

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Estudio de los mecanismos de inmunidad humoral y
protección inducidos por las porinas OmpC y OmpF de
Salmonella enterica serovar Typhi.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

“INMUNOLOGÍA”

P R E S E N T A

Biól. Ismael Secundino Velázquez

Tutor: Constantino III Roberto López Macías

México, D.F. junio del 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**JURADO PARA EXÁMEN DE GRADO COMO DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS DEL BIÓL. ISMAEL SECUNDINO VELÁZQUEZ.**

PRESIDENTE: DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE
SECRETARIO: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACIAS
VOCAL: DR. EDUARDO GARCIA ZEPEDA
VOCAL: DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS
VOCAL: DRA. BERTHA MARIA J. GONZÁLEZ PEDRAJO
SUPLENTE: DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
SUPLENTE: DRA. CELIA ALPUCHE ARANDA

COMITÉ TUTORAL:
DR. CONSTANTINO LÓPEZ-MACIAS
DR. CESAR GONZÁLEZ BONILLA
DRA. GLADYS FRAGOSO GONZÁLEZ

DEDICATORIA.

A MI MAMA:

BERTHA SECUNDINO

AGRADECIMIENTOS.

Mi agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM por ser la Institución que me formó académicamente. El Programa forma parte del padrón de Posgrado de Excelencia del CONACYT. Mi reconocimiento al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca con número de registro 125105 y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

El presente proyecto fue financiado por el CONACYT Proyecto 45261-M y el Instituto Mexicano del Seguro Social a través de la Coordinación de Investigación en Salud Proyecto FP-2003/020

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

Un reconocimiento muy especial al Dr. Vianney Ortiz por todos estos años que me estuvo apoyando y gracias a él debo la mayoría de las cosas que he aprendido en este sinuoso andar en la ciencia.

Mi agradecimiento al Dr. José Moreno y a la Dra. Ma. Carmen Maldonado por su apoyo y valiosas sugerencias.

Agradezco el apoyo brindado por la Dra. Ingebor Becker del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, por las facilidades y recursos otorgados en la realización de este trabajo.

Agradezco el apoyo 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, UNAM.

INDICE.

I. RESUMEN.....	8
II. ABSTRACT.....	9
III. INTRODUCCION.....	10
3.1 Fiebre tifoidea.....	10
3.2 Nomenclatura actual de <i>Salmonella</i>	10
3.3 Aspectos históricos.....	11
3.4 Epidemiología.....	12
3.5 Patogenia.....	12
3.6 Vacunas para la fiebre tifoidea.....	15
3.6.1 Vacunas de bacterias muertas: vacuna parenteral K (muerta por acetona) y vacuna parenteral L (muerta por calor-fenol).....	15
3.6.2 Vacuna de bacteria atenuada: vacuna oral Ty21a.....	16
3.6.3 Vacuna de subunidades: vacuna parenteral a base del antígeno Vi.....	17
3.7 Proteínas de la membrana externa (PME).....	19
3.8 Porinas.....	22
3.9 Estructura de las porinas.....	23
3.10 Las porinas de <i>Salmonella</i> como antígenos protectores.....	28
3.11 Inmunogenicidad de las porinas de <i>Salmonella</i>	31
3.12 Importancia de los anticuerpos en la respuesta inmune contra <i>Salmonella</i>	33
3.13 Importancia de los linfocitos B de memoria.....	35
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
V. OBJETIVO GENERAL.....	38
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
VII. MATERIALES Y METODOS.....	39
7.1 Cepas bacterianas.....	39
7.2 Cultivo de bacterias.....	39
7.3 Animales de laboratorio.....	40
7.4 Aislamiento de porinas, OmpC y OmpF de <i>S. enterica</i> serovar Typhi.....	40
7.5 Cuantificación del contenido de proteínas por el Método de Lowry.....	41

7.6 Metodo de Karkhanis.....	41
7.7 Prueba de <i>Limulus</i>	42
7.8 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	42
7.9 Inmunoelctrotransferencia.....	43
7.10 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).....	43
7.11 Esquema de inmunización.....	44
7.12 Citometría de flujo (FACS).....	44
7.13 Ensayos de anticuerpos bactericidas.....	45
7.14 Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀)	46
7.15 Modelo de protección activa.....	47
VIII. RESULTADOS.....	48
8.1 Purificación y caracterización de las porinas OmpC y OmpF.....	48
8.2 Respuesta de anticuerpos inducida por las porinas	49
8.3 Determinación de la vía de inmunización óptima.....	51
8.4 Subclases de IgG presentes en los sueros anti-porinas.....	53
8.5 Importancia efectora de los anticuerpos anti-porinas.....	54
8.6 Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-porinas.....	57
8.7 Efecto del LPS contaminante en la respuesta de anticuerpos bactericidas..	58
8.8 Importancia de la organización antigénica en la respuesta de anticuerpos..	62
8.9 Respuesta de anticuerpos inducida por OmpC u OmpF.....	65
8.10 Función efectora de los anticuerpos anti-OmpC y anti-OmpF.....	68
8.11 Evaluación de la protección activa conferida por las porinas.....	70
IX. DISCUSION.....	72
X. CONCLUSIONES	79
XI. BIBLIOGRAFIA	80
XII. ANEXO PUBLICACIONES.....	94

I. RESUMEN.

En el presente trabajo se estudió la capacidad de las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) de inducir inmunidad humoral de larga duración. Se encontró una respuesta de anticuerpos de clase IgG que persistieron durante toda la vida en ratones BALB/c, sin el empleo de adyuvante. La caracterización de las subclases de IgG observadas durante esta respuesta de larga duración mostró la presencia de IgG2b, IgG1, IgG2a y bajos títulos de IgG3. Las porinas son proteínas muy conservadas, sin embargo la respuesta de anticuerpos de memoria dirigidos contra las porinas de *S. typhi*, no presentaron reactividad cruzada contra *S. typhimurium*. Cabe destacar que los sueros anti-porinas mostraron capacidad bactericida contra *S. typhi*, mediante la unión a su superficie y activación de la vía clásica del complemento (principalmente IgG2b e IgG1), efecto que se mantuvo con títulos altos durante toda la vida en los ratones inmunizados, aunque los títulos de anticuerpos anti-porinas, medidos por ELISA, mostraron un decremento al paso del tiempo. Debido a que la preparación de porinas está compuesta por OmpC y OmpF, también se purificaron en forma individual y se evaluó su capacidad de inducir anticuerpos de larga duración, así como su importancia en conferir protección al reto contra *Salmonella*. Se observó que OmpC y OmpF indujeron títulos altos de anticuerpos, medidos por ELISA, que se mantuvieron durante 300 días (último día analizado). Sin embargo, aunque OmpC generó una respuesta de anticuerpos bactericidas durante 300 días, los títulos bactericidas inducidos por OmpF no se detectaron en el día 180. La inmunogenicidad de las porinas OmpC y OmpF se evaluó mediante experimentos de protección activa. Ratones BALB/c se inmunizaron y retaron con la cepa virulenta de *S. typhi*. Se encontró que OmpC confirió el 100% y 80% de sobrevivencia al reto con 100 y con 500 dosis letales 50 (DL₅₀) de *S. typhi*, mientras que OmpF sólo indujo el 70% y 60% de protección al reto con las mismas dosis, lo que indica que OmpC es el principal componente que genera una respuesta de anticuerpos bactericidas de memoria y es capaz de conferir la mejor capacidad protectora contra *Salmonella*. En conclusión, nuestros resultados demostraron la gran capacidad inmunogénica de las porinas de *S. typhi* de inducir anticuerpos bactericidas de larga duración, sin presentarse reactividad cruzada. Además, las porinas son un ejemplo de una vacuna de subunidades constituida por antígenos proteicos que confieren inmunidad humoral de larga duración sin la necesidad de adyuvante exógeno.

II. ABSTRACT.

We studied the ability of porins from *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) to induce a long-term antibody response in BALB/c mice. These porins induced a strong lifelong production of immunoglobulin G (IgG) in the absence of exogenous adjuvant. Analysis of the IgG subclasses produced during this antibody response revealed the presence of IgG2b, IgG1, IgG2a and weak IgG3. Despite of the high homology among porins, long-lasting anti-*S. typhi* porin sera did not cross-react with *S. typhimurium*. Notably, the anti-porin sera showed a sustained lifelong bacterial killing of *S. typhi* that required the concerted action of IgG binding to live bacteria and complement-dependent bacteriolysis, although the porin-specific antibody titers measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) decreased over time.

Because our porin preparations contained the outer membrane proteins C and F (OmpC and OmpF), we evaluated the individual contribution of each porin to generate long-lasting antibody response and induce active protection against *Salmonella* challenge. OmpC and OmpF induced long-lasting antibody titers, measured by ELISA, which were sustained for 300 days (last point tested). In contrast, although OmpC induced sustained high bactericidal antibody titers for 300 days, the bactericidal antibody titer induced by OmpF was not detected at day 180. The high immunogenicity of OmpC or OmpF were confirmed in active protection assays. Mice were immunized with OmpC or OmpF and challenged against *S. typhi*. OmpC induced 100% and 80% survival to the challenged of 100 and 500 lethal dose 50 (LD₅₀) respectively, while OmpF conferred 70% and 60% to 100 and 500 LD₅₀. These results indicate that OmpC is the main protein responsible for the antibody-mediated memory bactericidal response that mediates active protection to the challenged against *Salmonella*. Taken together, our results show that porins are strong immunogens that confer lifelong specific bactericidal antibody responses in the absence of added adjuvant.

III. INTRODUCCION.

3.1 Fiebre tifoidea.

La fiebre tifoidea es una infección sistémica del hombre causada por la ingestión e invasión intestinal de *Salmonella typhi* (1). Ésta es una bacteria Gram-negativa móvil, que de acuerdo a la clasificación propuesta por Kauffmann (2), posee serologicamente al antígeno somático O (lipopolisacárido) tipo 09, 012, al antígeno flagelar H tipo d y al antígeno capsular Vi expresado en su superficie. La fórmula: 09,12 Vi:d representa la cepa de *S. typhi* en su forma abreviada. Esta clasificación serológica da como resultado la existencia de 2,463 serotipos del género *Salmonella*. Existen otras clasificaciones donde agrupan a *Salmonella* de acuerdo a su homología genética, su relevancia clínica y sus características bioquímicas (3). En 1986, durante el XIV Congreso Internacional de Microbiología, el Comité Internacional en Bacteriología Sistemática perteneciente al Subcomité del Género *Enterobacteriaceae*, acordó un cambio de nomenclatura del género *Salmonella* (4). La nueva nomenclatura la aceptó el Centro para el Control de Enfermedades y Prevención (CDC, Atlanta, GA) y se publicó por primera vez en el libro: “Edward’s and Ewing’s Identification of *Enterobacteriaceae*”, 4ª Edición (5). En la actualidad la nomenclatura del CDC se acepta internacionalmente y se basa en las recomendaciones del Centro de Colaboración perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, la cual se describe a continuación:

3.2 Nomenclatura actual de *Salmonella*.

De acuerdo a la nomenclatura del CDC (3), el género *Salmonella* posee únicamente dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* se subdivide en seis subespecies, que se indican por un número romano y el nombre: I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; VI, *S. enterica* subsp. *indica*. Con respecto a *S. bongori*, no se ha descrito hasta este momento alguna subespecie. Todas las subespecies presentan homología a nivel genómico, pero entre ellas existen diferencias a nivel bioquímico, por lo que se agrupan en subespecies. Con respecto a la nomenclatura de cada serotipo (serovar), el nombre debe de escribirse a continuación de la

subespecie (p.ej. serovar Enteritidis, Typhimurium, Typhi y Choleraesuis). Para indicar que el serovar no es una especie diferente, la primer letra se escribe en mayúscula y la palabra completa en tipo normal. Con respecto a la escritura de los serotipos no identificados, debe de efectuarse de acuerdo a su serología, de acuerdo al siguiente orden: (i) el nombre de la subespecie; (ii) el antígeno somáticos (O); (iii) el antígeno flagelar (H, fase 1) y, (iv) el antígeno flagelar (H, segunda fase) en caso de estar presente. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* pertenecen a *S. enterica* subs. *enterica* (59%) y provocan el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos (6). En resumen, la nomenclatura actual debe de escribirse de acuerdo al siguiente orden: (i) el género (en cursiva) *Salmonella*; (ii) especie (en cursiva) *enterica* o *bongori*; (iii) serovar (primer letra en mayúscula, tipo normal). Por ello, el nombre actual de *Salmonella typhi* debe de escribirse como *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. enterica* serovar Typhi) (3).

3.3 Aspectos históricos.

Thomas Willis describió en 1659 los diferentes signos y síntomas de la fiebre tifoidea. Sin embargo, durante muchos años se confundió con el tifo. En 1782 Ruxham describió las dos enfermedades febriles como entidades clínicas deferentes: la fiebre pútrida maligna (fiebre tifoidea) y la nerviosa lenta (tifo). Jenner en 1850, en su libro titulado: “Sobre la identidad y la no identidad de las fiebres tifoídica y tifosa”, demostró que las lesiones de las placas de Peyer y ganglios linfáticos eran características de la fiebre tifoidea. William Budd estableció en 1868, que la enfermedad era transmitida a través de los alimentos y aguas contaminadas con materia fecal proveniente de individuos enfermos (7, 8).

Eberth describió en 1880 la presencia del bacilo tifoídico en los cortes histológicos de ganglios linfáticos mesentéricos y de hígado de pacientes con fiebre tifoidea. Pfeiffer en 1885 realizó el primer aislamiento del bacilo a partir de las heces. Durante el mismo año, Peiffer y Kolle demostraron que el suero de pacientes en fase convaleciente protegió a cobayos contra el reto del bacilo tifoídico. En 1895, Widal describió la presencia de aglutininas específicas en el suero de paciente con fiebre tifoidea (8).

3.4 Epidemiología.

La fiebre tifoidea es una enfermedad poco frecuente en los Estados Unidos y en Europa, no obstante algunos individuos llegan a enfermarse cuando viajan a las zonas endémicas. Las áreas endémicas se localizan en Asia, África y Latinoamérica, regiones donde el deficiente entorno sanitario, la falta de agua potable y la pobreza generan las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad. El diagnóstico se fundamenta en el cuadro clínico y en la determinación de los títulos de anticuerpos contra los antígenos “O” y “H”, pero se confirma mediante hemocultivo o mielocultivo. Se estima que se presentan 16 millones de casos de fiebre tifoidea en el mundo anualmente, probablemente esta cifra podría llegar a los 33 millones y provocar 600,000 muertes (9). En América Latina, se presentan alrededor de 595,000 casos al año; de éstos 197,000 casos se complican y ocasionan aproximadamente 10,000 muertes. En México, en el 2005 se reportaron 29,910 casos, con una tasa de 28.09 casos/100 mil habitantes (10). Esto significa que en nuestro país la fiebre tifoidea ha presentado una tendencia ascendente, debido a que durante el 2001 y 2002 se registraron 7,543 y 7,889 casos respectivamente (10). En los años siguientes 2003 y 2004 se presentaron 20,020 y 24,759 casos respectivamente, demostrando el incremento de la enfermedad a nivel nacional (10). El grupo de edad mas afectado por la enfermedad es el de los 15 a 44 años, donde se presentan aproximadamente el 58% de los casos.

3.5 Patogenia.

La enfermedad se caracteriza por fiebre en el individuo, la replicación de la bacteria y la inflamación del sistema linfático asociado a mucosas del intestino. Durante las etapas crónicas de la infección, se presenta necrosis hemorrágica en las placas de Peyer, con úlceras y perforaciones intestinales acompañadas de peritonitis y septicemia (1). En voluntarios humanos, la dosis de infección varía entre 1×10^5 – 1×10^9 bacterias (8), siendo los primeros síntomas el vómito y el dolor abdominal (12-72 h). Después de un periodo de incubación de 5-9 días, el siguiente síntoma es la fiebre.

La infección natural por *Salmonella* se efectúa por la vía oral, continua su trayecto hacia el estómago donde la bacteria posee la capacidad de resistir al pH ácido (1). Posteriormente llega al intestino delgado, donde de acuerdo a modelos experimentales, se adhiere a las células M y enterocitos mediante diversas fimbrias denominadas Lpf, Fim, Agf y Pef (11-13). Las células M son células especializadas que se encuentran en el epitelio asociado al folículo que recubre las placas de Peyer, cuya principal función es la captura de antígenos del lumen intestinal hacia los folículos linfoides gracias a su elevada capacidad pinocítica (14). También se ha reportado la internalización de *Salmonella* mediante el receptor que regula la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) (15). Hay evidencias que muestran que existe un mecanismo alternativo de invasión por parte de *Salmonella*, mediante su captura por células dendríticas presentes en los folículos linfoides del intestino (16) y su transporte hacia el torrente sanguíneo mediante una subpoblación de células fagocíticas CD18⁺ (17).

El proceso de invasión de *Salmonella* se caracteriza por la activación específica de genes en la bacteria, ocasionando en las células epiteliales la reorganización de su membrana y el citoesqueleto provocando la formación de proyecciones citoplasmáticas “ruffles”, que permiten la captura de la bacteria llevándola a compartimentos fagosomales (18). Estos efectos en las células son ocasionados por SopE, SopB, SipA, SptP, etc., que son factores bacterianos que se translocan mediante el sistema de secreción tipo 1 (TTSS-1) (19-21). Una vez que la bacteria atraviesa el epitelio, se dirige a los folículos linfoides de las placas de Peyer donde activa a más genes de virulencia. En este sitio *Salmonella* posee la capacidad de infectar a las células de la estirpe mieloide, en especial a los macrófagos (8, 22). Sin embargo, también puede llegar a infectar a las células polimorfonucleares (GR1⁺) (23) y células dendríticas (CD11c⁺, MCH-II⁺) (24). Entre los genes más importantes que activa durante esta fase, se encuentran una pareja de sensor-cinasa/activador transcripcional (PhoP/PhoQ). Al ser fosforilado, PhoQ activa a los genes *pag*ABCD y reprime a los genes *prg* (25, 26). Estos genes son activados en el fagolisosoma de los macrófagos, el más estudiado de ellos es *pagC* que permite la sobrevivencia dentro del macrófago (27). La principal característica de la expresión coordinada de los genes *pag* es inhibir el descenso del pH dentro del fagolisosoma. Las bacterias así contenidas en las células infectadas, evaden la acción del complemento (28) y la actividad del estallido respiratorio de las células polimorfonucleares (PMN), en particular de los neutrófilos (29).

Una vez que la bacteria ha infectado a los macrófagos, se dirige a los ganglios mesentéricos donde se induce una inflamación local debido a la producción de interleucina 1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18) y TNF- α (1, 30). Posteriormente, la bacteria se multiplica y mediante la activación de la caspasa-1 (30), induce la apoptosis en los macrófagos y se libera al torrente sanguíneo, ocasionando una bacteremia primaria (1, 8, 30). Una vez en la sangre, la bacteria llega al hígado y al bazo donde puede multiplicarse nuevamente e inducir apoptosis en las células infectadas para regresar a la circulación sanguínea ocasionando una bacteremia secundaria (1, 8). Eventualmente, *Salmonella* puede reinfectar otra vez las placas de Peyer provocando inflamación, úlceras y daño celular (necrosis y apoptosis) (1). La trombosis capilar de las placas de Peyer puede ocasionar hemorragias, generalmente durante la segunda semana de infección acompañada de ulceración y de perforación intestinal durante la tercera semana (31). Estos síntomas eventualmente ocasionan peritonitis y septicemia, siendo esta última la causa mas frecuente de muerte en los individuos con fiebre tifoidea (23). La mortalidad se presenta en el 1-5% de los pacientes. Sin embargo, si no se administra un tratamiento inmediato en aquellos pacientes quienes presentan perforaciones intestinales, el índice de mortalidad puede llegar al 40-83%.

Aproximadamente el 1-6% de los pacientes que presentaron fiebre tifoidea se vuelven portadores crónicos (generalmente la bacteria se localiza en la vesícula biliar), estado en el que se persiste durante toda la vida. Estos individuos liberan bacterias contenidas en las heces durante años sin mostrar síntomas de la enfermedad. Por ello, la detección de los portadores y el mejoramiento de las condiciones higiénicas, es esencial para el control y prevención de la fiebre tifoidea. Una vez que se presenta la enfermedad, el tratamiento inmediato con antibióticos es importante para controlar la infección. Sin embargo, se ha reportado la existencia de cepas resistentes a la ampicilina, el cloramfenicol y el trimetropim-sulfametoxazol y recientemente también a las quinolonas, siendo aún más complicado el tratamiento de esta enfermedad (32, 33). Por ello, una alternativa efectiva para la prevención de esta enfermedad es la vacunación, que tiene como propósito el impedir la infección de *S. enterica* serovar Typhi y de este modo disminuir la severa mortalidad y morbilidad que presenta esta enfermedad.

3.6 Vacunas para la fiebre tifoidea.

La primera inmunización experimental con una suspensión de microorganismos vivos de *S. enterica* serovar Typhi se realizó en conejos por Frankel y Simmons en 1886. Posteriormente se efectuó en ratones por Bauner y Pfeiffer en 1887. Klikovich empleó bacterias muertas con el mismo propósito. Esto indujo a Wright en Inglaterra y a Pfeiffer y Kolle en Alemania, a emplear por primera vez en 1897, una vacuna inactivada para la inmunización en humanos. Cuando estas vacunas se aplicaron en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica, se observó una disminución significativa de la morbilidad, así como la disminución de los síntomas en los individuos vacunados que desarrollaron la enfermedad (34).

En 1925, Besredka propuso el empleo de vacunas aplicadas por vía oral, elaboradas a partir de bacterias completas. El efecto de las mismas se evaluó en el ejército francés, donde desafortunadamente se presentó un alto índice de mortalidad en los individuos vacunados (34). Las vacunas anti-tifoídicas hechas a base de bacterias muertas continuaron utilizándose durante décadas sin conocerse su efecto protector real, ya que se carecía de modelos experimentales para analizar su eficacia, además de que no se lograba correlacionar el efecto protector con algún indicador serológico. Actualmente, las vacunas disponibles contra la fiebre tifoidea se dividen en tres clases:

a) Vacunas de bacterias muertas: vacuna parenteral K (muerta por acetona) y vacuna parenteral L (muerta por calor-fenol).

En 1955, bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guyana, Polonia y la Unión Soviética, con el objetivo de analizar la eficacia de las vacunas elaboradas a base de células completas de *S. enterica* serovar Typhi muertas con acetona (vacuna K) y calor-fenol (vacuna L). Estos estudios demostraron que la vacuna K fue la mejor y la protección era mayor cuando se aplicaban dos dosis (35-38). Posteriormente, se demostró que la vacuna K confirió un 79-88% de protección, mientras que la vacuna L indujo una protección del 51-77% (39).

El hecho de que estas vacunas parenterales presentaron efectos secundarios indeseables entre ellos la fiebre, el malestar general, el eritema en el lugar de la vacunación y dolor, además de la inducción de una baja inmunidad celular (40), motivo la búsqueda de nuevas vacunas, como lo son:

b) Vacuna de bacteria atenuada: vacuna oral Ty21a.

