exp. Med.* **192**, 23-29 (2000).
52. Caramalho,I. *et al.* Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**, 403-411 (2003).
53. Caroff,M., Karibian,D., Cavaillon,J.M. & Haeffner-Cavaillon,N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes. Infect.* **4**, 915-926 (2002).
54. Pulendran,B. *et al.* Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J. Immunol.* **167**, 5067-5076 (2001).
55. Gunn,J.S., Belden,W.J. & Miller,S.I. Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb. Pathog.* **25**, 77-90 (1998).
56. Trent,M.S., Pabich,W., Raetz,C.R. & Miller,S.I. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in

- membranes of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **276**, 9083-9092 (2001).
57. Tomasic, J. *et al.* Comparative study of the effects of peptidoglycan monomer and structurally related adamantyltripeptides on humoral immune response to ovalbumin in the mouse. *Vaccine* **18**, 1236-1243 (2000).
 58. Morokata, T., Ishikawa, J. & Yamada, T. Antigen dose defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses. *Immunol. Lett.* **72**, 119-126 (2000).
 59. Alpuche-Aranda, C.M., Berthiaume, E.P., Mock, B., Swanson, J.A. & Miller, S.I. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect. Immun.* **63**, 4456-4462 (1995).
 60. Noland, B.W. *et al.* Structural studies of *Salmonella typhimurium* ArnB (PmrH) aminotransferase: a 4-amino-4-deoxy-L-arabinose lipopolysaccharide-modifying enzyme. *Structure. (Camb.)* **10**, 1569-1580 (2002).
 61. Gay, N.J. & Keith, F.J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-356 (1991).
 62. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300 (2002).
 63. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376 (2003).
 64. Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikacharoen, T. & Yoshikai, Y. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* **95**, 1378-1385 (2000).
 65. Sakaguchi, S. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J. Exp. Med.* **197**, 397-401 (2003).
 66. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033-1036 (2003).
 67. Schwarz, K. *et al.* Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1465-1470 (2003).
 68. Chan, V.W. *et al.* The molecular mechanism of B cell activation by toll-like receptor protein RP-105. *J. Exp. Med.* **188**, 93-101 (1998).

69. Bernasconi, N.L., Onai, N. & Lanzavecchia, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* **101**, 4500-4504 (2003).
70. Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. & Mantovani, A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* **102**, 956-963 (2003).
71. Morse, H.C., III *et al.* Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia. *Leuk. Res.* **25**, 169-178 (2001).
72. Leadbetter, E.A. *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-607 (2002).
73. Bernasconi, N.L., Traggiai, E. & Lanzavecchia, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* **298**, 2199-2202 (2002).
74. Liu, N., Ohnishi, N., Ni, L., Akira, S. & Bacon, K.B. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat. Immunol.* **4**, 687-693 (2003).
75. Rifkin, I.R. & Marshak-Rothstein, A. T-bet: the Toll-bridge to class-switch recombination? *Nat. Immunol.* **4**, 650-652 (2003).