La vacuna atenuada de *S. enterica* serovar Typhi Ty21a, la desarrolló por Germanier mediante mutagénesis química (41). A partir de la cepa tipo silvestre, por tratamiento con el agente mutagénico nitrosoguanidina, se seleccionó una mutante (*galE*) que careció completamente de la actividad enzimática uridin difosfato (UDP-galactosa 4-epimerasa), esta enzima participa en la síntesis de galactosa que forma parte del antígeno O del LPS (42). Cuando se crece esta cepa en la ausencia de galactosa, no expresa el antígeno O. En cambio, en presencia de galactosa exógena se metaboliza por otras enzimas, pero debido a la carencia de la enzima, se acumula un exceso de galactosa-1-fosfato y UDP-galactosa, que ocasiona una acumulación de intermediarios que matan a la bacteria por lisis. Posteriormente, también se encontró que la cepa Ty21a no es capaz de sintetizar el antígeno capsular Vi (43).

La eficacia de esta vacuna se comprobó en estudios de campo realizados durante 1978-1990. En Egipto, niños de 6 a 7 años recibieron un esquema que incluía tres dosis en una semana, a quienes previamente se les neutralizó la acidez gástrica con 1 g de NaHCO₃. Se encontró que esta vacuna indujo una protección del 96% de la población vacunada al cabo de 3 años de seguimiento (44). Cuando se aplicó en Chile, bajo una diferente formulación: tres dosis de la vacuna liofilizada administrada durante una semana en cápsulas cubiertas resistentes a ácido, confirió una protección del 67% durante 3 años y del 63% de protección por un periodo de 7 años (45). Estas diferencias en la protección conferida por esta vacuna en Egipto y Chile, pueden atribuirse no solo a la diferente formulación y fondo genético de la población de estudio, sino al hecho de que en Chile la incidencia de la fiebre tifoidea es el doble (103/100,000 habitantes) en comparación con Egipto (46./100,000 habitantes) (39). Esto sugiere que probablemente la infección y los mecanismos de transmisión de la enfermedad difieren entre los dos países.

A finales de los 80's el Instituto Suizo de Vacunas y Sueros obtuvo una formulación nueva que consistió en dos partes: una que contenía la dosis de la vacuna liofilizada y otra que contenía un amortiguador. Se mezclan los dos contenidos en 100 ml de agua y se ingiere la suspensión. Para comparar la eficacia de esta formulación se realizó un estudio comparativo en Santiago de Chile (46) y otro paralelo en Indonesia (47). Esta vacuna administrada en suspensión resultó ser más efectiva que la vacuna en cápsulas; sin embargo, los mejores resultados se encontraron con 4 dosis (46). En los 90's se aceptó el uso de esta formulación en muchos países.

Estudios posteriores demostraron que la respuesta inmune inducida por la vacunación con Ty21a consiste en el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra el antígeno O. En voluntarios se encontró que la vacuna induce la generación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria, además se presentó la expresión de moléculas de "homing" (integrina α y β -7) (48). Estos resultados se confirmaron posteriormente y además se observó la presencia de células T CD8⁺ efectoras, productoras de IFN- γ con capacidad de destruir a las células infectadas (49).

En resumen, la vacuna Ty21a es bastante exitosa debido a su fácil administración por la vía oral e induce una respuesta sistémica y local de la respuesta inmune humoral y celular, además de que es bien tolerada en humanos. No obstante, sus desventajas son la necesidad de 3-4 dosis y la generación de protección corta lo que hace que se requiera un refuerzo cada 5 años (42, 43, 50).

c) Vacuna de subunidades: vacuna parenteral a base del antígeno capsular Vi.

El polisacárido Vi es un homopolímero lineal del ácido α -1,4-2-desoxi-2-N-acetilglucosamina que cubre a la bacteria como un antígeno capsular. Los primeros estudios se remontan al año 1934 cuando Felix y Pitt reportaron la presencia del antígeno Vi en cepas de *S. enterica* serovar Typhi aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, así como la presencia de anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno en el suero de estos mismos pacientes (51-53). El antígeno Vi es un factor de virulencia que impide el reconocimiento de anticuerpos anti-antígeno O y evita la activación de la cascada del complemento y la fagocitosis (54). La participación del antígeno Vi en la generación de protección la efectuó Landy en 1954, cuando logró purificar el antígeno Vi y encontró que fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos, pero no confirió

protección en ensayos experimentales de reto en chimpancés y en voluntarios (55). Este resultado controversial obtuvo una respuesta años más tarde, el antígeno Vi que purificó perdió los grupos O-acetilo y N-acetilo, lo que sugirió que la forma nativa le confieren la inmunogenicidad a este polisacárido (56, 57). En 1974, Wong logró purificar al antígeno Vi sin desnaturalizarlo y realizó los primeros estudios de inmunogenicidad, en modelos experimentales (58). Finalmente, durante los 80's Robbins desarrolló dos preparaciones del antígeno Vi no desnaturalizado, uno fue hecho por el Instituto Nacional de la Salud de EU (NIH) y otro por el instituto Merieux en Lyon, Francia. La seguridad y la inmunogenicidad de las ambas preparaciones se evaluaron en estudios de campo. Debido a que la preparación del Instituto Merieux contenía 0.2% de LPS y no causó efectos adversos, se optó por utilizarse en estudios de campo posteriores (59). En estudios de campo en Nepal y Sudáfrica, los resultados señalaron que cuando se administró el antígeno Vi por vía subcutánea, no solamente indujo elevados títulos de anticuerpos, sino que confirió una protección del 72% y 64%, respectivamente (60, 61).

Esta vacuna es una de las más empleadas en el mercado, se administra a las personas que van a viajar a las zonas endémicas de fiebre tifoidea. El esquema de inmunización consiste en una dosis subcutánea de 25 µg, en personas mayores de 2 años, y la generación de protección se observa a los 7-10 días posteriores de la inmunización (50, 62). Sin embargo, la desventaja del polisacárido Vi es la de ser un antígeno timo-independiente que no induce la generación de memoria inmunológica (50, 62). Por esta razón, se requieren refuerzos cada 3 años. Además, como otros polisacáridos, el antígeno Vi es marcadamente menos inmunogénico en niños y bebés menores de 24 meses en quienes se observa una respuesta de anticuerpos débil y de corta duración (50). Por ello, se ha desarrollado una nueva vacuna que consiste en la conjugación del antígeno Vi a la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados encontrados fueron alentadores: bien tolerada y altamente inmunogénica en adultos y niños de 2-4 años (63, 64). Se deben aplicar al menos dos inmunizaciones para observar el incremento de la inmunogenicidad del conjugado. Sin embargo, recientemente en la India se han reportado cepas de *S. enterica* serovar Typhi que carecen del antígeno Vi y que causaron fiebre tifoidea, por ello la utilización de la vacuna a base del polisacárido Vi sería ineficaz en esta región (65).

Actualmente se disponen de varias vacunas contra la fiebre tifoidea, desafortunadamente en todas ellas se necesita la aplicación de un refuerzo al cabo de 4-5 años. Incluso, este refuerzo debe de aplicarse cada 3 años en los individuos con alto riesgo, como lo son el personal de laboratorio e individuos quienes tengan contemplado viajar a zonas endémicas. En conclusión, ninguna de las vacunas antes descritas es capaz de inducir una memoria inmunológica. Por lo anterior, surge la necesidad de caracterizar a nuevos antígenos que pudieran ser empleados en el desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre tifoidea, enfocándose a identificar a antígenos que pudieran generar una inmunidad de memoria. Entre los antígenos inmunodominantes que expresa *Salmonella* y que pudieran ser buenos candidatos en la inducción de inmunidad de memoria se encuentran las proteínas de membrana externa (PME) llamadas porinas.

3.7 Proteínas de la membrana externa (PME).

Schnaitmann fue el primero en caracterizar a una proteína que constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana externa en *E. coli* (66). Poco después, él y otros investigadores demostraron por electroforesis que esa proteína en realidad eran cuatro (67-69). Actualmente se conoce que el número de las proteínas de membrana externa (PME) es variable y depende de la información genética de la bacteria. Su expresión puede verse afectada por diferentes factores como son las condiciones de cultivo, la temperatura, la osmolaridad, el pH, etc. (70). En 1978 Di Rienzo, Nakamura e Inouye, y posteriormente en 1980 Osborn y Wu efectuaron una clasificación de las PME en principales y menores (71, 72).

- 1) **Proteínas principales.** Reciben este nombre porque pueden llegar a expresarse en más de 100,000 moléculas/bacteria. Se dividen en dos siguientes grupos.
 - a) **Proteínas matrices o porinas.** Poseen un peso molecular entre 36,000-42,000 Da. Su función es la de participar en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana externa. Como ejemplo de estas proteínas se encuentran OmpC, OmpF, OmpD y PhoE (73).

- b) **Proteína modificable por el calor (OmpA).** Esta proteína presenta una estructura nativa en forma monomérica (35,000 Da). Cuando se calienta a 100°C, en presencia de SDS, se desnaturaliza y de ahí que reciba el nombre de proteína modificable por el calor. Su función es la de participar en los procesos de conjugación y para mantener la integridad estructural de la membrana externa. Además se ha descrito como receptor para fagos y colicinas (73, 74).
- c) **Lipoproteína de Braun.** Es una proteína con un peso molecular de 7,200 Da. Su extremo carboxilo está unido covalentemente a la peptidoglicana, mediante sus grupos ϵ -amino. Debido a esta característica, su principal función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana externa (75).
- 2) **Proteínas menores.** Con respecto a este grupo de proteínas se ha demostrado su función como acarreadores durante el transporte de sustancias de alto peso molecular, además de estar involucradas en la división celular. Como ejemplo de este grupo de proteínas se encuentra la única proteína de membrana externa que posee actividad de fosfolipasa A (71, 72).

Existe otra clasificación funcional de las PME de acuerdo a su participación en el transporte específico de algunas moléculas. Esta clasificación es la siguiente:

- 1) **Canales específicos.** Existen tres ejemplos representativos de este grupo. El primero de ellos es la proteína LamB (receptor para el fago λ ; 47,393 Da) que participa en el transporte de maltosa a través de la membrana externa. El segundo ejemplo es el receptor del fago T6 (31,418 Da), codificado por el gene *tsx* que permite el paso de nucleósidos. El último ejemplo es la proteína ScrY (55,467 Da) que está codificada en un plásmido y su función es la de permitir el paso de sacarosa (73).
- 2) **Receptores de alta afinidad.** La función de este grupo de proteínas es el transporte específico de moléculas a través de la membrana externa con altas constantes de afinidad ligando-receptor. Por ejemplo, la proteína BtuB (66,400 Da) que transporta a la vitamina B12 presenta una K_d de 3 nM, esto induce una acumulación la vitamina en el periplasma de la

bacteria con una concentración de 1,000 veces mayor con respecto a la del medio. Entre otros ejemplos se encuentran la proteína FhuA (78,992 Da) que transporta ferricromos y FadL (45,969) que participa en el transporte de ácidos grasos (73).

En la figura 1 se muestra esquemáticamente la disposición de los principales componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y arreglo de las principales proteínas de la membrana externa.

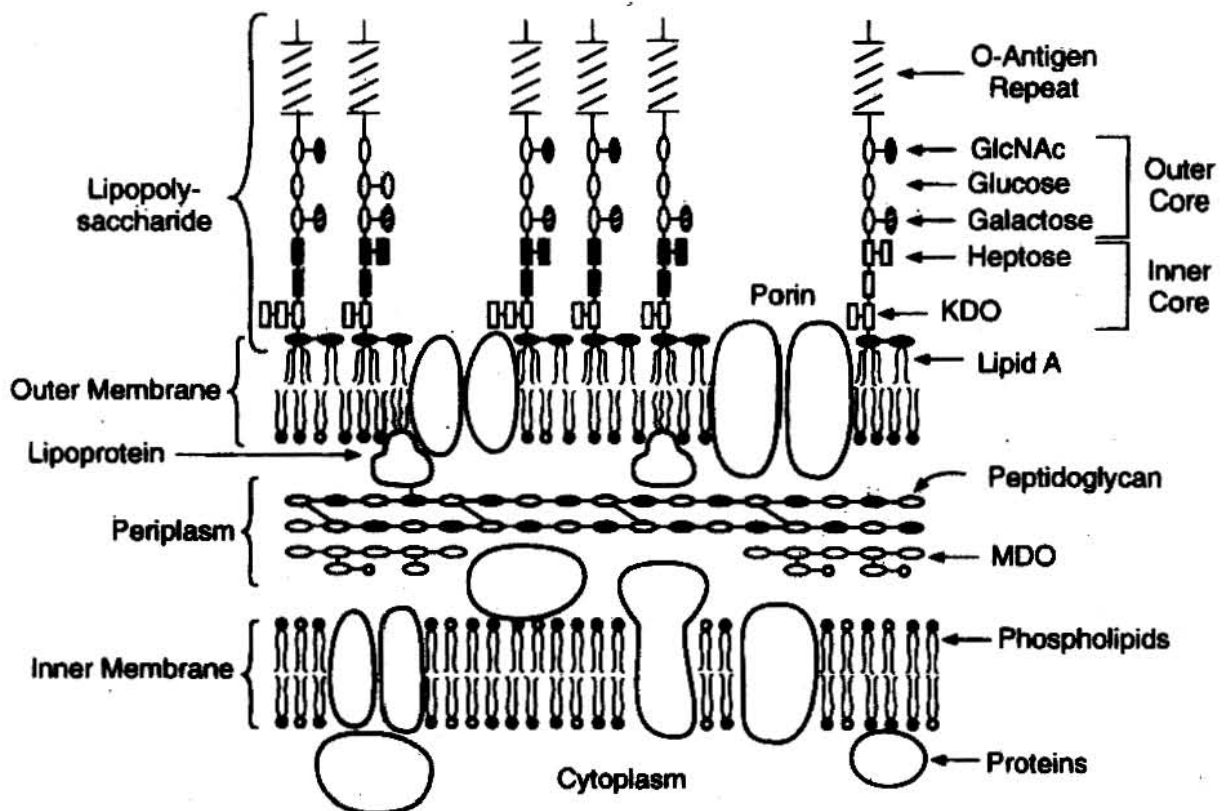


Figura 1. Representación esquemática de la organización molecular presente en la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas. Los principales componentes se indican como: ME, membrana externa; PME, proteínas de membrana externa; LPS, lipopolisacárido; FL, fosfolípidos; PD, peptidoglicano; MC, membrana citoplasmática.

3.8 Porinas.

Las porinas son las proteínas principales de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, en cada bacteria se expresan 10^5 moléculas de porinas (73). Poseen pesos moleculares de 36-42 kDa, por lo tanto 10^6 - 10^9 bacterias expresan una concentración de porinas de 500 ng ml^{-1} a $20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ (0.02-0.8 mM) (76). La función de las porinas es la de ser uno de los principales componentes activos de la membrana externa porque funcionan como un filtro molecular que permite el paso de nutrientes y simultáneamente son una barrera hacia antibióticos, sales biliares, defensinas, etc. Se ensamblan como trímeros y forman poros o canales que permiten la difusión inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas (nutrientes) al interior de la bacteria. Las estructuras de las porinas presentan una gran estabilidad al efecto de sales biliares y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas (73). En las bacterias Gram-negativas, las porinas son una de las proteínas con mayor homología y sólo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos. La alta homología de las porinas se confirmó mediante la reactividad cruzada en el reconocimiento de diferentes porinas de *S. enterica* serovar Typhimurium y *E. coli* por anticuerpos monoclonales (77).

Las porinas caracterizadas en *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium son OmpC, OmpF y PhoE, las cuales se expresan en ambas bacterias. Sin embargo, existe otra porina denominada OmpD que únicamente se presenta en *S. enterica* serovar Typhimurium (73). Con respecto a *S. enterica* serovar Typhi, esta cepa expresa en su superficie a las porinas OmpC y OmpF (78). Además, también expresa a las porinas OmpS1 y OmpS2 las cuales se producen en bajas concentraciones (79-81). En la Tabla 1 se resumen las principales características de las porinas presentes en *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Typhi.

Tabla 1. Características principales de las porinas presentes en la familia *Enterobacteriaceae*.

Nombre	Peso Mol.	Posición	Expresión en:			Regulación en la síntesis:	
			<i>E. coli</i> K-12	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
OmpC	37,083	47	+	+	+	Inducción en alta osmolaridad	Inducción en alta y baja osmolaridad
OmpF	38,306	21	+	+	+	Represión en alta osmolaridad	Represión en alta osmolaridad
OmpD	38,000	28	-	+	-	Dependiente de AMPc	-
PhoE	36,782	6	+	+	+	Inducción por Pi	Inducción por Pi
OmpS1/ OmpS2	?	?	?	?	+	?	OmpS1: Represión en alta osmolaridad OmpS2: Inducción por LeuO

3.9 Estructura de las porinas.

Las porinas están formadas por trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a la estructura de un barril (figura 2). La entrada del poro la delimitan las largas prolongaciones del cilindro que, al inclinarse hacia el centro del canal, restringen su acceso. A la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior. Esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones hacia el otro extremo, el cual se dirige hacia el espacio periplasmático de la bacteria (82).

Hasta el momento sólo se disponen de las estructuras cristalográficas de las porinas OmpF y PhoE de *E. coli* efectuadas a 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente (82), en ellas se señala que la unidad estructural (monómero) la forma un barril o cilindro con estructuras β plegadas formadas por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas con sus extremos por 8 asas larga externas y 8

asas cortas hacia el espacio periplásmico, también presentan algunas α -hélices intercaladas (figura 3). El cilindro se forma al cerrarse las estructuras β de manera pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1, ambos son residuos de alanina y fenilalanina muy conservados entre las porinas. Aunque se ha logrado la cristalización de la porina OmpC de *E. coli* (4.0 Å) y *S. enterica* serovar Typhi (7.0 Å), ambos cristales son inestables para su difracción por rayos X debido a la impureza de las preparaciones proteicas, principalmente por la contaminación con LPS, lo que implica que por el momento no se dispongan de datos exactos sobre la estructura terciaria y cuaternaria de las porina OmpC (83, 84).

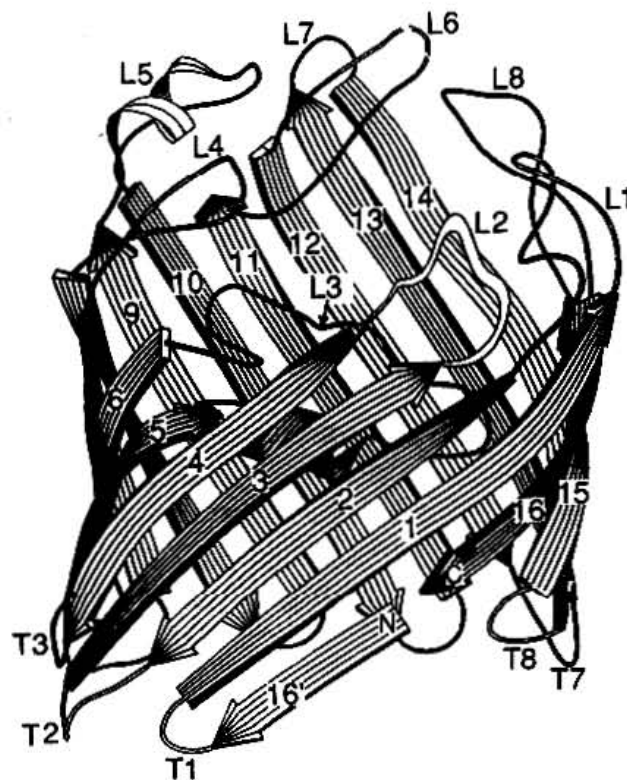


Figura 2. Modelo tridimensional de la porina OmpF de *E. coli*. Estructura definida por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.4 Å. Tomado de Cowan, S. W. y col.¹ L, asas externas; T, asas internas; N, extremo amino terminal; C, extremo carboxilo terminal.

¹ Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. y Rosenbusch, J.P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. Nature 358: 727-733

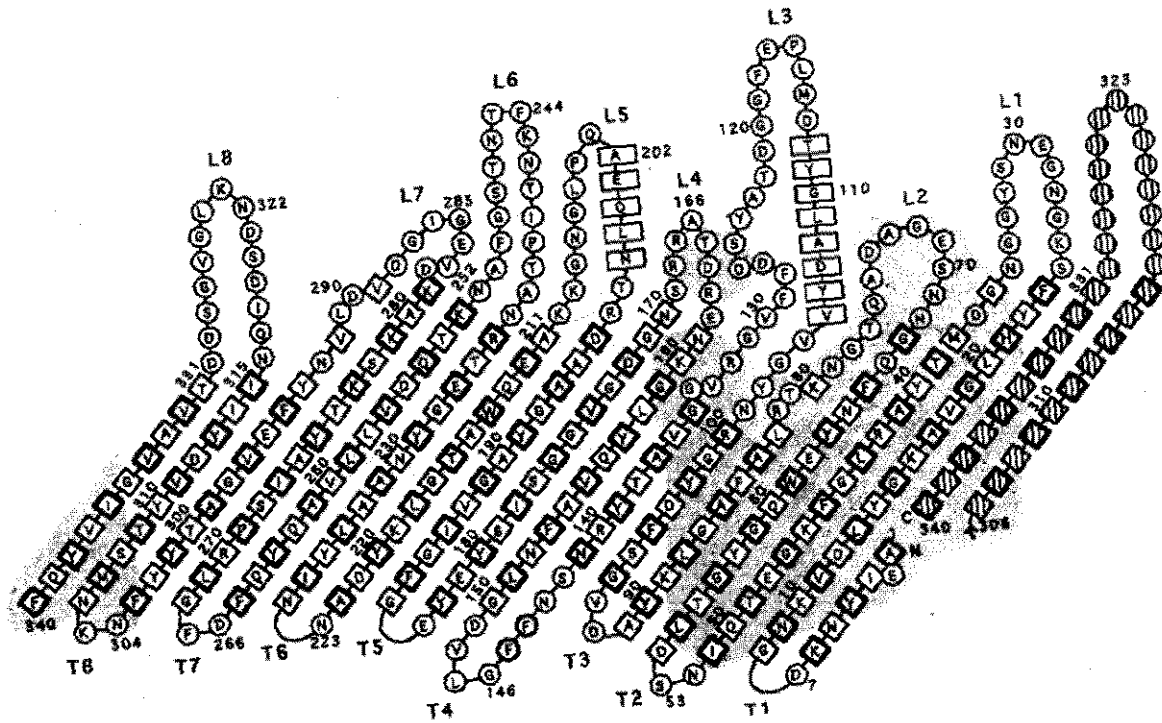


Figura 3. Estructura secundaria de la porina OmpF de *E. coli*. Estructura definida mediante el código de aminoácidos de una letra. Los aminoácidos dentro de un rombo representan a la hojas β -plegadas (en negritas si el residuo se encuentra en disposición externa), los rectángulos muestran a los residuos contenidos en las regiones de α -hélices y los círculos señalan a los aminoácidos que conforman a las asas. Las dos últimas hojas β -plegadas están repetidas para indicar la estructura cíclica de la porina. Tomado de Cowan, S. W. y col.² L, asas externas; T, asas internas.

² Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. y Rosenbusch, J.P. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358: 727-733.

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, el cual está rodeado por dos cinturones de aminoácidos aromáticos que por su interacción con la membrana le permiten anclarse a la misma (85). La entrada del poro está restringida por las asas largas y dispares que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 Å a 19Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15 x 22 Å y está definida por las vueltas β . El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre las diferentes porinas se localiza en las 8 asas externas, y por lo tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros (82). En la figura 4 se representa la estructura de las porinas en forma tridimensional, donde puede apreciarse la disposición espacial del trímero en una vista superior.

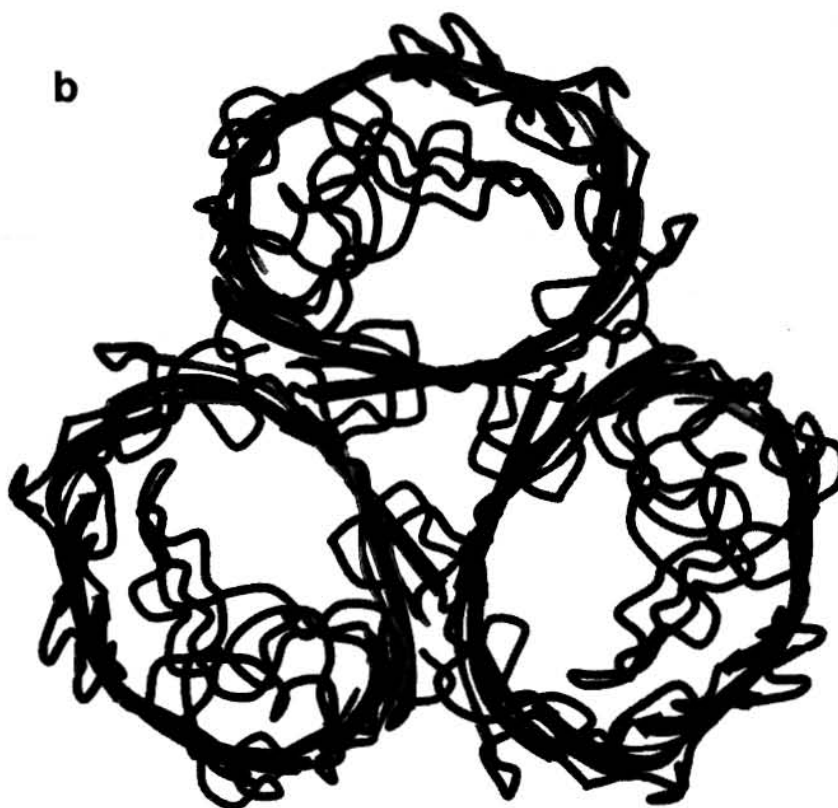


Figura 4. Modelo tridimensional de la porinas. Disposición espacial propuesta para las porinas basado en la estructura definida por cristalografía de rayos X, en vista superior del trímero. Tomado de Schirmer, T.³

³ Schirmer, T. 1998. General and specific porins from bacterial outer membranes. *J Struct Biol* 121: 101-109.

La presencia del LPS es importante para el ensamblaje de las porinas en el espacio periplásmico, para posteriormente incorporarse en forma de trímeros en la membrana externa de la bacteria. Esto se concluye por el hecho de que cepas mutantes de *E. coli* carentes en la expresión del antígeno O no son capaces de expresar a las porinas OmpC y OmpF en su membrana (86). La fuerte interacción del LPS con alguna PME, la logró demostrar Ferguson y cols al cristalizar FhuA a 2.7 Å de resolución. FhuA es una proteína constituida por 22 regiones β -plegadas antiparalelas que la bacteria emplea como receptor para el hierro-ferricromo. A esta proteína de membrana externa se le asocia una molécula de LPS en unión no covalente a la región transmembranal de FhuA (87) (figura 5). Estas evidencias sugieren que el LPS es una molécula muy importante en la conformación estructural de las PME.

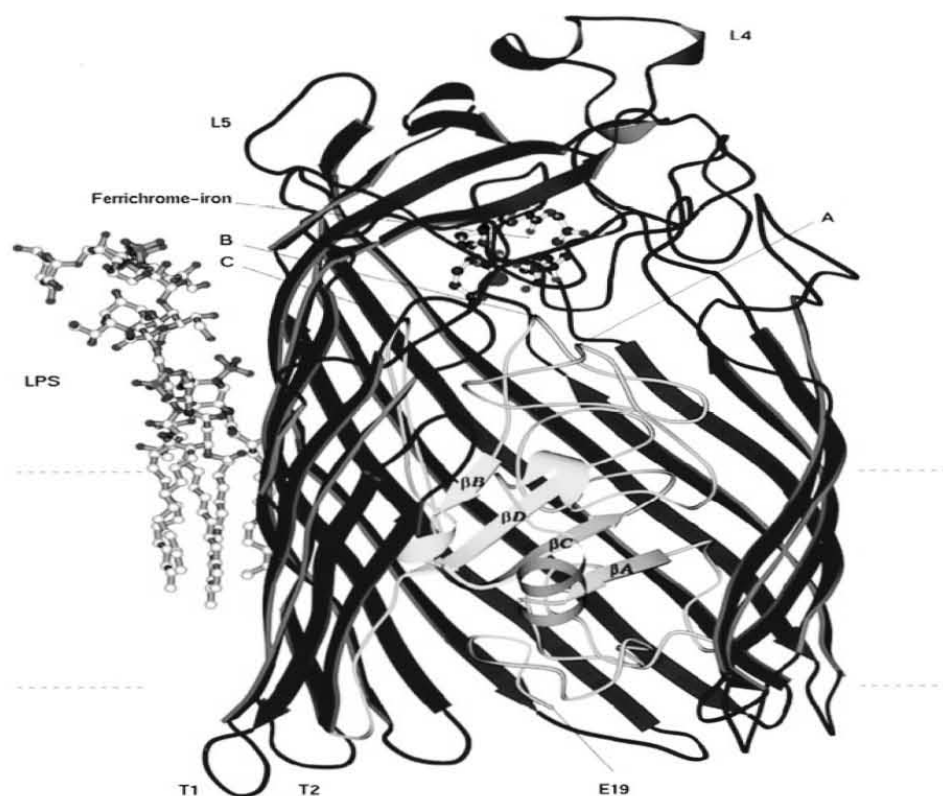


Figura 5. Modelo tridimensional de FhuA-LPS. Estructura definida por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.7 Å, donde puede apreciarse la unión no covalente de una molécula de LPS a FhuA. Tomado de Ferguson, A.D. y col.⁴ LPS, lipopolisacárido; Ligando: hierro-ferricromo.

⁴ Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. Y Welte, W. 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282: 2215-2220.

3.10 Las porinas de *Salmonella* como antígenos protectores.

Debido a que las porinas están expuestas al medio externo, indica que estas proteínas pueden ser el blanco de los anticuerpos y funcionar así como antígenos en el desarrollo de vacunas contra la fiebre tifoidea. Además los antígenos proteicos ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de diferente isotipo y mayor afinidad, activar la respuesta inmune celular y favorecer una respuesta inmune de memoria, siendo este último aspecto un concepto muy importante para el desarrollo de una vacuna.

Las primeras evidencias que sugirieron que las porinas podían emplearse como inmunógenos protectores se remontan a los estudios de Kuusi y cols, quienes demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de *S. enterica* serovar Typhimurium confirieron protección al reto con una cepa lisa homóloga en un modelo murino. También encontraron que la capacidad de inducir protección dependía, en parte, de la producción de anticuerpos debido a que la transferencia pasiva de éstos confirió protección (88, 89).

En el estudio de la fiebre tifoidea, un problema radica en que *S. enterica* serovar Typhi es patógena solo en el humano y en chimpancés (90, 91). Esta desventaja impide o hace costoso el efectuar estudios *in vivo* de protección. El modelo experimental aceptado para el estudio comparativo de los mecanismos de virulencia y patogenicidad, es el ratón infectado por *S. enterica* serovar Typhimurium (92). Sin embargo, la gran desventaja de dicho modelo es que la cepa infectante difiere de la patógena natural del humano. En 2001 se publicó la secuencia completa de *S. enterica* serovar Typhi (4,809,037 pb) y se reportó que esta bacteria posee 601 genes que únicamente se presentan en *S. enterica* serovar Typhi con respecto a *S. enterica* serovar Typhimurium, lo que representa el 13.1% de su genoma (93). La infección con *S. enterica* serovar Typhimurium en ratones produce reacciones febriles, infección sistémica y ausencia de diarrea, debido un infiltrado de células mononucleares en el intestino delgado (3-5 días) e incremento de la temperatura (4-8 días) (94). En cambio, la infección de *S. enterica* serovar Typhimurium en humanos ocasiona enterocolitis caracterizada por diarrea, vomito y dolor abdominal a las 12-72 hrs posteriores de la infección. Durante la enterocolitis, la bacteria permanece en intestino y ganglios mesentéricos por lo que la infección sistémica (bacteremia) es

un síntoma poco frecuente. Además el infiltrado lo constituyen principalmente los neutrófilos que provocan necrosis en el íleo terminal y en el colon (94). En conclusión, esto sugiere que la infección causada por *S. enterica* serovar Typhimurium en ratones y humanos presentan diferentes síntomas y patologías, por lo que probablemente la respuesta inmune hacia *S. enterica* serovar Typhimurium pudiera ser diferente en el ratón y los resultados obtenidos tal vez sean difíciles de extrapolar al humano.

No obstante, para determinar la eficacia protectora de las vacunas anti-tifoídicas, algunos investigadores prefieren emplear el modelo de ratón de infección con *S. enterica* serovar Typhi que consiste en inyecciones intraperitoneales de *S. enterica* serovar Typhi suspendida en mucina (95-98). La administración de la bacteria en mucina, induce una inflamación local que permite que los macrófagos residentes en la cavidad peritoneal sean susceptibles a la infección por el serotipo Typhi (99). Empleando este modelo, Isibasi y cols analizaron el papel que poseen la PME de *S. enterica* serovar Typhi en la inducción de protección activa contra el reto de la bacteria homóloga, así como la capacidad que poseen los anticuerpos anti-PME de conferir protección pasiva al ratón. Este modelo consistió en inmunizar por la vía intraperitoneal (i.p.) a ratones de la cepa NIH, con una preparación de 30 µg de PME del serovar Typhi en los días 0 y 15. En el día 25 los ratones fueron infectados con diferentes dosis letales 50 de *S. enterica* serovar Typhi ($1 \text{ DL}_{50} = 1.5 \times 10^5$). Los resultados obtenidos demostraron que las PME confirieron protección específica del 100% al reto con 1,000 DL_{50} de *S. enterica* serovar Typhi y una protección cruzada del 20% al reto con 1,000 DL_{50} de *S. enterica* serovar Typhimurium, debido probablemente a la homología que existe entre las porinas de las dos especies de *Salmonella*. Además la protección esta mediada, al menos, por los anticuerpos, debido a que el suero de conejo anti-PME confirió el 100% de protección al reto con 100 DL_{50} (96). En humanos, Verdugo y cols encontraron anticuerpos de clase IgG (60%), IgM (20%) e IgA (12%), en los sueros de pacientes con fiebre tifoidea en la fase aguda (primer semana de síntomas clínicos), que reconocieron a las PME de *S. enterica* serovar Typhi (100, 101).

Debido a que las PME son una mezcla de alrededor de 17 bandas proteicas que presentan pesos moleculares entre los rangos de 36-42 kDa, 23-28 kDa y proteínas menores a 17 kDa, fue necesario caracterizar cual de todas estas proteínas tenían mayor relevancia en la protección. Los

primeros datos los aportó Calderón y cols quienes mediante ELISA observaron la inducción de anticuerpos anti-porinas de clase IgG e IgM en los sueros de pacientes con fiebre tifoidea (102). Posteriormente, Ortiz-Navarrete y cols mediante la técnica de Inmunoblot encontraron la presencia de anticuerpos de clase IgG, en los sueros de pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda, que reconocieron las proteínas de membrana externa de 36-42 kDa, es decir a las porinas (103). Estos resultados sugirieron que las porinas podían ser uno de los principales antígenos inmunodominantes que se reconocen durante la fiebre tifoidea y, por lo tanto podrían generar protección.

Para evaluar la capacidad protectora de las porinas, Isibasi y cols purificaron a las porinas de *S. enterica* serovar Typhi y encontraron que confirieron protección del 90% al reto con 500 DL₅₀ del serovar Typhi (104). En cambio, no se indujo protección al reto con *S. enterica* serovar Typhimurium bajo las mismas condiciones, lo cual demuestra una respuesta específica de especie a las porinas (104). De igual forma, Paniagua-Solis y cols evaluaron la participación de los anticuerpos en los mecanismos de protección inducidos por las porinas y observaron que el empleo de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL₅₀ del serovar Typhi (105). Poco después, Isibasi y cols purificaron a la porina OmpC en forma recombinante (OmpC_r), a partir de la cepa de *E. coli* UH302 la cual carece de la expresión de porinas endógenas; ellos encontraron que OmpC_r confirió protección del 40% al reto con 100 DL₅₀ del serovar Typhi (106). Finalmente, para evaluar la participación del LPS en la protección, debido a que la preparación de PME estaba contaminada con 4% de LPS y, por ello cabía la duda en cuanto al papel real de las PME como antígenos protectores, se inmunizaron ratones con 1.25 µg LPS (concentración de LPS presente en 30 µg de PME) y se encontró que confirió una protección débil contra la bacteria del 40% y 10% al reto con 100 y 300 DL₅₀ respectivamente (96), por lo tanto la acción protectora se debe principalmente a la fracción proteica.

Por otra parte, estudios efectuados por Singh y cols demostraron que la capacidad protectora de las porinas de *S. enterica* serovar Typhi se incrementa si estas se conjugan al antígeno capsular Vi. Este conjugado indujo en ratones inmunizados la producción sistémica de IgM, IgG e IgA y la secreción local de IgA (97).

3.11 Inmunogenicidad de las porinas de *Salmonella*.

Alurkar y Kamat analizaron la respuesta celular inducida por las porinas *S. enterica* serovar Typhi, quienes encontraron un incremento en la respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH) y un aumento en la respuesta de anticuerpos hacia un antígeno heterólogo, lo que sugiere que las porinas poseen propiedades inmunoestimuladoras (107). Posteriormente, González-Bonilla y cols mediante ensayos de proliferación *in vitro*, a partir de células de bazo de ratones previamente inmunizados observaron que las porinas inducen una proliferación de linfocitos T (108). Además esta respuesta es dependiente del tipo de MHC: ratones de haplotipo H-2^k (C3HeB/FeJ, C3H/HeJ y CBA/J) presentaron la mejor respuesta en comparación con los ratones de haplotipo H-2^d (BALB/c) (109). No obstante, a pesar de presentar la más baja respuesta de linfocitos T y producción de anticuerpos anti-porinas en los ratones con haplotipo H-2^d, es decir en ratones BALB/c, las porinas fueron capaces de conferir protección del 90% en estos ratones. En humanos, Blanco y cols evaluaron la respuesta celular inducida por las porinas de *S. enterica* serovar Typhi mediante ensayos de proliferación de células mononucleares de sangre periférica y observaron una alta respuesta de proliferación inducida por las porinas en células provenientes de pacientes con fiebre tifoidea y de voluntarios a quienes se les administró la vacuna antitifoídica Ty21a; de igual modo, la administración de la vacuna indujo la producción de anticuerpos anti-porinas en las personas estudiadas (110).

La capacidad de las porinas de activar a la respuesta inmune celular y humoral, con la generación de una respuesta protectora, ha motivado el estudio más profundo sobre su antigenicidad, es decir, sobre la caracterización de las regiones de la proteína que son las responsables de la inducción de la protección. Por ello, Díaz-Quiñonez y cols caracterizaron a los péptidos TRVAFAGL₇₃₋₈₀ y RNTDFFG₁₃₂₋₁₃₉ de la porina OmpC y encontraron que son presentados por MHC de clase I con haplotipo K^b; ambos péptidos poseen la habilidad de activar la capacidad citotóxica de linfocitos T (CTL) (111). Previamente, Paniagua-Solís y cols caracterizaron las regiones de la porina OmpC GTSNGSNPST₂₄₆₋₂₅₅ (asa 6) y QSKGKDISNGYGASYGDN₂₈₆₋₃₀₃ (asa 7) que resultaron presentar residuos no compartidos (asa 6) y parcialmente homólogos (asa 7) a las porinas de *E. coli*. Ambas asas de OmpC se caracterizaron como epitopos de linfocitos B, debido a que los sueros anti-asa 6 y anti-asa 7

fueron capaces de reconocer a la bacteria intacta, demostrando que ambas regiones están expuestas sobre la superficie de la bacteria (112). La expresión de las asas 6 y 7 de OmpC en el extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), por Secundino y cols hizo posible la caracterización de al menos uno de los epitopos de OmpC responsable del efecto protector; se encontró que la proteína asa 6 de OmpC-CTB confirió el 20% de protección al reto con 20 DL₅₀ de *Salmonella*, mientras que la proteína asa 7 de OmpC-CTB no tuvo el mismo efecto protector (113).

Recientemente, Salazar-González y cols evaluaron la respuesta inmune celular y humoral en humanos (Fase I), quienes recibieron la administración subcutánea de 10 µg de porinas purificadas a partir de *S. enterica* serovar Typhi. Este candidato a vacuna no presentó efectos secundarios adversos y a partir de células mononucleares de sangre periférica se observó una proliferación alta con producción de interferón gamma (IFN-γ) a los 7 días en los individuos vacunados. También encontraron la producción de anticuerpos anti-porinas, caracterizados por IgM, IgG1 e IgG2 con capacidad bactericida a los 7 y 15 días después de la vacunación y estos anticuerpos anti-porinas no presentaron reactividad cruzada hacia las porinas de *E. coli* (114).

Con respecto a la respuesta inmune inducida por las porinas de *S. enterica* serovar Typhimurium, Matsui y Arai observaron un incremento en la respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH) con producción de IL-2 e IFN-γ (115). Gupta observó que la inmunización previa con porinas por la vía subcutánea generó que los linfocitos CD4⁺ fueran resistentes a la apoptosis inducida por *S. enterica* serovar Typhimurium (116). Esta resistencia a la apoptosis se caracterizó por un incremento en la población de linfocitos CD4⁺ y una mayor expresión en su superficie de las moléculas B7 e ICAM-1, además de una predisposición de esta población de generar un respuesta de linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) productores de IFN-γ (116). Galdiero y cols reportaron que la inmunización intraperitoneal de porinas de *S. enterica* serovar Typhimurium indujo una respuesta de linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) productores de IL-4 e incapaces de secretar IFN-γ (117). Al efectuar los experimentos de protección encontraron que los ratones inmunizados con porinas presentaron una protección del 80% al reto con 2.5 x 10⁵ bacterias vía intraperitoneal, sin embargo, una dosis sub-letal (2 x 10⁴) protegió en mayor grado (100%) en comparación con la inmunización con porinas (117).

La capacidad de protección de las porinas del serotipo Typhimurium puede deberse a su capacidad de generar radicales libres del oxígeno (118) y producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales (119). También existen reportes en los que se describe la capacidad de estas porinas de inducir la producción del factor de crecimiento de macrófagos/granulocitos (120), el factor estimulador de plaquetas (121) y citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en la línea celular THP1 (122) y monocitos humanos (123, 124). Además de la secreción de IL-4 a partir de linfocitos CD4⁺ (117). Cabe destacar que la capacidad de secreción de las citocinas proinflamatorias dependen del reconocimiento de la familia de β 2-integrinas CD11aCD18 (122), lo que sugiere que estas proteínas pueden ser uno de los receptores que las porinas emplean para ser reconocidas por las células muridas.

Recientemente Galdiero y cols reportaron que las porinas de *S. enterica* serovar Typhimurium estimulan el incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en linfocitos B (125). También se ha encontrado que los efectos biológicos inducidos por las porinas se deben a la activación de los mecanismos de señalización intracelular que causan el aumento en la actividad de la proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA) y la proteína tirosina cinasa (NT-PTK) (126). Todos estos eventos celulares generan un aumento en el contenido de Ca²⁺ intracelular, inositol trifosfato (IP₃) (127) e inducen la fosforilación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs): ERK-1, ERK-2, JNK y p38 (76). Eventualmente estos eventos celulares inducen la activación y translocación nuclear de varios factores de transcripción, entre los más importantes se encuentran AP-1 (formado principalmente por los heterodímeros c-jun y c-fos) y el factor transcripcional NF- κ B, los cuales regulan la expresión de una gran variedad de genes que codifican para citocinas, moléculas coestimuladoras y de adhesión, etc (128).

3.12 Importancia de los anticuerpos en la respuesta inmune contra *Salmonella*.

Todas estas evidencias muestran que las porinas son antígenos protectores mediante la inducción de la respuesta inmune celular y humoral. La caracterización de la respuesta inmune celular ha sido estudiada ampliamente en macrófagos y linfocitos T (76, 110, 129). Sin embargo,

con respecto a la respuesta inmune humoral, hasta el momento no se ha evaluado a detalle las características de los anticuerpos anti-porinas, así como la función efectora que pudieran presentar estos anticuerpos contra *Salmonella*.

La importancia de los anticuerpos en la inmunidad contra *Salmonella* se ha demostrado a través de experimentos de protección pasiva, mediante la transferencia de suero hiperinmune a ratones susceptibles que posteriormente son infectados con *S. enterica* serovar Typhimurium (130-132). Eisenstein y cols demostraron que la transferencia de suero anti-*Salmonella* protegió a la cepa de ratones C3H/HeNCrIBR (resistentes a *Salmonella*), pero no causó el mismo efecto en los ratones congénitos C3H/HeJ y C3HeB/FeJ (susceptibles a *Salmonella*) (131). La capacidad de estas cepas de ser resistentes/susceptibles a la infección se basa en la expresión de la proteína 1 de resistencia asociada al macrófago (Nramp1), donde el cambio de glicina a ácido aspártico en la posición 169 (G169D) causa que la cepa sea susceptible (133). Estos resultados indican que la protección conferida por los anticuerpos depende del fondo genético (131). En otro estudio, el empleo de la cepa de ratones *xid*, la cual presenta una mutación (localizada en el cromosoma X) del gene *btK*, que codifica para la tirosina cinasa de Bruton y que trae como consecuencia que estos ratones tengan una deficiencia en la maduración de linfocitos B (carecen de linfocitos B1 y la población de linfocitos B2 esta disminuida) y presentan una baja producción de IgM e IgG3 (134). Por lo tanto los machos de esta cepa de ratones son más susceptibles a la infección con *S. enterica* serovar Typhimurium. No obstante, en los ratones *xid* puede inducirse la resistencia a *Salmonella* mediante la transferencia pasiva de un suero hiperinmune anti-*Salmonella* (135). La inmunización de un hibridoma anti-*Salmonella* en ratones indujo la producción sistémica y local de IgA que confirió protección al reto oral contra la bacteria (136). En humanos, la vacunación con el antígeno capsular Vi induce altos títulos de anticuerpos que confieren protección (62). Debido a que el antígeno Vi posee naturaleza polisacáridica, no activa a la respuesta de linfocitos T y, por ello se cree que la protección esta mediada principalmente por los anticuerpos (63).

Recientemente, se generaron ratones “*knockout*” para la cadena pesada 6 de las inmunoglobulinas (*Igh6*^{-/-}), en un fondo C57BL/6, que ocasiona que la maduración de los linfocitos B se detengan en la etapa pre-B (137). Empleando estos ratones, Kaufmann y cols encontraron que son más susceptibles a la infección con la cepa tipo silvestre de *S. enterica*

serovar Typhimurium. Sin embargo, son capaces de controlar la infección al reto con la bacteria atenuada *aroA* (138). McSorley y cols confirmaron lo anterior, pero además encontraron que la transferencia de suero anti-*Salmonella* en los ratones *Igh6^{-/-}* podía conferir resistencia a la infección (139).

3.13 Importancia de los linfocitos B de memoria.

La respuesta inmune de memoria es un evento muy importante en la generación de inmunidad a largo plazo y, consecuentemente confiere resistencia a las reinfecciones. La memoria inmunológica se define como la capacidad del organismo de responder de manera más rápida y eficiente durante una segunda exposición al antígeno (140). Por ello, la inducción de memoria inmunológica es un evento central en el éxito de una vacuna.

Existen dos tipos de memoria inmunológica: la memoria de los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y la memoria de los linfocitos B. En ambas poblaciones celulares, ésta se caracteriza por la presencia de un mayor número de linfocitos específicos provenientes de la expansión clonal ocurrida durante la primera exposición al antígeno y, se mantienen en un estado preactivado permitiéndoles tener un umbral de activación menor con respecto a las células virgen, dando lugar a una respuesta más rápida en las exposiciones antigénicas subsecuentes (141, 142). Además la característica que distingue a la memoria de los linfocitos B es la presencia de títulos de anticuerpos por largo tiempo (143-145)

La presencia del antígeno y cooperación con el linfocito T inducen la activación y proliferación del linfocito B virgen, proceso que se efectúa en la zona marginal de los ganglios linfáticos y bazo (140, 146). El linfocito B activado permanece en la zona marginal y se diferencia hacia células plasmáticas de vida media corta productoras de IgM (140, 146). Algunas de estas clonas migran a los folículos linfoides, sitio donde gracias a la cooperación con el linfocito CD4⁺ forma centros germinales (147, 148). En los centros germinales los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos y efectúan el cambio de isotipo hacia IgG, IgA, IgE (149-151). En este proceso es importante la interacción CD40-CD40L, así como el microambiente constituido por las citocinas IFN γ , IL-4, etc (152, 153). Las clonas de

linfocitos B que se generan son sometidas a un proceso revisión de su BCR, en donde las células autoreactivas son eliminadas y por otra parte, las que reconocen al antígeno son seleccionadas con mayor afinidad (154, 155). De éstas últimas algunas terminarán su diferenciación a células plasmáticas y otras formarán células B de memoria (147, 148).

Entre las características de una célula B de memoria se encuentran la presencia de un isotipo diferente al de IgM, los marcadores CD27 y CD148 (156, 157). A diferencia de los linfocitos B virgen, expresan CD80 y CD86, así como las moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 (158). Actualmente, existen algunos mecanismos propuestos para explicar la presencia de la respuesta de memoria mediada por linfocitos B, entre los cuales se encuentran:

Dependiente del antígeno:

- 1) La formación de depósitos antigénicos en las células dendríticas foliculares residentes en los centros germinales, las cuales mantienen la población de linfocitos B de memoria diferenciadas a células plasmáticas (150).
- 2) La estimulación continua de linfocitos B de memoria, mediante la infección crónica o continúa del patógeno (159).
- 3) La existencia de células de memoria que se diferencian continuamente en células plasmáticas productoras de anticuerpos (146). En la generación de linfocitos B de memoria es importante la proteína asociada a la molécula SLAM denominada SAP (160). Esto se ha demostrado en experimentos empleando a los ratones deficientes en SAP (SAP^{-/-}), los cuales presentaron una respuesta primaria normal de IgG dirigida contra los virus (160). Sin embargo, en estos ratones se desarrolló un menor número de linfocitos B de memoria (160).

Independiente del antígeno:

- 4) La presencia de células plasmáticas de vida media larga que residen en la médula ósea y, son capaces de secretar anticuerpos protectores continuamente (145). Para

la generación de esta población, se ha destacado la participación de SAP y el factor Ailos (161).

- 5) La activación de células B de memoria mediante estímulo policlonal o "bystander", la cual mantiene la población de linfocitos B de memoria y es una fuente importante de nuevas células plasmáticas (162).

Las hipótesis mencionada anteriormente, no son excluyentes, lo que significa que probablemente se pueden presentar uno o varios mecanismos simultáneamente in "vivo".

La información es muy limitada con respecto a la participación de la respuesta de anticuerpos y linfocitos B de memoria en la infección contra *Salmonella*. Los pocos estudios los ha efectuado Mastroeni y cols., quienes encontraron que los ratones *Igh6^{-/-}* inmunizados con la cepa atenuada *aroA* de *S. enterica* serovar Typhimurium presentaron una menor protección al reto con la bacteria virulenta *S. enterica* serovar Typhimurium después de 4 meses posteriores de la inmunización, mientras que los ratones normales si fueron capaces de sobrevivir (163). Esta disminución en la inmunidad se debió a que esta cepa de ratones no fue capaz de producir IFN- γ e IL-2, sugiriendo que presentan una deficiencia en la generación de una respuesta tipo 1 (Th1) (163).

Un estudio posterior publicado por Ugrinovic y Mastroeni mostraron que durante la primer semana de infección con la cepa atenuada *aroA*, los ratones *Igh6^{-/-}* presentaron un incremento en la producción de IL-4 por los linfocitos T CD4⁺ (164). Además los linfocitos B provenientes de ratones infectados a los 3 meses con *Salmonella* aumentaron la expresión de la molécula coestimuladora CD86 y fueron capaces de presentar antígenos induciendo la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (164). Estos resultados sugieren que los linfocitos B son importantes para la generación de células de memoria, particularmente durante la fase de activación, con capacidad protectora de largo plazo contra *Salmonella*

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha demostrado que las porinas de *S. enterica* serovar Typhi es un inmunógeno capaz de inducir protección en un modelo del ratón mediante la activación de la respuesta inmune celular y humoral, por lo que se le considera como un candidato a vacuna contra la fiebre tifoidea. Sin embargo, la contribución de los anticuerpos anti-porinas, y de manera independiente, de los anticuerpos anti-OmpC y anti-OmpF en el establecimiento del estado inmune y la inmunidad protectora de larga duración no ha sido explorada. Además, se desconocen las características de estos anticuerpos y su función durante la infección por *Salmonella* durante la respuesta inmune humoral primaria, secundaria y de memoria.

V. Objetivo general

- ◆ Evaluar la contribución de las porinas de *S. enterica* serovar Typhi en la inducción de una respuesta inmune específica de larga duración mediada por anticuerpos protectores.

VI. Objetivos particulares.

- ◆ Evaluar las características de los anticuerpos anti-porinas (los isotipos, subclases, capacidad bactericida y reactividad cruzada de los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados con las porinas de *S. enterica* serovar Typhi).
- ◆ Determinar la duración de la respuesta de anticuerpos anti-porinas y su capacidad bactericida.
- ◆ Caracterizar la contribución individual de las porinas OmpC y OmpF en la inducción de protección y de anticuerpos bactericidas de larga duración.

VII. MATERIALES Y METODOS.

MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS.

7.1 Cepas bacterianas.

Se emplearon las siguientes cepas bacterianas. *S. enterica* serovar Typhi: ATCC 9993, STYF302, STYC171, VALE39; *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028; *E. coli* de flora normal de ratón. Las principales características de estas cepas de bacterias se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de bacterias empleadas.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>S. enterica</i> serovar Typhi		
ATCC 9993	Cepa tipo silvestre, aislada de un paciente con fiebre tifoidea.	ATCC
STYF302	$\Delta ompF$ Km ^r	(165)
STYC171	$\Delta ompC$ Km ^r	(165)
VALE39	Cepa STYF302; $\Delta ompC/\Delta ompF$ Km ^r	Este estudio
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium		
ATCC 14028	Cepa tipo silvestre.	ATCC
<i>E. coli</i>		
Flora normal de ratón	Bacteria aislada y caracterizada a partir de las heces de ratones BALB/c.	Este estudio

7.2 Cultivo de bacterias.

Las diferentes cepas de bacterias se crecieron durante 3.5–4.0 h a 37°C y 200 rpm, en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific, Co.), en medio mínimo A [K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, Citrato de Sodio], suplementado con 0.1 % de extracto de levadura, 0.5% de glucosa y 0.1% de MgSO₄. Al alcanzar la bacteria la fase final de crecimiento logarítmica (D.O. 1.0 a 540

nm), se cosecharon por centrifugación a 7,000 x g durante 15 min a 4°C. Se pesó la biomasa húmeda y la pastilla se resuspendió en Tris-HCl pH=7.7 para su ruptura.

7.3 Animales de laboratorio

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c y C3H/HeJ, hembras de 8-10 semanas de edad, mantenidos en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. Se decidió realizar los estudios con la cepa BALB/c (*lty*^s) porque son ratones que son susceptibles a infecciones causadas por bacterias intracelulares, debido a que son incapaces de controlar la multiplicación temprana de *Salmonella* dentro de los macrófagos y mueren rápidamente por la enfermedad (166, 167). Por ello radica la importancia de estudiar la respuesta inmune humoral y capacidad protectora en una cepa de ratón naturalmente susceptible a la infección por la bacteria. Por otra parte, la cepa C3H/HeJ presentan una mutación en el dominio intracelular de TLR4 que trae como resultado que no sean capaces de responder al LPS(168) (molécula presente en cantidades pequeñas en nuestra preparación proteica de porinas).

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

7.4 Aislamiento de porinas, OmpC y OmpF de *S. enterica* serovar Typhi.

La obtención de porinas (OmpC/OmpF) de la cepa de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993, así como de las porinas OmpC y OmpF a partir de las cepas deficientes en la expresión de OmpF (STYF302) y OmpC (STYC171) (165), se efectuó de acuerdo al método de Nikaido (169) con breves modificaciones descritas recientemente (114). Este protocolo se detalla a continuación.

Las bacterias cosechadas en fase de crecimiento logarítmico se rompieron mediante una prensa francesa. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión bacteriana, ésta se centrifugó a 7,000 x g durante 15 min. El sobrenadante se trató durante 30 min a 37°C con DNAsa (10,000 u/ml), RNAsa (10,000 u/ml) y MgCl₂ 1.0 M, con el objeto de eliminar los ácidos nucleicos contaminantes en el sobrenadante. Se sedimentó la envoltura celular por ultracentrifugación a

200,000 x g durante 45 min a 4°C, la cual se solubilizó en Tris-HCl-SDS 2%, (Tris-SDS 2%) pH=7.4 y se incubó durante 30 min a 32°C. Se volvió a ultracentrifugar nuevamente a 200,000 x g durante 45 min a 20°C y la fracción insoluble (membrana externa y peptidoglicana) se incubó con el mismo amortiguador antes descrito (Tris-SDS 2%) y se sedimentó por ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas (200,000 x g durante 45 min a 20°C). Finalmente para lograr la extracción de las porinas, se resuspendió la fracción insoluble en Tris 0.05M, SDS 1%, NaCl 0.4 M, EDTA 0.005 M, pH=7.7 (amortiguador de Nikaido) y se incubó por 2 h a 37°C y posteriormente se ultracentrifugó a 200,000 x g durante 45 min a 20°C. Las porinas se recuperaron en el sobrenadante y se purificaron mediante una columna de Sephacryl S-200 (XK100 Pharmacia) con un flujo de 5 ml/min en amortiguador de Nikaido-SDS al 0.5% pH=7.7. Se colectaron las fracciones correspondientes a las porinas (primer pico de elusión) y se analizaron mediante métodos bioquímicos e inmunológicos para analizar su pureza e integridad.

MÉTODOS ANALÍTICOS

7.5 Cuantificación del contenido de proteínas por el Método de Lowry.

La cuantificación de la concentración proteica se efectuó de acuerdo al método de Lowry (170) que consiste en hacer reaccionar a la proteína con el cobre en medio alcalino formando un complejo colorido, cuya intensidad se incrementa al agregar el reactivo de Folin-Ciocalteu. Como proteína de referencia se utilizó albúmina sérica bovina (Sigma, Co).

Cuantificación del lipopolisacárido (LPS), por el Método de Karkhanis y *Limulus*.

7.6 Método de Karkhanis.

La cantidad de LPS contaminante en las muestras se determinó de manera indirecta cuantificando el contenido de ácido 2-ceto 3-desoxioctonato (KDO) de acuerdo al método de Karkhanis (171), empleando como referencia una curva patrón de KDO (Sigma, Co.) en un rango de 1-20 mg/ml. Se trataron las muestras problema con ácido sulfúrico 0.2 N a 100°C durante 30 min para liberar el LPS. Posteriormente se hizo reaccionar con HIO₄ 0.04 M y se incubó por 20

min a temperatura ambiente. Después se agregó NaAsO₂ 2.6 N y posteriormente ácido tiobarbitúrico 0.6%. Las muestras se incubaron a 100°C durante 15 min. El compuesto colorido (rojo) que se formó se mantuvo a temperatura ambiente y en solución agregando dimetilsulfóxido. La intensidad del color se determinó a 548 nm y la cantidad del KDO se cuantificó interpolando en la curva patrón.

7.7 Prueba de *Limulus*.

Simultáneamente, el contenido de LPS también se determinó mediante la prueba biológica de *Limulus* de acuerdo al método descrito por Thye Yin (172) [*Limulus* Amoebocyte Lysate Assay (LAL) Endosafe® KTA, Charles River Endosafe laboratories, Charleston SC. EU].

7.8 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-dodesil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La electroforesis SDS-PAGE de las porinas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Biorad System), de acuerdo al método de Laemmli (173). El gel concentrador estaba compuesto de 5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M, pH=6.8. El gel separador contuvo 11.2 % de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH=8.8. Como amortiguador de muestra se empleo Tris-HCl 0.125 M pH=6.8 que contenía SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 15 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.0192M, SDS al 0.1%, pH=8.3. Al final del corrimiento los geles se tiñeron durante 30 min en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (40:40:20) y el exceso de colorante se eliminó con una solución de metanol-ácido acético-agua (40:40:20).

7.9 Inmunoelctrotransferencia.

La electrotransferencia de las porinas de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC) (Micron Hybond-C, Amershan), se efectuó de acuerdo al método de Towbin (174) y se llevo a cabo durante 16 h a 18 V en un equipo de transferencia (BioRad). Se empleó como amortiguador para la transferencia glicina 0.192 M, metanol al 20% en Tris 0.02 M, pH=8.3. Al cabo del tiempo indicado y para comprobar que la transferencia se efectuó, el PNC se tiño con rosa de Ponceau al 1% durante 5 min. Posteriormente se retiró el colorante mediante lavados con H₂O bidestilada. El PNC se incubó durante 1.5 h a 37°C en solución de bloqueo [leche descremada 5% (Svelty) en PBS (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01%, pH=7.2)]. Después de 4 lavados con la solución TBS-T [TBS (NaCl 0.9%, Tris-HCl 0.1 M, pH=7.5) y Tween 20 (Sigma, Co) al 0.05%], el PNC se incubó por 2 h a 37°C con un suero hiperinmune de ratón anti-porinas en una dilución 1:500. Posteriormente se lavo 4 veces con TBS-T y se incubó durante 1 h a 37°C con un anticuerpo de cabra anti-IgG totales de ratón conjugado a peroxidasa (Zymed, San Francisco, EU) a una dilución 1:500. Una vez pasado este tiempo de incubación, se lavo 6 veces con TBS-T y dos veces con TBS para finalmente colocar el PNC en la solución reveladora que contenía 4-cloro- α -naftol 2 mM (Sigma, Co) en metanol, H₂O₂ al 0.08% en PBS.

7.10 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Para determinar los títulos de anticuerpos anti-porinas, anti-OmpC, anti-OmpF y anti-LPS, se utilizó el método de ELISA (175). Para ello, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Corning, NY, EU) con una solución de 10 μ g/ml de los diferentes antígenos: porinas, OmpC, OmpF y LPS de *S. enterica* serovar Typhi en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio, pH=9.6), durante 1 h a 37°C y posteriormente por toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se lavó 4 veces con PBS-Tween al 0.1 % (PBS-T) y se le agregó la solución de bloqueo PBS-L (PBS-leche 5%) y se incubó 1.5 h a 37°C. Después se lavó 4 veces con PBS-T y se agregaron las muestras problema en diluciones seriadas dobles iniciando de una dilución 1:40 en PBS-L y se incubó por 2 h a 37°C. Después de 4 lavados con PBS-T se agregó el anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón: IgM, IgG totales, IgG1, IgG2a, IgG2b (Zymed, San Francisco, EU) e IgG3 (Rockland, Gilbertsville, EU) conjugado a peroxidasa en una

dilución 1:1000 y se incubó durante 1 h a 37°C. Al cabo de este tiempo se lavó 4 veces con PBS-T y por último 2 veces solo con PBS y se le agregó la solución reveladora [0-fenilendiamina 0.5 mg/ml y H₂O₂ (30%) al 0.04% en amortiguador de citratos pH=5.6]. A los 10 min, la reacción se detuvo agregando una gota de H₂SO₄ 2.5 N. Se tomaron las lecturas a 490 nm mediante un lector de microplacas (Dynex, Technologies, MRX II). Los títulos de anticuerpos se expresaron como (-log₂ x 40) y se definieron como el número de diluciones seriadas antes de perder la señal de lectura, considerando el triple del valor promedio del control preinmune.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

7.11 Esquema de inmunización.

Grupos de 3 ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad se inmunizaron dos veces con 10 µg de antígeno en su forma nativa (trímeros), con intervalos de 15 días mediante las vías intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.) e intravenosa (i.v.). Los antígenos se disolvieron en solución salina isotónica sin adyuvante. Como grupo control, se utilizó un grupo de animales inyectados con solución salina. Se colectaron los sueros de los ratones, por punción retroorbital, cada 4 días durante el primer mes después de la inmunización y posteriormente cada mes hasta que se observó la muerte de los ratones por vejez. El título de anticuerpos se evaluó mediante la técnica de ELISA.

Con el propósito de estudiar la importancia de la estructura antigénica, los trímeros de porinas recibieron un calentamiento a 70°C durante 30 min para obtener monómeros, los cuales se analizaron mediante su corrimiento electroforético (SDS-PAGE). Posteriormente se procedió a la inmunización de los monómeros de porinas siguiendo el protocolo antes descrito.

7.12 Citometría de flujo (FACS).

Para analizar la capacidad de unión de los anticuerpos anti-porinas contra la bacteria, se realizaron ensayos de citometría de flujo, empleando el protocolo previamente descrito (112). La bacteria tipo silvestre de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993 se creció durante toda la noche a

37°C, se lavó 3 veces con PBS y suero normal de bovino al 2% (PBS-SNB), se incubó 1 h a 37°C con los anticuerpos anti-porinas en una dilución 1:100. Después de lavar nuevamente se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Immunotech), en dilución 1:200 y a continuación se lavó para eliminar el exceso de anticuerpo, para posteriormente resuspender el paquete bacteriano en PBS-SNB al 2% y finalmente efectuar la lectura en el citómetro de flujo (Becton Dickinson), empleando el software Cell Quest version 3.2.1. Las ventanas de adquisición se ajustaron a un “forward” y “side scatter” de tal manera que se excluyeran las células lisadas y los agregados celulares. Se analizaron 10,000 células en cada muestra.

7.13 Ensayos de anticuerpos bactericidas.

La capacidad bactericida de los anticuerpos anti-porinas dependiente de la activación de la vía clásica del complemento se evaluó de acuerdo al método de Peteers y cols (176), con breves modificaciones como se describe a continuación. Los sueros se descomplementaron mediante su calentamiento a 56°C durante 30 min. Se emplearon placas estériles de fondo redondo (Corning, NY, EU) para agregar las muestras problema en diluciones seriadas dobles iniciando de una dilución 1:40 en PBS. Después se incubaron los sueros con 200±50 bacterias de las cepas de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993 y VALE39 ($\Delta ompC/\Delta ompF$) con una fuente de complemento proveniente de suero de cobayo al 9%. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 1 h. Los controles consistieron en: i) Un control positivo, suero hiperinmune anti-*Salmonella*; ii) bacteria y suero anti-porinas; iii) bacteria y suero de cobayo; iv) bacteria, suero anti-porinas y suero de cobayo descomplementado. La cuenta de colonias viables se efectuó como unidades formadoras de colonias (UFC), 18 h después por plaqueo, y por duplicado en agar soya-tripsicaseína. Los títulos bactericidas se expresaron como $(-\log_2 \times 40)$ y se definieron como el número de diluciones seriadas en el que se presentó un efecto lítico $\geq 50\%$ del inoculo inicial.

7.14 Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀).

Los cultivos bacterianos cosechados en la fase de crecimiento logarítmica se ajustaron a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml (0.6 ± 0.05 a 540 nm); a partir de esta suspensión, se

efectuaron varias diluciones de la bacteria resuspendida en mucina (Sigma Co, mucina gástrica de cerdo al 5% en TE pH=7.4), empleando para ello un factor de dilución constante en la preparación de las siguientes concentraciones.

Tabla 3. Determinación de la DL₅₀.

S. enterica serovar Typhi ATCC 9993

600,000 bacterias / ml
300,000 bacterias / ml
150,000 bacterias / ml
75,000 bacterias / ml
37,500 bacterias / ml

Como grupos control se emplearon ratones inyectados solo con mucina al 5% en TE. El porcentaje de sobrevivencia se registró durante los 10 días posteriores al reto.

Cada una de estas 6 concentraciones bacterianas fueron administradas intraperitonealmente (i.p.) a grupos de 6 ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad. Se registró la sobrevivencia durante los diez días posteriores a su inoculación y la Dosis Letal al 50% (DL₅₀) se determinó por el método de Reed y Muench (177), de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\text{Log DL}_{50} = \text{log dil } <50\% - (\text{DP}) \times \text{log factor de dilución}$$

En donde:

Log dil <50% = Logaritmo de la dilución inmediata inferior a la dilución en la que se observa el 50% de la mortalidad de la población.

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

50% = Dilución de la concentración en la que se observa el 50% de la mortalidad de la población.

<50% = Dilución inmediata inferior a la dilución en la que se observa el 50% de la mortalidad de la población.

>50% = Dilución inmediata superior a la dilución en la que se observa el 50% de la mortalidad de la población.

7.15 Modelo de protección activa.

La capacidad de las porinas de inducir inmunidad activa, se evaluó empleando el modelo experimental murino de infección con *S. enterica* serovar Typhi (99). Para ello, grupos de 10 ratones hembras de la cepa BALB/c de 8-10 semanas de edad se inmunizaron y se retaron mediante la vía intraperitoneal (i.p.) con bacteria resuspendida en mucina 5% (Sigma, Co) en buffer de amortiguamiento TE (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.0025M, pH=7.2), de acuerdo al siguiente esquema de protección:

Tabla 4. Esquema de protección activa.

Día	Inmunización i.p. (10 µg)	Reto i.p. (DL₅₀)
0	Porinas, OmpC, OmpF y mezcla OmpC/OmpF	
15	Porinas, OmpC, OmpF y mezcla OmpC/OmpF	
25		20, 100, 500

Como grupos control se emplearon ratones inyectados con: a) solución salina isotónica y b) mucina al 5% en TE. El porcentaje de sobrevivencia se registró durante los 10 días posteriores al reto. $1 \text{ DL}_{50} = 1.17 \times 10^5$.

VIII. RESULTADOS.

8.1 Purificación y caracterización inmunogénica de las porinas OmpC y OmpF de *S. enterica* serovar Typhi.

La obtención de porinas mediante la técnica de Nikaido se fundamenta en el hecho de que estas proteínas se encuentran unidas por enlaces iónicos al peptidoglucano, por lo tanto se pueden separar de ésta mediante su solubilización en un amortiguador que contenga SDS. Las proteínas así obtenidas se purifican mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200, la cual descarta a las otras proteínas de la membrana externa incluida OmpA y la mayor parte del LPS. Las proteínas que se obtienen después del paso por la columna corresponden a las porinas en estado nativo las cuales se obtienen en forma de trímeros de 108 kDa y 114 kDa.

Las porinas purificadas a partir de la cepa de *S. enterica* serovar Typhi tipo silvestre ATCC 9993, se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12.0 % en condiciones reductoras y se observaron dos bandas proteicas de 36 y de 38 kDa (figura 6A, carril 2). La porina OmpC purificada a partir de la cepa de *S. enterica* serovar Typhi STYF302 ($\Delta ompF$), presentó una banda de 36 kDa (figura 6A, carril 3). Mientras que la porina OmpF, purificada a partir de la cepa de *S. enterica* serovar Typhi STYC171 ($\Delta ompC$), mostró una banda proteica de 38 kDa (figura 6A, carril 4). Las tres preparaciones de porinas estuvieron libres de LPS, cuantificado a través del contenido de KDO. Sin embargo, cuando se empleó una técnica mas sensible, como es la prueba de *Limulus*, se encontró que el LPS presente en las muestras fue del 0.02% que correspondió a 0.2 ng de LPS/ μ g de proteína.

Para evaluar la integridad estructural y la antigenicidad de las tres preparaciones proteicas, se efectuó una inmunotransferencia y se inmunodetectó con un suero hiperinmune anti-porinas (1:500). Se encontró que el suero reconoció a las tres preparaciones proteicas: porinas, OmpC y OmpF (figura 6B). Cabe destacar que se analizó el gel en concentraciones iguales de proteína para todas las muestras (2 μ g proteína/carril), y el reconocimiento fue mayor para la banda que

correspondió a OmpC (figura 6B, banda inferior carril 2 y 3), lo que sugiere que esta proteína posee una mayor antigenicidad.

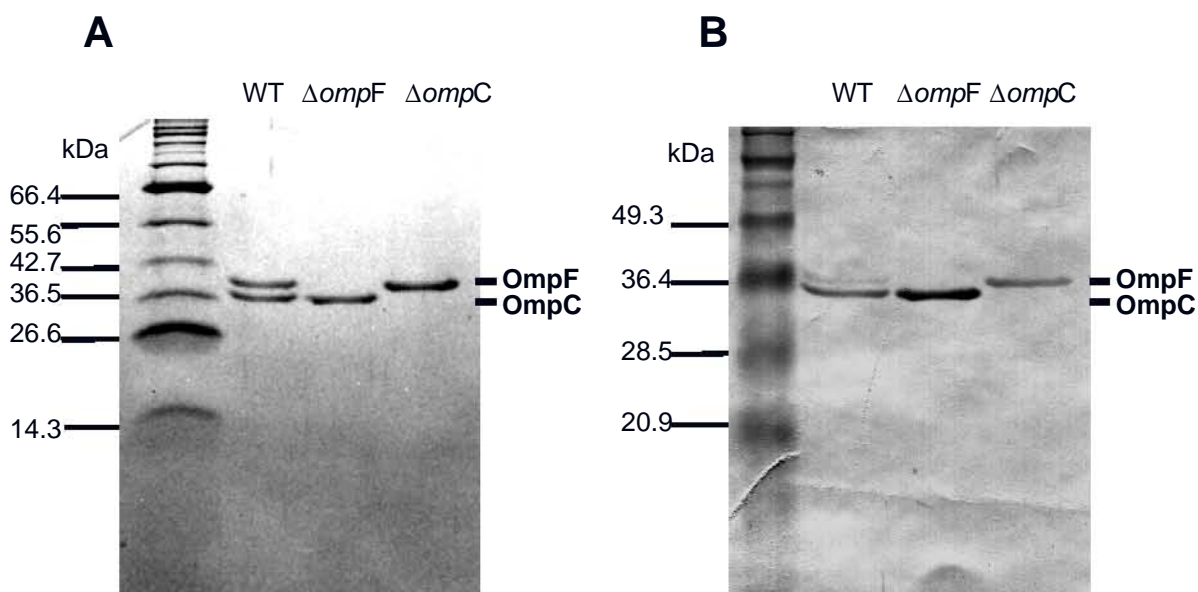


Figura 6. Análisis electroforético e inmunogénico de las porinas de *S. enterica* serovar Typhi. A) SDS-PAGE: Carril 1, marcadores de peso molecular (New England Biolabs); carril 2, porinas purificadas a partir de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993; carril 3, porina OmpC purificada a partir de *S. enterica* serovar Typhi STYF302 ($\Delta ompF$ Km^R); carril 4, porina OmpF purificada a partir de *S. enterica* serovar Typhi STYC171 ($\Delta ompC$ Km^R). B) Inmunoblot: Carril 1, marcadores de peso molecular (New England Biolabs); carril 2, porinas; carril 3, porina OmpC; carril 4, porina OmpF. En cada carril la concentración proteica fue de 2 μ g. Las flechas indican a las porinas OmpC (banda inferior) y OmpF (banda superior).

8.2 Respuesta de anticuerpos inducida por las porinas de *S. enterica* serovar Typhi.

Para analizar la respuesta de los anticuerpos inducida por las porinas, se tomó en cuenta los datos publicados por Isibasi y cols, donde la inmunización con 10 μ g y 30 μ g de porinas por la vía intraperitoneal confirió la mejor protección en ratones (104). Por ello, se empleó la dosis de 10 μ g de porinas para inmunizar i.p. a ratones BALB/c en los días 0 y 15, en ausencia de adyuvante. Los sueros de los ratones inmunizados se titularon mediante un ensayo de ELISA, empleando como antígeno a las porinas. Los resultados se muestran en la figura 7, donde se analizó los títulos de anticuerpos durante 476 días. Se encontró que las porinas indujeron una

respuesta rápida de IgG e IgM a los 4 días después de la inmunización, con títulos que se incrementaron 16 veces con respecto al control. Posteriormente, durante la respuesta secundaria (refuerzo al día 15), los niveles de IgG alcanzaron su título máximo al día 30 al presentar un incremento de 1,024 veces; mientras que los títulos de IgM presentaron el incremento más alto en 64 veces al día 22 (figura 7). Con respecto a las respuesta de larga duración, se observó un decremento paulatino en los títulos de IgG hasta mantenerse constantes desde el día 300 al 476, con títulos que presentaron 16 veces de incremento con respecto al control. Esta reportado que la vida media de esta cepa de ratones es de alrededor de 575 días (<http://www.informatics.jax.org>), dado que los ratones se inmunizaron al día 56 de vida (8 semanas), en realidad el día 476 correspondió al día 532 de vida de los ratones. Por ello, al siguiente mes no fue posible tomar la siguiente sangría, debido a la muerte de los ratones por vejez.

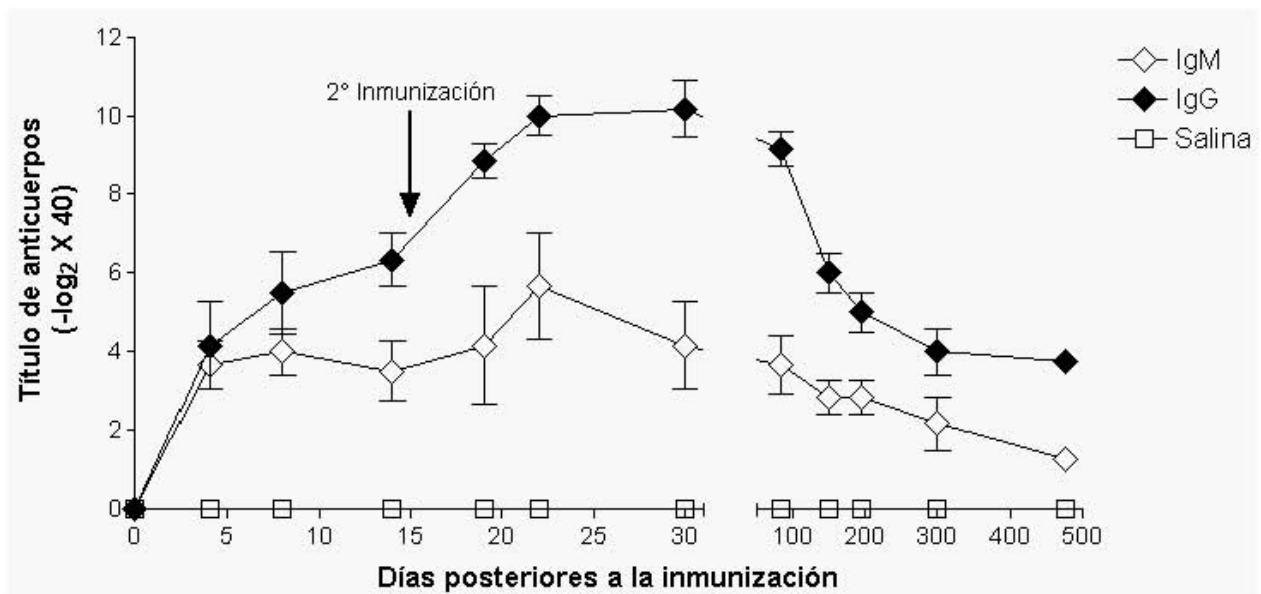


Figura 7. La inmunización con porinas de *S. enterica* serovar Typhi induce una respuesta de anticuerpos que persisten durante toda la vida en ratones. Grupos de 3-6 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con 10 µg de porinas de *S. enterica* serovar Typhi disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: IgM, rombos abiertos; IgG, rombos cerrados; control (ratones inyectados con solución salina), cuadros abiertos. La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 476 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

8.3 Determinación de la vía de inmunización óptima.

La vía de inmunización de un antígeno es un factor muy importante para activar a determinadas poblaciones celulares del sistema inmune y conferir protección. Por ello se determinó la vía de inmunización óptima para las porinas. Los ratones fueron inmunizados con 10 μg de porinas a los días 0 y 15, sin adyuvante, mediante las vías intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.) y oral. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8, donde se observó que la respuesta de IgM (figura 8A) e IgG (figura 8B) indujeron títulos de anticuerpos anti-porinas muy similares entre las vías i.p., s.c. e i.v. Sin embargo, la vía oral no generó presencia de anticuerpos en el suero (datos no mostrados).

La única diferencia se presentó inmunizando bajo la vía s.c., la cual indujo una respuesta de IgM e IgG con cinética más lenta durante la respuesta primaria (días 4-8) (figura 8), probablemente porque el antígeno tarda más tiempo en llegar a los órganos linfoides secundarios. Estos resultados muestran que las porinas inducen una respuesta de anticuerpos de larga duración, independientemente de la vía de inmunización. Dado que en los experimentos de protección activa publicados por Isibasi y cols (104), se empleó la administración de porinas por la vía intraperitoneal, se decidió usar esta vía en los experimentos subsecuentes.

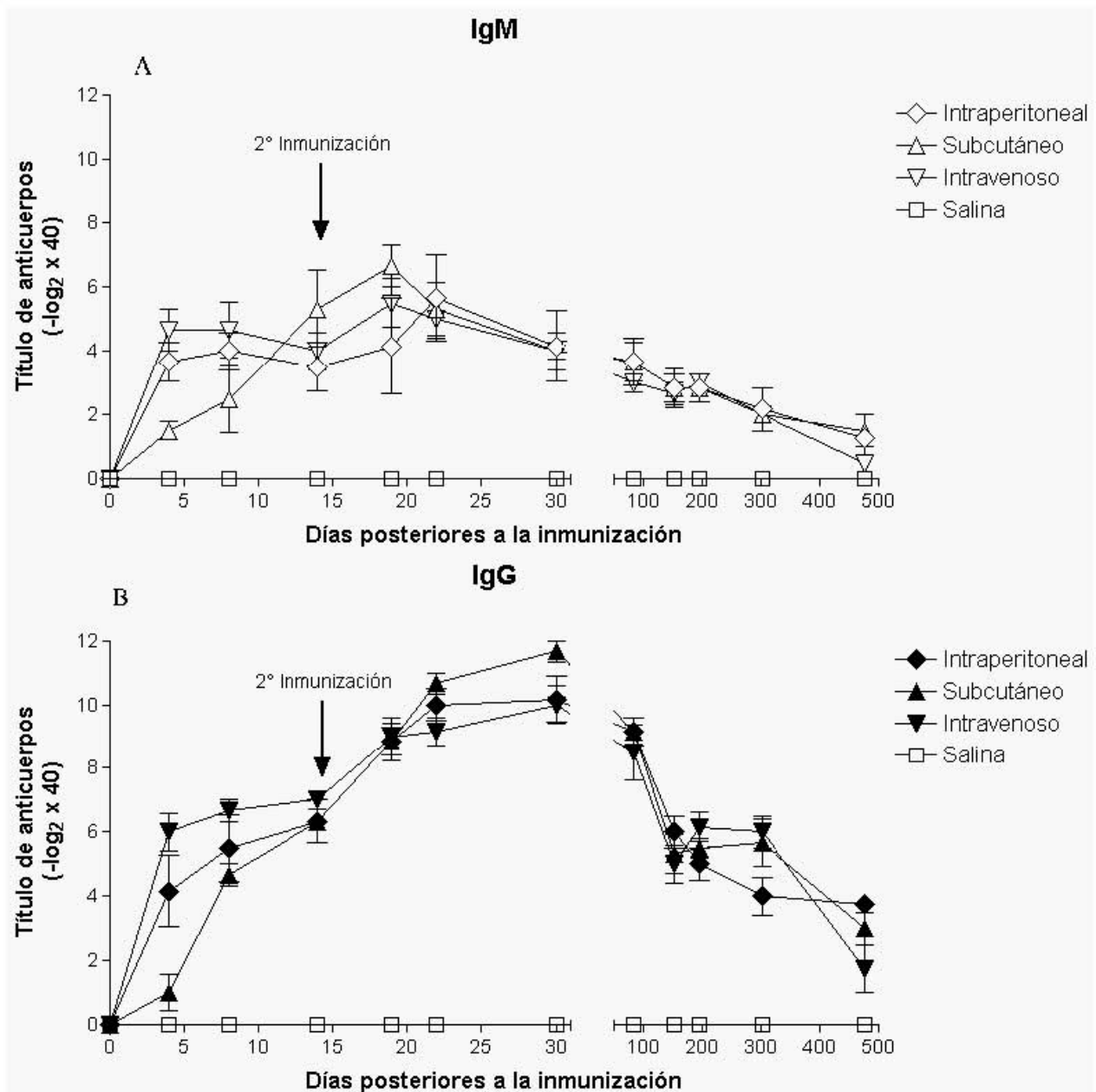


Figura 8. La vía de inmunización no influye en la respuesta de anticuerpos de larga duración, inducido por las porinas de *S. enterica* serovar Typhi. Grupos de 3-6 ratones BALB/c fueron inmunizados mediante las vías intraperitoneal (rombos), subcutánea (triángulos) e intravenosa (triángulos invertidos) con 10 μ g de porinas *S. enterica* serovar Typhi disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Como grupo control los ratones fueron inyectados con solución salina (cuadros abiertos). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: A) IgM anti-porinas; B) IgG anti-porinas. La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 476 días. Los resultados se representan como el promedio \pm SD.

8.4 Subclases de IgG presentes en los sueros anti-porinas.

Para estudiar las subclases de los anticuerpos inducidos por las porinas, se analizaron las subclases de IgG presentes en los sueros anti-porinas. Se observó una respuesta rápida de IgG3, con títulos que mostraron un incremento de 16 veces durante el día 4 (figura 9); la presencia de IgG2b, IgG1 e IgG2a se detectó a partir del día 8 (figura 9). La respuesta secundaria se caracterizó por la presencia de todas las subclases de IgG en el siguiente orden $IgG2b \geq IgG1 > IgG3 > IgG2a$ (figura 9). Durante la respuesta de larga duración se observaron títulos elevados de las subclases $IgG2b = IgG1 > IgG2a$ (figura 9). Sin embargo, aunque los títulos de IgG3 fueron los primeros en inducirse (día 4), las IgG3 no son representativas de la respuesta de larga duración, puesto que sus títulos son muy bajos a partir del día 180 (figura 9).

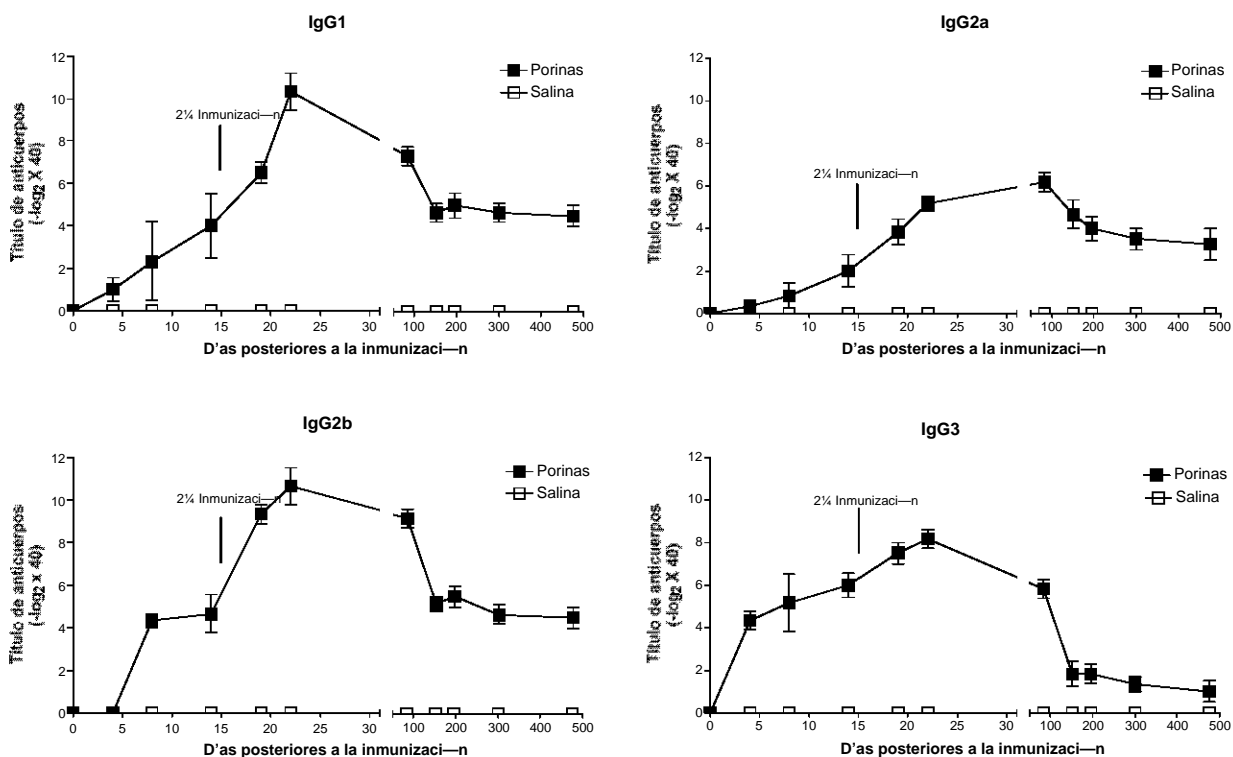


Figura 9. Las porinas de *S. enterica* serovar Typhi inducen todas las subclases de IgG. Grupos de 3-6 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 μ g de porinas de *S. enterica* serovar Typhi disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (cuadros cerrados). Como grupo control se empleó ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 476 días. Los resultados se representan como el promedio \pm SD.

8.5 Importancia efectora de los anticuerpos anti-porinas: Capacidad de unión y efecto bactericida.

Para evaluar la función biológica de los anticuerpos anti-porinas, se procedió al análisis de la capacidad de unión a la superficie bacteriana y el efecto bactericida contra *Salmonella*. Para analizar la capacidad de unión, se realizaron ensayos de citometría de flujo para determinar si estos anticuerpos podían reconocer de manera directa a la bacteria intacta. *S. enterica* serovar Typhi tipo silvestre se incubó con los sueros de la respuesta primaria (día 4), secundaria (día 25) y de larga duración (día 300) y después de eliminar mediante lavados aquellos anticuerpos que no se unieron, se detectó la reacción con un anticuerpo anti-cadena pesada de IgG, conjugado a fluoresceína. La unión no específica de los anticuerpos se midió utilizando un suero de ratón preinmune (figura 10), suero de ratón inyectado solo con solución salina (datos no mostrados) y como control de especificidad se incubó solo la bacteria con el anticuerpo secundario (datos no mostrados). Se encontró que las IgG inducidas en forma temprana (figura 7, día 4) fueron capaz de reconocer a la bacteria, demostrado por el aumento en la media de intensidad de fluorescencia (MIF=3.82), con respecto al control preinmune (MIF=2.41) (figura 10). Esta capacidad se incrementó utilizando el suero de los ratones inmunizados al día 25, donde se observó la máxima unión con una MIF=47.73 (figura 10). Interesantemente, el suero anti-porinas del día 300 posee una capacidad similar de continuar uniéndose a la bacteria (MIF=42.91), muy parecido a la observada con el suero de la respuesta secundaria, a pesar de que los títulos de anticuerpos medidos por ELISA disminuyeron 64 veces en la respuesta de larga duración. Esto demuestra que los anticuerpos IgG contenidos en los sueros anti-porinas poseen la capacidad de unirse directamente a la superficie de la bacteria y con ello probablemente activar a los mecanismos efectores de la respuesta inmune.

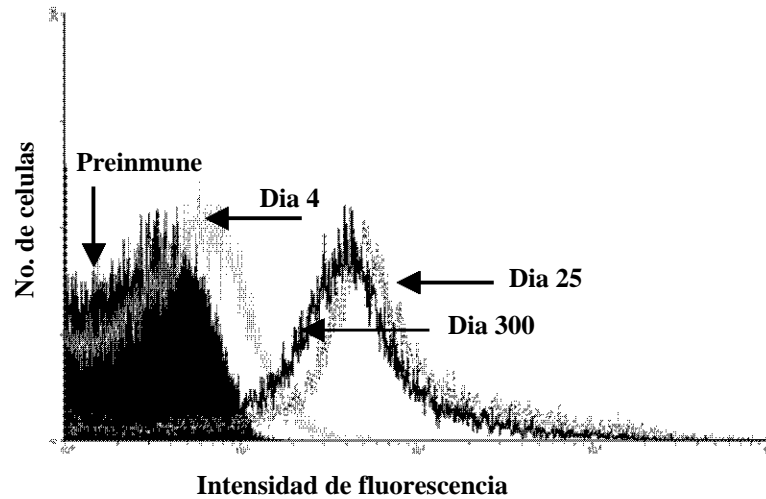


Figura 10. Los anticuerpos IgG anti-porinas reconocen la superficie de *S. enterica* serovar Typhi. El histograma muestra un experimento representativo de la unión de IgG anti-porinas contra la cepa tipo silvestre de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993, mediante citometría de flujo. Suero anti-porinas del día 4 (línea azul), día 25 (línea verde) y día 300 (línea roja). El grupo control corresponde al suero preimmune (histograma cerrado, línea negra).

La unión de los anticuerpos a la superficie de la bacteria es el primer evento que causa la lisis bacteriana mediante la activación de la vía clásica del complemento. Por esta razón, se procedió a evaluar la función de los anticuerpos anti-porinas en los mecanismos de defensa contra la infección de *Salmonella*, mediante el análisis de su capacidad bacteriolítica. Para ello, se incubó la cepa tipo silvestre de *S. enterica* serovar Typhi con los diferentes sueros anti-porinas descomplementados (30 min a 56°C) y suero de cobayo como fuente de complemento. Después de su incubación durante 1 h y plaqueo en agar-TSI, se determinó el porcentaje de lisis bacteriana y los resultados se expresaron como títulos bactericidas (aquella dilución en donde se observó el 50% de lisis bacteriana).

En la figura 11, se observó que al día 4 los títulos bactericidas incrementaron únicamente 2 veces. La mejor respuesta se presentó a partir del día 25, con títulos bactericidas que mostraron un aumento de 512 veces. La eficiente actividad bactericida se mantuvo constante hasta el día 300 (figura 11). Después de este tiempo, al día 476 los títulos bactericidas disminuyeron solamente un título para mostrar un incremento en 128 veces con respecto al control (figura 11). Cabe destacar que esta actividad bactericida de los sueros anti-porinas de memoria se mantuvo

muy similar, con respecto a la actividad mostrada durante la respuesta secundaria, aunque los títulos anti-porinas de la respuesta de larga duración, medidos por ELISA, mostraron un decremento en 64 veces. Esto sugiere que la inmunización con porinas induce una respuesta de anticuerpos con capacidad bactericida de memoria, siendo éste un mecanismo efector importante contra *Salmonella*, en particular en la fase de bacteremia cuando la bacteria se encuentra en el torrente sanguíneo.

Para evaluar la posible contribución de otros anticuerpos (p. ej. anticuerpos anti-LPS) en la respuesta bactericida de los sueros anti-porinas, se repitieron los ensayos con una cepa de *S. enterica* serovar Typhi deficiente en la expresión de las porinas OmpC y OmpF (OmpC⁻/OmpF⁻) (Tabla 2). En la figura 11 se muestran los resultados donde solamente se analizaron los sueros de la respuesta secundaria (día 25) y de larga duración (día 300 y 476). Se encontró que la capacidad bactericida de los sueros es dependiente del reconocimiento específico de las porinas OmpC y OmpF en la superficie de la bacteria, debido a que cuando se utilizó como célula blanco la cepa de *Salmonella* OmpC⁻/OmpF⁻, no se observó efecto bacteriolítico. Este resultado además descarta la posibilidad de que la actividad bactericida sea mediada debido a la presencia de otros anticuerpos que se presentan de manera natural o inducida como lo son los anticuerpos anti-LPS.

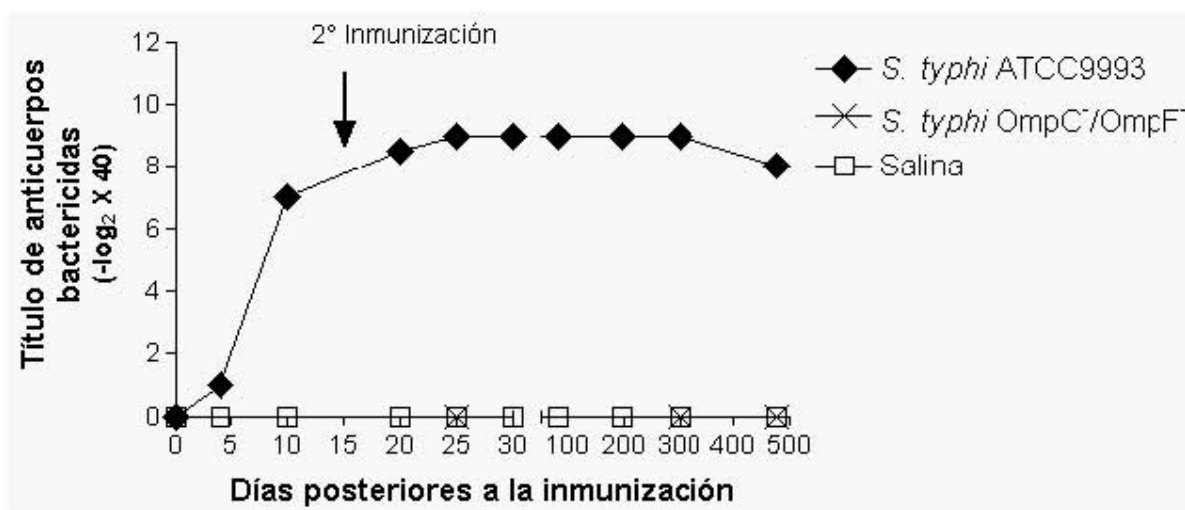


Figura 11. Las porinas de *S. enterica* serovar Typhi inducen una respuesta de anticuerpos con capacidad bactericida de larga duración. Los títulos bactericidas de los sueros anti-porinas se determinaron contra la cepa de *S. enterica* serovar Typhi tipo silvestre (rombos cerrados) y *S. enterica* serovar Typhi OmpC⁻/OmpF⁻ (cruces). Como control se empleó el suero de ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta se evaluó durante 476 días posteriores a la inmunización.

8.6 Los anticuerpos anti-porinas de larga duración no muestran reactividad cruzada contra porinas de *S. typhimurium*.

Debido a la gran homología que existe entre las porinas de las bacterias Gram-negativas (73), surgió la necesidad de evaluar la reactividad del suero anti-porinas en contra *S. enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) y *E. coli* (flora normal de ratón) (Tabla 2). En la figura 12, se observó que los anticuerpos IgG anti-porinas de larga duración (día 300) no presentaron reacción cruzada en contra la cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium (MIF=2.32), comparada con el suero preinmune (MIF=2.41). Sin embargo, se obtuvo una ligera reactividad cruzada en contra *E. coli* (MIF=3.28), lo cual sugiere que la respuesta de anticuerpos de larga duración esta dirigida principalmente contra epitopos específicos de las porinas que están expuestos en la superficie de la bacteria. Como control positivo se observó que los anticuerpos anti-porinas reconocieron altamente a *S. enterica* serovar Typhi (MIF=47.73).

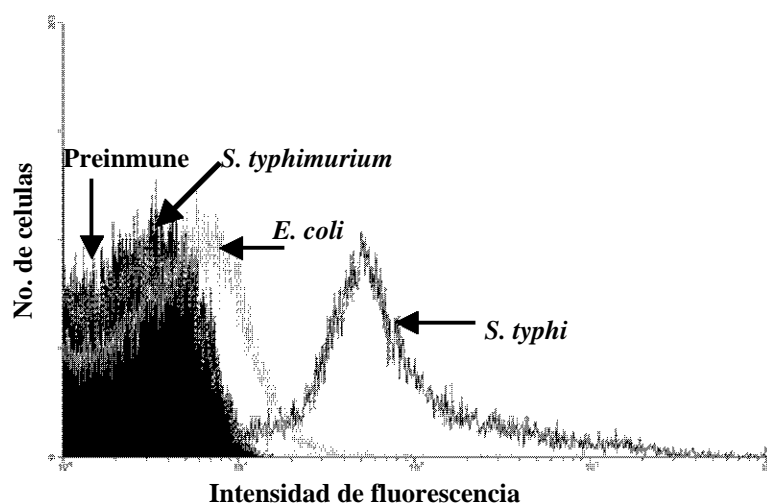


Figura 12. Los anticuerpos IgG anti-porinas de larga duración no presentan reactividad cruzada contra *S. enterica* serovar Typhi. El histograma muestra un experimento representativo, mediante citometría de flujo, de la unión de IgG anti-porinas del día 300 contra *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993 (línea roja), *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 (línea azul) y *E. coli* de flora normal de ratón (línea verde). El grupo control corresponde al suero preinmune (histograma cerrado, línea negra).

8.7 Las trazas de LPS contaminante presentes en las porinas no contribuyen significativamente en la inducción de una respuesta de anticuerpos bactericidas de larga duración.

En forma natural el LPS se encuentra unido mediante enlaces no covalentes a las regiones β -transmembranales situadas dentro de la membrana externa de las PME (87). Además el LPS es importante para el ensamblaje de la estructura trimérica de las porinas y su estabilidad en la membrana externa (86). Por ambas razones, es muy difícil obtener una preparación de porinas totalmente libre de LPS empleando las herramientas bioquímicas que actualmente se disponen. Durante el proceso de purificación, la contaminación es del 0.2 ng LPS/ μ g proteína. Dado que los ratones se inmunizaron con 10 μ g de porinas, esto implica que recibieron 2 ng de LPS en cada una de las inmunizaciones. Dado lo anterior, para evaluar la contribución del LPS contaminante en la respuesta de anticuerpos se emplearon dos estrategias experimentales con resultados similares. La primera, a partir de los mismos sueros de los ratones BALB/c inmunizados con las porinas, se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpos anti-LPS.

Los resultados se muestran en la figura 13, donde puede observarse que el título de IgM en los sueros anti-porinas presentó un incremento de 4-8 veces durante los días 14-22. Los anticuerpos IgM anti-LPS ya no se detectaron después del día 40. Con respecto a la respuesta de IgG, durante la respuesta secundaria presentaron títulos muy bajos de alrededor de 2 veces mayor que el título previo a la inmunización.

La segunda estrategia consistió en inmunizar a ratones de la cepa C3H/HeJ, animales que presentan una mutación en el dominio intracelular de TLR4 que trae como resultado que sean hiporespondedores al LPS (168). Los ratones C3H/HeJ se analizaron bajo el mismo protocolo empleado para inmunizar a los BALB/c y los resultados encontrados consistieron en una respuesta de IgG rápida al día 4 (figura 14), que al ser caracterizada consistió en la subclase IgG2b (figura 15). Durante la respuesta secundaria, la máxima respuesta se presentó al día 22 con un título de IgG que incrementó 256 veces y éste se mantuvo elevado hasta el día 390, con un incremento en 16 veces (figura 14), fecha en la cual este grupo de ratones murieron por vejez.

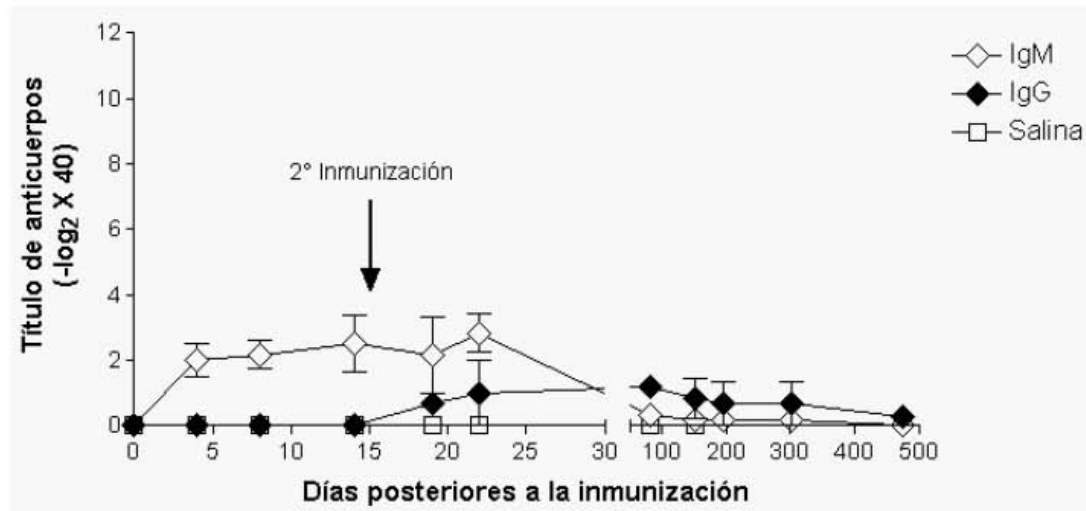


Figura 13. Los anticuerpos provenientes de ratones BALB/c inmunizados con porinas no presentan una respuesta de larga duración contra el LPS. Los mismos sueros de los ratones BALB/c inmunizados con porinas fueron analizados mediante ELISA, para determinar la presencia de anticuerpos anti-LPS de *S. enterica* serovar Typhi. IgM, rombos abiertos; IgG, rombos cerrados. Como grupo control se empleó ratones inyectados con solución salina, cuadros abiertos. La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 476 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

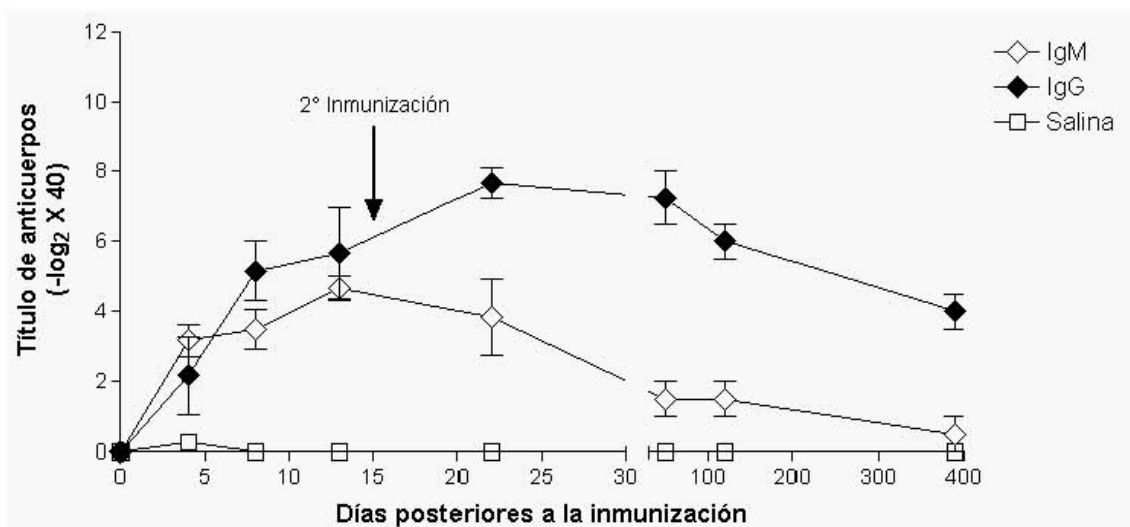


Figura 14. La baja concentración de LPS presente en la preparación de porinas *S. enterica* serovar Typhi, no afectó la respuesta de anticuerpos de larga duración. Grupos de 3 ratones C3H/HeJ fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 µg de porinas de *S. enterica* serovar Typhi disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: IgM, rombos abiertos; IgG, rombos cerrados. Como grupo control se utilizó ratones inyectados con solución salina, cuadros abiertos. La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 390 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

Cabe destacar que la cepa de ratones C3H/HeJ presentó una diferencia muy importante en la generación de IgG3 anti-porinas, puesto que ésta no se detectó durante el transcurso del experimento (figura 15). Además la respuesta secundaria estuvo caracterizada por la presencia de IgG2b, IgG1 e IgG2a. Importantemente, durante la respuesta de larga duración existió la producción de $IgG2b > IgG2a \geq IgG1$ (figura 15).

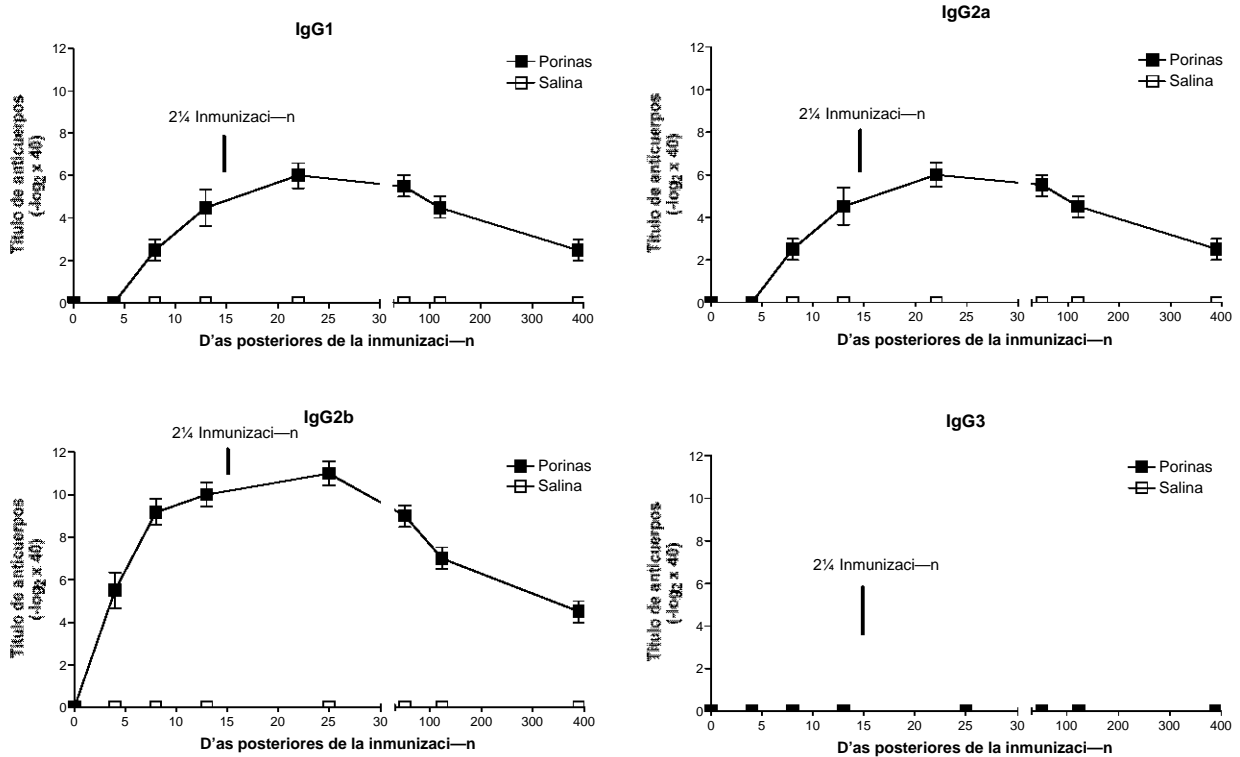


Figura 15. La baja concentración de LPS presente en la preparación de porinas *S. enterica* serovar Typhi, posee efecto en la inducción de IgG3. Grupos de 3 ratones C3H/HeJ fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 μ g de porinas de *S. enterica* serovar Typhi disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (cuadros cerrados). Como grupo control se empleó ratones inyectados con solución salina, cuadros abiertos. La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 390 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

Los sueros anti-porinas de los ratones C3H/HeJ se analizaron para conocer su capacidad bactericida. Se encontró un bajo efecto bacteriolítico durante la respuesta primaria, pero la máxima respuesta bactericida se presentó al día 22, con un título que aumentó en 128 veces (figura 16). Esta respuesta se mantuvo constante hasta el día 390, siendo la capacidad bactericida de larga duración solamente dos títulos menores con respecto a la encontrada en los ratones BALB/c (figura 11 y figura 16).

En resumen, estos resultados indican que la presencia de LPS en la preparación de porinas no influye en la generación de anticuerpos IgG2b e IgG2a anti-porinas con capacidad bactericida de memoria. Sin embargo, no puede descartarse la participación del LPS como un adyuvante en la inducción de IgG3 y probablemente IgG1. Esta última hipótesis se basa porque los ratones C3H/HeJ no produjeron IgG3, subclase que reconoce a moléculas de naturaleza polisacáridica (178, 179).

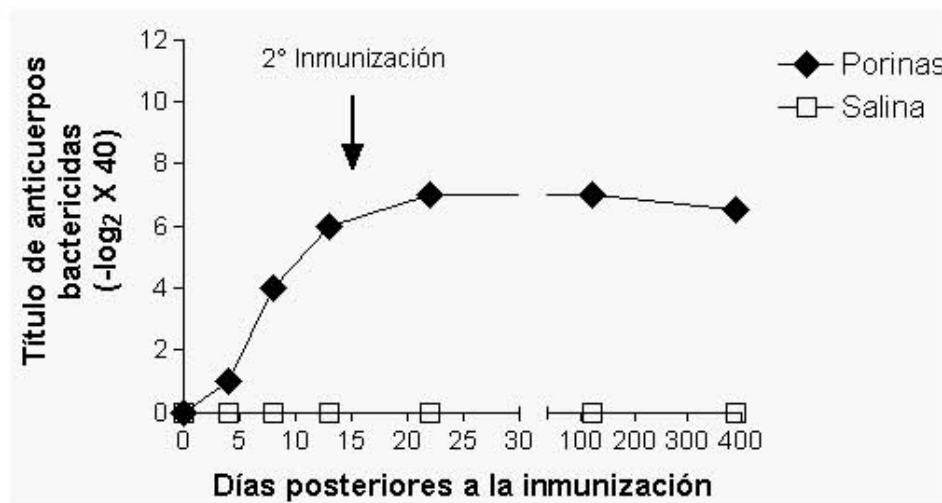


Figura 16. La baja concentración de LPS presente en la preparación de porinas *S. enterica* serovar Typhi, no afecta la inducción de anticuerpos con capacidad bactericida de larga duración. Los títulos bactericidas de los sueros anti-porinas generados en ratones C3H/HeJ (resistentes al efecto del LPS) se determinaron por ELISA. Se empleó la cepa de *S. enterica* serovar Typhi tipo silvestre para analizar el efecto de los sueros anti-porinas (rombos cerrados) y como control se utilizó el suero de ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta se evaluó durante 390 días posteriores de la inmunización.

8.8 Importancia de la organización antigénica en la respuesta de anticuerpos.

Está demostrado que la alta organización de antígenos derivados de virus es primordial para la generación de anticuerpos con actividad neutralizante (180). Con respecto a las moléculas de origen bacteriano, no existen estudios en los cuales se haya evaluado esta importante característica del antígeno para la inducción de una respuesta de anticuerpos. Solamente se disponen de evidencias indirectas donde al examinar los sueros provenientes de ratones inmunizados con monómeros de la porina recombinante PorB (PorB_r) de *Neisseria meningitidis*, solo se encontró la producción de IgG1 anti-PorB (181). Sin embargo, cuando PorB_r se inmuniza en liposomas, en combinación con el lípido A, se generó la producción de IgG2b e IgG2a (181). Estos resultados sugirieron que el lípido A podía restablecer la conformación nativa en forma de trímeros de la porina PorB cuando ésta se incorporó a los liposomas.

Este antecedente torno a la estructura nativa y organización de las porinas en forma de trímeros, sugirió evaluar si la organización del antígeno representa una característica importante para la inducción de una alta inmunogenicidad. Para estudiar ésto, los trímeros de porinas que se obtuvieron en estado nativo se calentaron a 70°C durante 30 min (en presencia de SDS) para generar monómeros, los cuales fueron caracterizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (datos no mostrados). Este tratamiento ya esta demostrado que no desnaturaliza a estas proteínas, únicamente ocasiona la desorganización de los trímeros en monómeros (73). Los sueros provenientes de los ratones BALB/c inmunizados con monómeros, se analizaron mediante ELISA para determinar los títulos de anticuerpos anti-monómeros durante 30 días. En la figura 17A se muestra que la respuesta de IgM fue similar entre monómeros y trímeros. Sin embargo, los títulos de IgG presentaron una disminución en 6-4 veces durante la respuesta primaria y secundaria (figura 17B). Lo mas importante fue un cambio en la subclase de IgG, puesto que solamente se indujo IgG2b durante la respuesta primaria y para que se efectuara el cambio de isotipo hacia IgG2a, IgG1 e IgG3 fue necesaria la reinmunización al día 15 (figura 18). Estos resultados confirmaron la importancia de la estructura nativa trimérica de las porinas en la generación de altos títulos de anticuerpos caracterizados por todas las subclases de IgG. Además esta característica se debe de considerar cuando se estudia la respuesta inmune empleando

antígenos recombinantes, los cuales no necesariamente conservan su estructura nativa y, son por ello menos inmunogénicos por ejemplo la porina PorB de *Neisseria* (181).

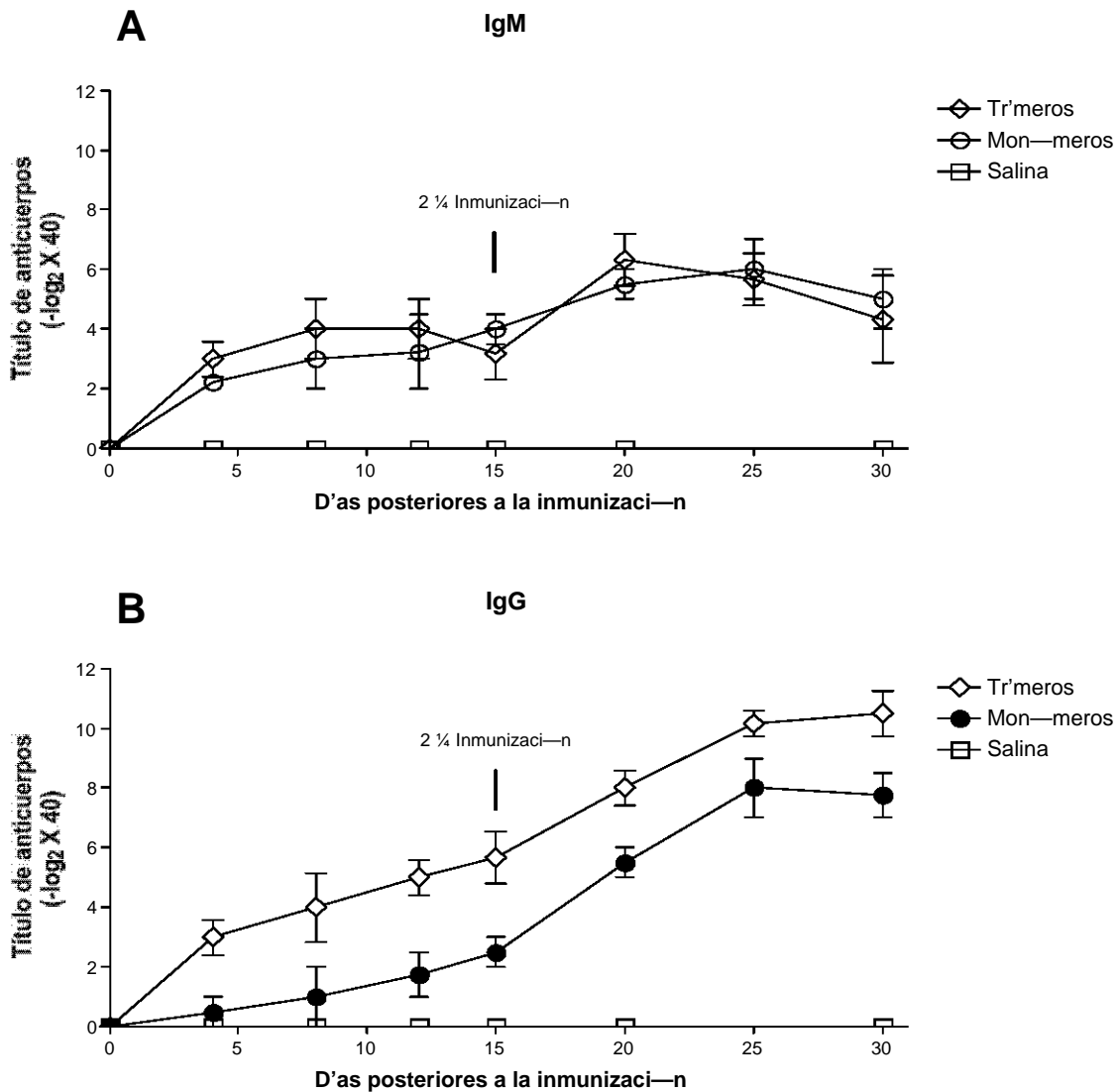


Figura 17. La organización del antígeno (monómeros de porinas de *S. enterica* serovar Typhi), afecta la respuesta primaria de anticuerpos. Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 µg de monómeros y trímeros de porinas disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: A) IgM anti-trímeros de porinas (rombos abiertos); IgM anti-monómeros de porinas (círculos abiertos). B) IgG anti-trímeros de porinas (rombos cerrados); IgG anti-monómeros de porinas (círculos cerrados). Como grupo control se utilizó ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 30 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

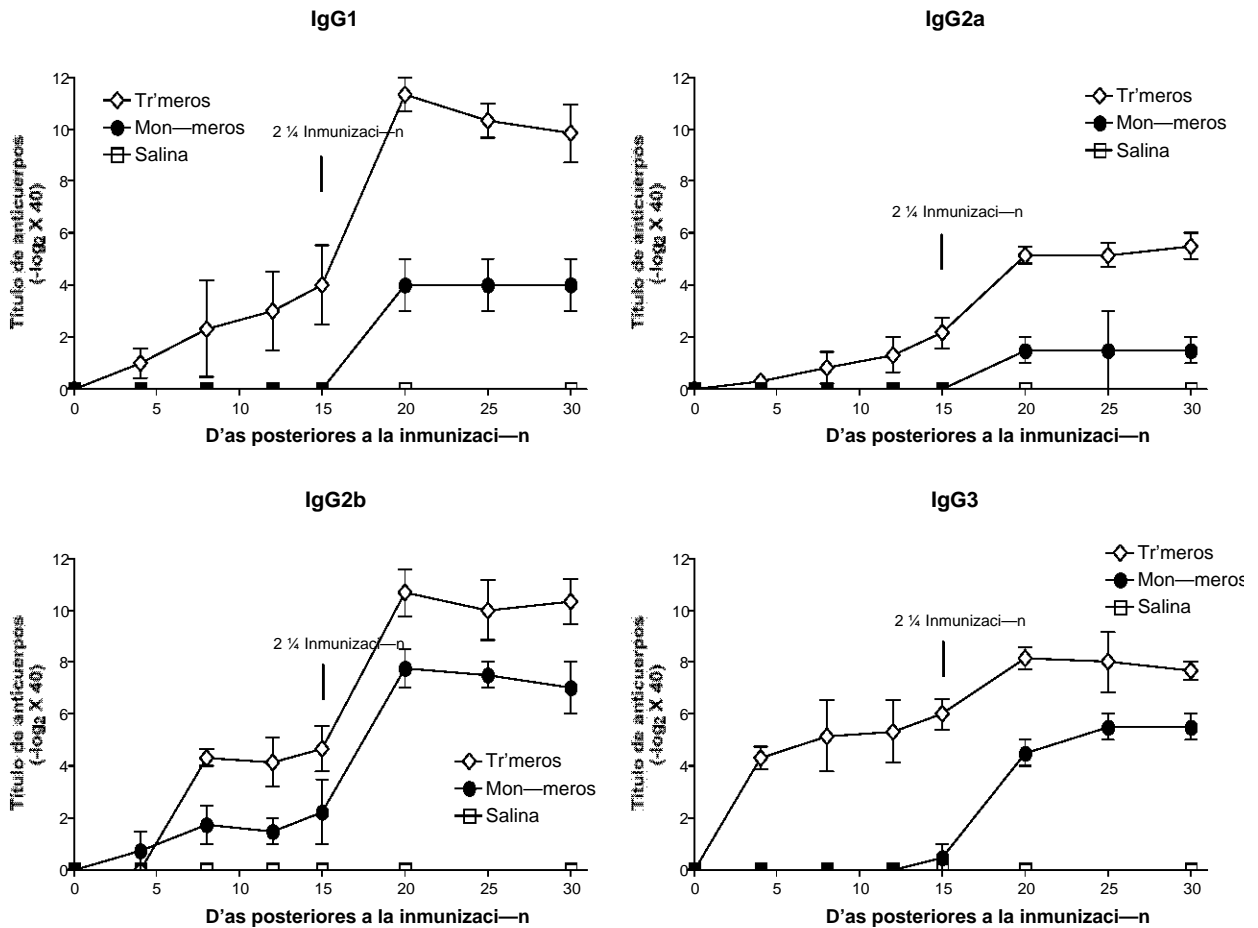


Figura 18. Los monómeros de porinas de *S. enterica* serovar Typhi inducen un menor título de anticuerpos en todas las subclases de IgG anti-porinas. Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 µg de monómeros y trímeros de porinas disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-trímeros de porinas (rombos cerrados); IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-monómeros de porinas (círculos cerrados). Como grupo control se utilizó ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 30 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

8.9 Caracterización de la respuesta de anticuerpos inducida por la porina OmpC u OmpF, inmunizadas en forma independiente.

La purificación de las porinas mediante la técnica de Nikaido a partir de la cepa tipo silvestre de *Salmonella*, da como resultado la obtención de dos bandas que corresponden a OmpC (banda inferior) y OmpF (banda superior) (figura 6A, carriles 3 y 4). Por ello, resulta importante caracterizar los anticuerpos que son generados por cada una de las porinas OmpC u OmpF, así como su contribución en la capacidad protectora. Ya previamente se había obtenido la purificación de la porina OmpC en forma recombinante (OmpC_r), expresada en una cepa de *E. coli* carente de porinas (pST13/UH302) (106). Sin embargo, nuestros resultados anteriores (figura 17 y figura 18), indicaron que se debería de estudiar a las porinas nativas, en forma de trímeros, purificadas a partir de *Salmonella*. Para ello, se emplearon dos cepas de *S. enterica serovar Typhi* que ya fueron descritas previamente: STYF302 y STYC171 (165). La porina OmpC fue purificada a partir de la cepa silvestre de *Salmonella* a la cual se le eliminó la secuencia del gene *ompF*, a la cual se le llamo STYF302 ($\Delta ompF$)(Tabla 2), por lo tanto la única porina que expresó fue la correspondiente a OmpC. Se siguió la misma estrategia para la generación de la cepa carente de OmpC denominada STYC171 ($\Delta ompC$) (Tabla 2), para que a partir de ella se purificara OmpF. Las proteínas así obtenidas se caracterizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot (Figura 6A y 6B, carriles 3 y 4). Se empleó el mismo protocolo de inmunización descrito antes para inmunizar a los ratones BALB/c con estas porinas. Se analizó la respuesta de anticuerpos, durante un periodo de 300 días, para determinar la capacidad de generación de anticuerpos bactericidas de larga duración.

Durante la respuesta primaria, OmpC indujo una respuesta rápida y con mayores títulos de IgG e IgM al día 4 de inmunización (figura 19A y 19B). Esta respuesta de IgG rápida se caracterizó por consistir en la subclase IgG3 (figura 20). Durante la respuesta secundaria, los títulos de IgM fueron muy similares para ambas porinas (figura 19A). Los títulos altos de IgG anti-OmpC continuaron observándose durante la respuesta secundaria, en los días 20 y 25 (figura 19B). Los títulos de anticuerpos IgG anti-OmpC y anti-OmpF fueron similares durante los días 31-33, con títulos que aumentaron 512 veces comparados con los títulos de los mismos animales antes de ser inmunizados (figura 19B). Ambas porinas indujeron una respuesta de IgG de larga

duración con títulos que presentaron un incremento en 256 veces (anti-OmpC) y 16 veces (anti-OmpF) a los 300 días posteriores de la inmunización (figura 19B). Los anticuerpos IgG de la respuesta de larga duración consistió en IgG1>IgG2b>IgG2a>>IgG3 (anti-OmpC) e IgG1>IgG2b>IgG2a>>>IgG3 (anti-OmpF) (figura 20).

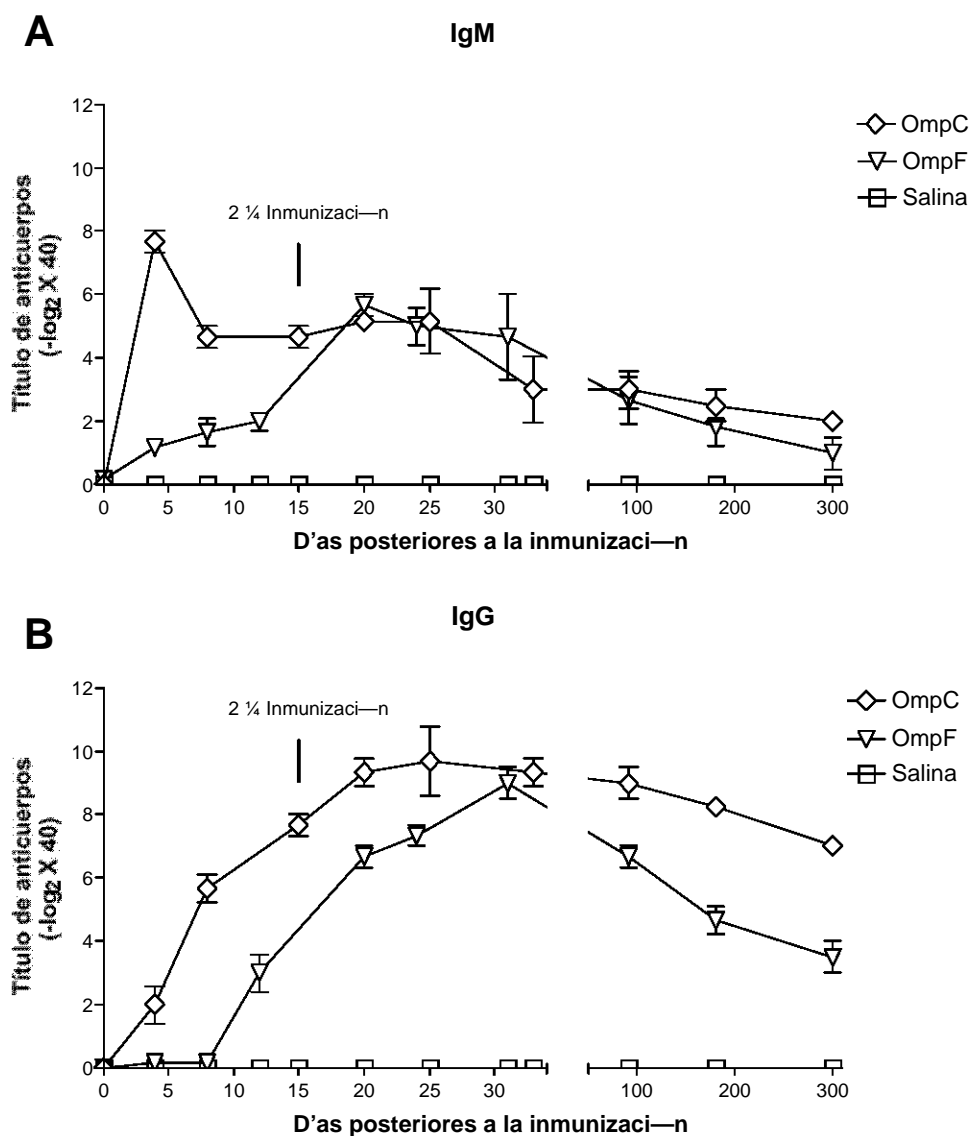


Figura 19. Las porinas OmpC y OmpF *S. enterica* serovar Typhi, inducen una respuesta de anticuerpos de larga duración. Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 µg de OmpC ó 10 µg de OmpF disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: A) IgM anti-OmpC (rombos abiertos) e IgM anti-OmpF (triángulos invertidos abiertos); B) IgG anti-OmpC (rombos cerrados) e IgG anti-OmpF (triángulos invertidos cerrados). Como grupo control se empleó ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 300 días. Los resultados se representan como el promedio +/- SD.

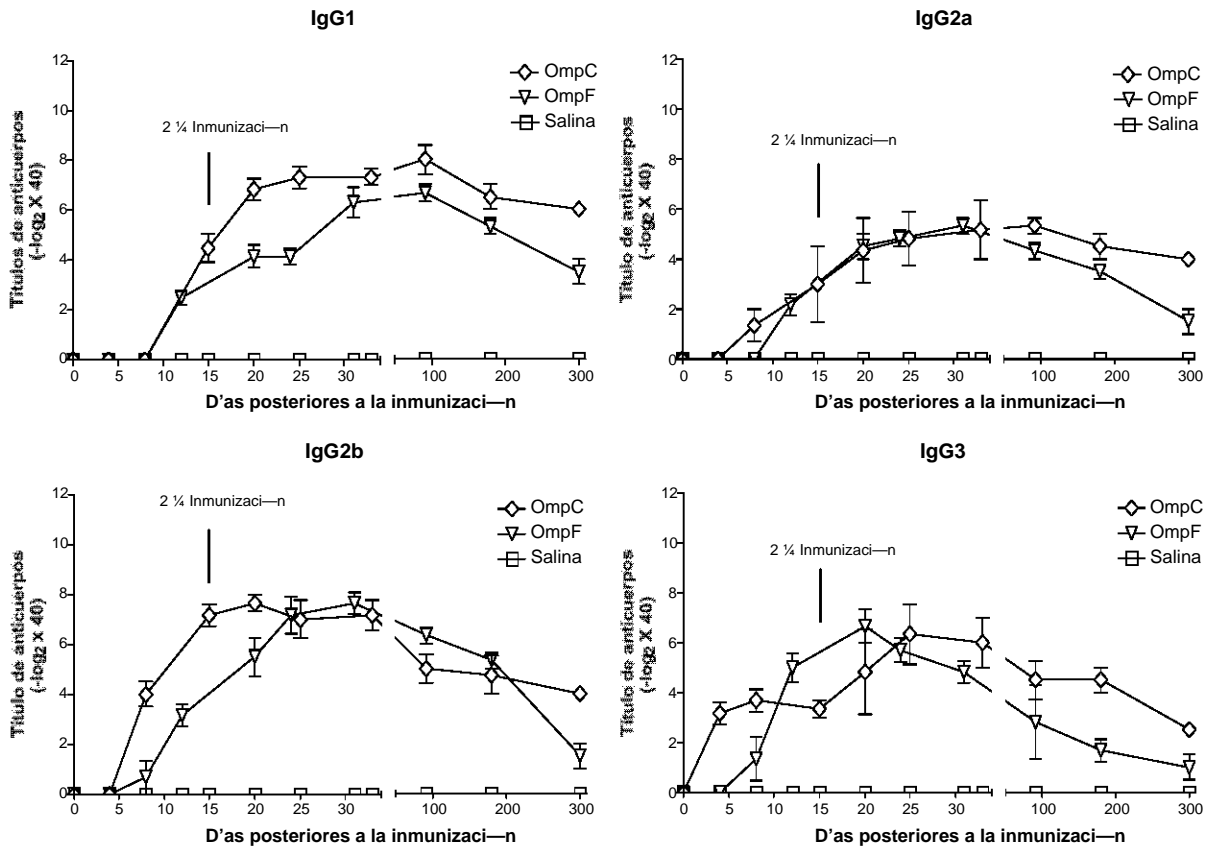


Figura 20. Las porinas OmpC y OmpF de *S. enterica* serovar Typhi, inducen las cuatro subclases de IgG. Grupos de 3 ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 μ g de OmpC ó 10 μ g de OmpF disueltas en solución salina, sin adyuvante, a los días 0 y 15 (indicado por una flecha). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-OmpC (rombos cerrados); IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-OmpF (triángulos invertidos cerrados). Como grupo control se empleo ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta de anticuerpos se evaluó en forma individual durante 300 días. Los resultados se representan como el promedio \pm SD.

8.10 Función efectora de los anticuerpos anti-OmpC y anti-OmpF: capacidad de unión y efecto bactericida.

Cuando se evaluó la capacidad de unión y el efecto bactericida de los sueros anti-OmpC y anti-OmpF, se observó que las IgG anti-OmpC correspondientes a la respuesta primaria (día 4), secundaria (día 25) y de larga duración (día 300) presentaron capacidad de unión a la bacteria intacta en diferente intensidad, siendo el reconocimiento en el siguiente orden: respuesta secundaria (MIF=29.08) > respuesta de larga duración (MIF=14.72) >> respuesta primaria (MIF=3.82) (figura 21A). La capacidad de reconocimiento del suero anti-OmpC contra *Salmonella* (figura 21A) correlacionó con su capacidad bactericida de memoria (figura 22). Este efecto bacteriolítico fue importante ya que mostró un incremento de 64 veces en los títulos bactericidas de anti-OmpC al día 300 (figura 22). Por su parte, los anticuerpos IgG anti-OmpF únicamente fueron capaces de unir a la bacteria al día 25 (MIF=26.65) (figura 21B). Este dato se confirmó cuando se evaluó su actividad bactericida, puesto que la propiedad de lisar a *Salmonella* sólo se presentó en el suero de la respuesta secundaria (figura 22).

Nuestros resultados que muestran una inducción de anticuerpos de larga duración anti-OmpF, pero carentes de actividad bactericida son muy importantes, puesto que demuestran que no en todos los casos los anticuerpos detectados mediante ELISA tienen una función efectora. Es decir, esto sugiere que los anticuerpos de memoria presentes en el suero anti-OmpC reconocen a epítopos accesibles y expuestos en la superficie de la bacteria; mientras que los anticuerpos de larga duración producidos por OmpF reconocen a epítopos no expuestos. Además estos experimentos indican que OmpC es la porina más inmunogénica, resultado que fue comprobado mediante Western blot donde se encontró un reconocimiento mayor de OmpC cuando se utilizó un suero hiperinmune anti-porinas (figura 6B, carril 3).

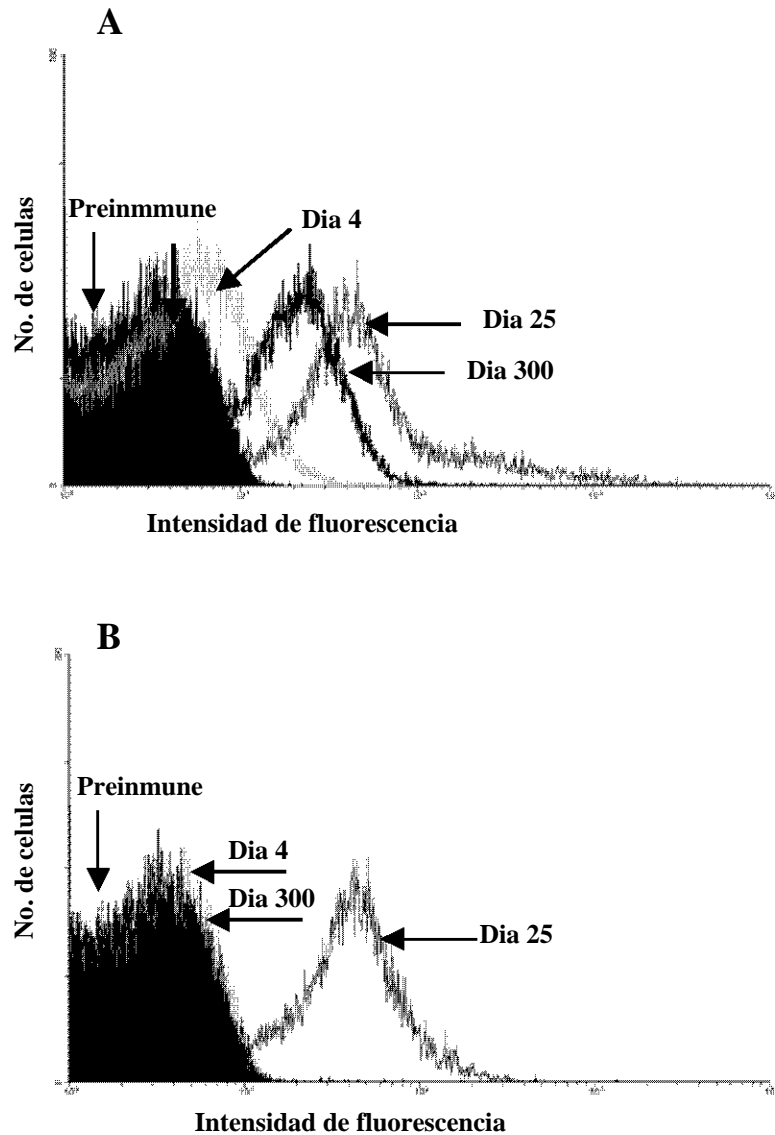


Figura 21. Los anticuerpos IgG anti-OmpC y anti-OmpF reconocen en forma diferente a *S. enterica* serovar Typhi. El histograma muestra un experimento representativo de la unión de IgG contra la cepa tipo silvestre de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993, mediante citometría de flujo. A) Suero anti-OmpC del día 4 (línea azul), día 25 (línea verde) y día 300 (línea roja); B) Suero anti-OmpF del día 4 (línea azul), día 25 (línea verde) y día 300 (línea roja). El grupo control correspondió al suero preimmune (histograma cerrado, línea negra).

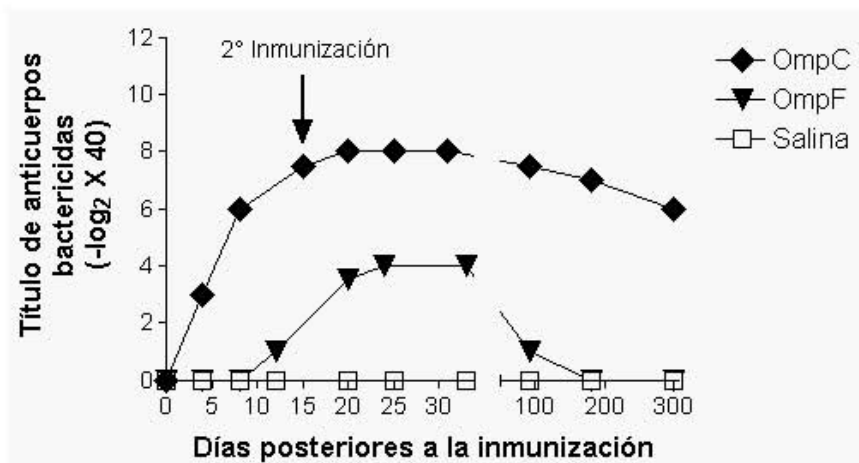


Figura 22. La porina OmpC induce una respuesta de anticuerpos bactericida de larga duración, mientras que la porina OmpF sólo induce una respuesta de anticuerpos bactericida durante la respuesta secundaria. Los títulos bactericidas de los sueros anti-OmpC (rombos cerrados) y anti-OmpF (triángulo invertido cerrado) se determinaron contra la cepa de *S. enterica* serovar Typhi tipo silvestre. Como control se empleó el suero de ratones inyectados con solución salina (cuadros abiertos). La respuesta se evaluó durante 300 días posteriores a la inmunización.

8.11 La porina OmpC posee mayor capacidad protectora.

Para confirmar la mayor inmunogenicidad de la porina OmpC, se evaluó la capacidad de las porinas OmpC u OmpF de inducir inmunidad protectora mediante el empleo del modelo experimental utilizado en el laboratorio desde 1988 (96). Este consiste en determinar la sobrevivencia durante los 10 días posteriores al reto por vía intraperitoneal con la cepa virulenta de *S. enterica* serovar Typhi ATCC 9993, resuspendida en una suspensión de mucina al 5%.

Previamente se efectuó la determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones BALB/c, la DL₅₀ bajo nuestras condiciones experimentales consistió en 1DL₅₀ = 1.17x10⁵ bacteria. En la figura 23, se muestran los resultados del experimento de protección activa representados como una curva de sobrevivencia. Los ratones BALB/c recibieron dos inmunizaciones con 10 µg de OmpC y 10 µg de OmpF al día 0 y 15, sin adyuvante. Como se puede observar en la curva de sobrevivencia, la porina OmpC confirió una protección del 100% al reto con 20 y 100 DL₅₀, mientras que se presentó un 80% de protección al reto con 500 DL₅₀. En cambio, la porina OmpF indujo una protección del 100%, 70% y 60% al reto con 20, 100 y 500 DL₅₀, respectivamente.

Como grupos control se incluyeron un grupo de ratones inmunizados sólo con solución salina, los cuales murieron al reto con la dosis mas baja de bacteria; también se incluyó un grupo de ratones inmunizados con una mezcla de OmpC + OmpF, en los cuales se observó un 100% de protección bajo todas las dosis empleadas. Estos resultados confirman la mayor inmunogenicidad de OmpC e inducción de inmunidad protectora contra la bacteria virulenta.

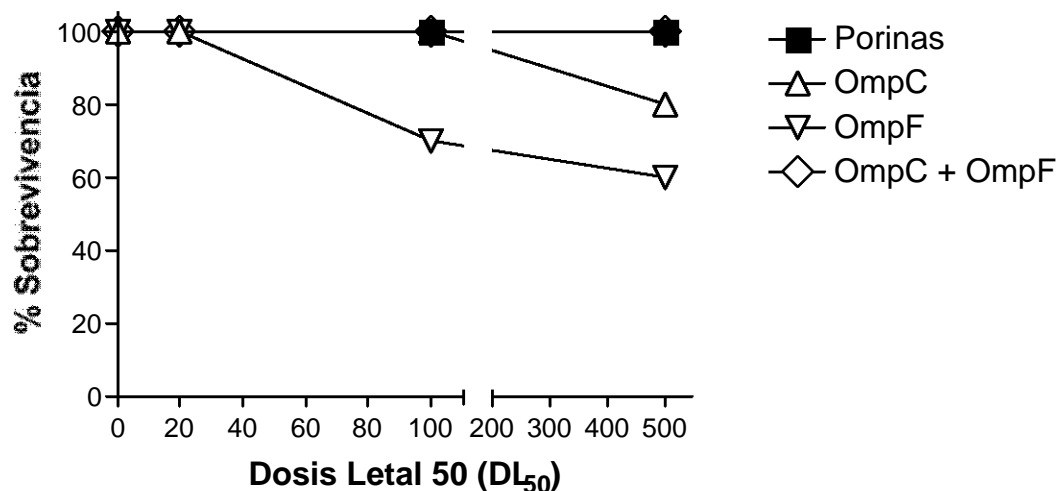


Figura 23. La porina OmpC posee mayor capacidad protectora comparada con OmpF. Grupos de 10 ratones /c fueron inmunizados con porinas, OmpC y OmpF a los días 0 y 15. Al día 25, se retaron con 20 DL₅₀, 100 DL₅₀ y 500 DL₅₀ de *S. typhi* respectivamente. 1 DL₅₀ = 1.17 x 10⁵. La supervivencia se observó durante los 10 días posteriores al reto.

IX. DISCUSION.

Los resultados del presente estudio señalaron la capacidad de las porinas de *S. enterica* serovar Typhi de inducir títulos altos de anticuerpos con actividad bactericida, durante toda la vida en ratones BALB/c inmunizados con 10 µg de porinas, sin adyuvante (figura 7 y figura 11). La unión de los anticuerpos bactericidas se confirmaron mediante citometría de flujo, donde se encontró que los anticuerpos IgG contenidos en el suero anti-porinas fueron capaces de reconocer a la cepa tipo silvestre de *S. enterica* serovar Typhi (figura 10). Además, mediante ELISA estas IgG se identificaron como IgG2b e IgG2a (figura 9), las cuales son las subclases que poseen la mejor capacidad de activar la vía clásica del complemento (182).

La respuesta de anticuerpos de larga duración se define como la presencia de inmunoglobulinas, a nivel sistémico o local, en los individuos inmunizados durante años que puede conferir inmunidad contra reinfecciones. Estos anticuerpos funcionan como la primera defensa contra bacterias, virus y parásitos (141, 159). Sin embargo, en muchos casos la presencia de títulos altos de anticuerpos no necesariamente correlacionan con una actividad biológica de ellos. Por ello, es necesario estudiar algunos parámetros muy importantes de los anticuerpos como lo son su especificidad, isotipo, subclase y concentración los cuales van a determinar su función efectora, tal como la neutralización, la opsonización, la fagocitosis y capacidad de activar al complemento (183, 184). Durante el proceso de infección por *Salmonella* se ha descrito que se generan anticuerpos en el suero de pacientes con fiebre tifoidea dirigidos contra los antígenos O, H y Vi. Sin embargo, en muchos casos los altos títulos de estos anticuerpos no poseen relación con el estado de protección ni con la evolución de la enfermedad (8, 185).

Por estas razones, cuando se observaron títulos altos de anticuerpos anti-porinas (figura 7), se procedió a evaluar la función efectora de estos anticuerpos en los mecanismos de defensa contra *Salmonella*, mediante su capacidad bactericida a través de la activación de la vía clásica del complemento. Se encontraron títulos altos de anticuerpos bactericidas en los sueros de los ratones inmunizados que se mantuvieron hasta la muerte de los ratones por vejez (figura 11). Desde el día 300 los títulos de IgG permanecieron sin cambio hasta el día 476 (aumento de 16 veces con respecto al suero del grupo control); mientras que se observó un decremento en los

títulos de IgM después del día 300 (figura 7). Por ello, estos resultados indican que las IgG de larga duración fueron las responsables de la activación de los mecanismos efectores bacteriolíticos.

En el caso de las bacterias, la reacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo sobre su superficie, provocando la activación de los diferentes componentes del complemento de manera que se ejerce un efecto lítico. Por lo tanto, se evaluó si las IgG presentes en los sueros anti-porinas tenían la capacidad de reconocer de manera directa a la bacteria intacta. Ésto se realizó mediante citometría de flujo. Se observó que los anticuerpos IgG anti-porinas de larga duración fueron capaces de reconocer a *Salmonella* en forma directa (figura 10). Dado que las subclases que mejor fijan el complemento son la IgG2a y la IgG2b (182), por lo tanto, la presencia de ambas subclases en la respuesta de larga duración (figura 9) indica que ambas son las responsables del efecto bactericida de memoria. No obstante, la presencia de las otras subclases IgG1 e IgG3 anti-porinas (figura 9), sugiere la existencia de otras funciones biológicas no bactericidas de los anticuerpos presentes en los sueros anti-porinas, como lo son la neutralización de la bacteria y fagocitosis mediada por los receptores Fc (183). Este mecanismo bacteriolítico presente en los sueros anti-porinas, representa uno de los mecanismos efectores del sistema inmune contra *Salmonella* durante la bacteremia.

Para que una vacuna tenga éxito se busca que ésta genere una respuesta de memoria. Uno de los mecanismos que se han estudiado para la inducción de una inmunidad humoral de larga duración es el antígeno, el cual está presente durante la inmunización o infección. Las infecciones periódicas o endémicas generan una reexposición al antígeno que mantiene una respuesta prolongada contra el agente infeccioso; mientras que las infecciones crónicas o latentes representan un reto antigénico continuo (159). Sin embargo, se ha observado una inmunidad humoral de larga duración en ausencia de infecciones, es decir, independiente del estímulo antigénico. Se han propuesto dos hipótesis para explicar lo anterior: i) existe una población de células plasmáticas de vida media larga, residentes en la médula ósea, que potencialmente son productoras de anticuerpos durante probablemente toda la vida de un individuo (145, 186); ii) los linfocitos B de memoria se pueden diferenciar continuamente hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos, independientemente del estímulo específico del antígeno, mediante la

activación policlonal vía TLRs (162). Sin embargo, es muy probable que todos estos mecanismos no sean excluyentes y se presenten simultáneamente durante la inmunidad humoral de larga duración. Sin embargo, por el momento no se disponen de datos que apoyen alguna de las hipótesis anteriores.

Se detectó la presencia temprana de IgG3 al día 4 de inmunización (figura 9). Dado que para el cambio de isotipo se requiere más tiempo para que el linfocito B inicie la producción de IgG, probablemente esta respuesta de IgG3 rápida pudiera ser originada por la población de linfocitos B1 residente en zona marginal que presenta los marcadores (CD21^{bajo}, CD23^{bajo}) (187). Además, estas inmunoglobulinas pudieran ser anticuerpos naturales, con capacidad protectora contra infecciones por patógenos gastrointestinales (188). Por otra parte, un resultado inesperado fue observar la presencia de IgM (su vida media es solo algunos días) de larga duración. Los títulos de anticuerpos IgM presentaron 6 y 4 veces de incremento a los 180 y 300 días posteriores de la inmunización (figura 7). Este resultado basado en los datos publicados por Alugupalli y cols. (189), sugiere la especulación que estas IgM de larga duración pudieran ser producidas por una subpoblación de linfocitos B, denominados B1b (IgM^{high}, IgD^{low}, Mac1⁺, CD5⁻) que se han reportado que residen en la cavidad peritoneal e incluso pueden sostener una respuesta de IgM hasta los 230 días posteriores de la inmunización (189).

Debido a que las porinas son moléculas muy conservadas en la familia de *Enterobacteriaceae* (73), por ello también se evaluó la reactividad cruzada en contra de otras bacterias Gram-negativas. La capacidad del suero anti-porinas de larga duración de reconocer a *S. enterica* serovar Typhimurium y una cepa de *E. coli* de la flora normal de ratón se analizó por citometría de flujo. Se encontró una ligera reactividad cruzada hacia *E. coli* y no se observó reconocimiento en contra de *S. enterica* serovar Typhimurium (figura 12). Ésto confirma los datos publicados recientemente en donde se reportó que los sueros de voluntarios inmunizados con porinas de *S. enterica* serovar Typhi no poseen reactividad cruzada hacia las porinas de *E. coli* (114). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que los anticuerpos inducidos por las porinas reconocen principalmente a determinantes antigénicos específicos de especie (serotipo Typhi), que se encuentran expuestos en la superficie de la bacteria, haciendo posible la fijación del complemento y causando la lisis de *Salmonella*.

Recientemente se publicó que *Salmonella* es capaz de infectar y sobrevivir en una vacuola tardía endosomal-lisosomal en linfocitos B activados. Sin embargo, el linfocito B no posee la capacidad de activar los mecanismos efectores bacteriolíticos que permiten la destrucción de la bacteria, por lo que *Salmonella* puede persistir y diseminar la infección (190). Este trabajo, en el contexto de nuestros resultados, sugiere el estudio de las vías de procesamiento de las porinas y éstas proteínas pudieran ser interesantes candidatos que le permitan al linfocito B activar a sus mecanismos efectores.

Mediante el proceso de obtención de las porinas por el método de Nikaido y su purificación mediante exclusión molecular utilizando una columna de Sephacryl S-200, se obtiene principalmente un complejo formado por OmpC, OmpF y 0.2 ng de LPS/ μ g de proteína. Por esta razón, fue necesario evaluar la participación del LPS en la inmunogenicidad que inducen las porinas. Para ello, se determinaron los anticuerpos anti-LPS presentes en los sueros de los ratones BALB/c inmunizados y se encontraron bajos títulos de IgM que al cabo de 40 días dejaron de presentarse (figura 13). Además de lo anterior, el experimento más importante para determinar la influencia del LPS lo fue la inmunización de la cepa de ratones C3H/HeJ (168), que presentan una mutación en el dominio intracelular de TLR4 (dominio TIR) que impide la interacción del dominio TIR con otra(s) molécula(s) adaptadoras. Dado ello, estos ratones no son capaces de señalar mediante TLR4 haciéndolos hiporespondedores al efecto del LPS (191). En estos ratones, la cinética de anticuerpos que se presentó fue muy similar a la observada en el fondo BALB/c, sin embargo los títulos de anticuerpos durante la respuesta primaria y secundaria fueron ligeramente menores (figura 11 y figura 16). Los ratones C3H/HeJ no fueron capaces de producir IgG3 y la subclase IgG1 presentó una disminución en los títulos de anticuerpos comparados con los observados en BALB/c (figuras 15 y 9), ambas subclases se caracterizan por reconocer antígenos timo independiente como lo son las moléculas de naturaleza polisacáridica (178, 179). Mientras que las subclases IgG2a e IgG2b presentaron títulos de anticuerpos muy similares comparados con los presentes en BALB/c (figuras 15 y 9). Esto sugiere que probablemente el LPS contaminante pudiera participar como adyuvante en la producción de IgG3 e IgG1; sin embargo, la producción de las subclases IgG2a e IgG2b con capacidad bactericida de larga duración no son afectadas por el LPS.

Se ha demostrado que el LPS es importante en la organización estructural de los trímeros y en la expresión de las porinas en la membrana externa (86). Además esta organización estructural puede regular la inmunogenicidad de un antígeno, como es el caso de la porina PorB de *N. meningitidis*. Se ha reportado que la capacidad bactericida de un suero anti-PorB se incrementa si la proteína se inmuniza en liposomas (probablemente esta porina en estas condiciones tiene una conformación muy similar a la nativa), incluso la presencia del lípido A en los liposomas también se ha encontrado que incrementa la inmunogenicidad de PorB (el lípido A puede causar su reensamblaje mediante la ocupación de sitios de unión hacia el LPS que en forma natural se encuentra asociado a las porinas en la membrana) (181). Sin embargo, en el caso de las porinas de *Salmonella*, no se disponen de datos experimentales en los cuales se haya evaluado la participación de la organización estructural en la respuesta inmune. Por ello, las porinas que al purificarse se encuentran formando trímeros (estructura nativa) recibieron un ligero calentamiento (sin llegar a desnaturalizarse) para generar monómeros, los cuales indujeron una respuesta de IgG con bajos títulos de anticuerpos (aproximadamente 6 veces menores con respecto a los trímeros) (figura 17B). Además, durante la respuesta primaria sólo se generó la subclase IgG2b (figura 18) y fue necesario un refuerzo para promover el cambio de isotipo hacia las otras subclases de IgG. Esto demuestra que la forma nativa de las porinas, a nivel de su organización estructural, es importante para la activación del linfocito B, tal y como fue propuesto originalmente para antígenos de origen viral (180).

La preparación proteica de porinas esta compuesta por dos proteínas de membrana externa: OmpC y OmpF de 36 y 38 kDa, respectivamente. Utilizando las cepas de *Salmonella* que sólo expresan a la porina OmpC (STYF302) y OmpF (STYC171) (Tabla 2) fue posible la purificación independiente de cada una de estas porinas (figura 6, carril 3 y 4). Una vez caracterizadas a nivel bioquímico, se inmunizaron bajo el mismo protocolo descrito para las porinas, con el objetivo de conocer la contribución de cada una de estas proteínas en la inducción de anticuerpos bactericidas de larga duración, así como su participación en la capacidad protectora empleando un modelo murino de infección. Los resultados más importantes fueron que la respuesta de IgG3 rápida, al día 4, la indujo la porina OmpC (figura 20). Además el suero anti-OmpC presentó mayores títulos de anticuerpos bactericidas (figura 22). Aun cuando los títulos de IgG inducidos por OmpC y

OmpF, determinados por ELISA, durante el día 30 fueron similares, existen claras diferencias en su capacidad bactericida: la porina OmpC indujo títulos de 16 veces mayor capacidad bacteriolítica con respecto a OmpF (figura 19 y figura 22). Incluso ambas porinas presentaron una respuesta de IgG larga duración hasta el día 300 (último día en la que se midió la respuesta de anticuerpos) (figura 19). Sin embargo, los títulos de IgG inducidos por OmpF presentaron una disminución de 16 veces con respecto a OmpC y la capacidad bactericida del suero anti-OmpF dejó de observarse a partir del día 180 (figura 19 y 22). Es decir, la porina OmpC generó una respuesta de anticuerpos IgG con efecto bactericida de larga duración con capacidad de reconocer a la bacteria intacta (figura 21A). Mientras que la porina OmpF presentó una respuesta de anticuerpos, pero estas inmunoglobulinas dejaron de reconocer a la bacteria y promover una capacidad bacteriolítica (figuras 21B y 22). Los resultados anteriores sugieren que las IgG de larga duración inducidos por la porina OmpC reconocen a epitopos expuestos y estos anticuerpos poseen la capacidad de activar a los componentes del complemento, mientras que los anticuerpos generados por OmpF probablemente reconocen a epitopos no accesibles.

Es importante considerar que los ratones que se utilizaron para caracterizar a la respuesta de anticuerpos y los ensayos de protección fue la cepa BALB/c. Estos ratones poseen una predisposición a desarrollar una respuesta de linfocitos T tipo 2 (Th2), es decir, con mayor producción de IL-4 e IgG1. La influencia del fondo genético fue evidente en los resultados de Thatte y Galdiero quienes inmunizaron a ratones BALB/c con una cepa de *Salmonella* inactivada por calor y porinas purificadas de *S. enterica* serovar Typhimurium y encontraron una respuesta Th2, con producción de IL-4, baja respuesta de DTH y altos niveles en suero de IgG1 (117, 192). Sin embargo, aunque todavía no se evalúa la producción de citocinas por las porinas, nuestros resultados muestran que se inducen todas las subclases de IgG con capacidad bactericida, a pesar del fondo genético, comprobando la alta inmunogenicidad de las porinas.

Los primeros estudios de protección por las PME de *S. enterica* serovar Typhi los efectuó Isibasi y col en 1988 quienes encontraron que las PME confirieron protección específica del 100% al reto con *S. enterica* serovar Typhi (96). Posteriormente, se purificaron las porinas y se encontró que confirieron protección del 90% al reto con 500 DL₅₀ (104). Finalmente se encontró que la porina OmpC_r fue capaz de inducir una protección del 40% al reto con 100 DL₅₀ (106). Sin

embargo, éste es un antígeno recombinante: la porina OmpC de *S. enterica* serovar Typhi expresada en la cepa de *E. coli* UH302/pST13. Por ello, los resultados empleando este antígeno recombinante pudieran estar limitados debido a que nuestros resultados mostraron que es muy importante la estructura nativa del antígeno a nivel de su organización estructural para la activación del linfocito B (figura 17 y 18). Por esta razón, fue necesario efectuar los estudios de protección con los antígenos nativos. Se encontró que la porina OmpC confirió 100% y 80% de protección al reto con 100 y 500 DL₅₀, respectivamente; mientras que la porina OmpF indujo 70% y 60% de protección al reto con 100 y 500 DL₅₀, respectivamente (figura 23). Es decir, al reto con 100 y 500 DL₅₀, la porina OmpC confirió el 100% y 80 % de protección, en cambio OmpC_r solo indujo el 40% y 0% de protección. Estos resultados sugieren, que los antígenos nativos son las mejores moléculas inmunogénicas y deben de emplearse en el desarrollo de vacunas.

Finalmente, considerando que las actuales vacunas contra la fiebre tifoidea poseen algunas desventajas como lo son la inducción de protección durante corto tiempo, presencia de cepas resistentes a antibióticos y existencia de cepas carentes en la expresión del antígeno Vi. Por ello, es necesario caracterizar nuevos antígenos que pudieran inducir una inmunidad protectora a largo plazo. Por tal motivo, se decidió estudiar a las porinas ya que que son moléculas altamente conservadas y poseen una abundante expresión en la membrana externa de *Salmonella* y, por lo tanto son accesibles al reconocimiento por los anticuerpos. Además los antígenos de naturaleza proteica ofrecen la ventaja sobre los de naturaleza polisacáridica de inducir anticuerpos de diferente isotipo con mayor afinidad y, eventualmente favorecer una respuesta inmune de memoria. En este trabajo se reporta la caracterización de las porinas de *S. enterica* serovar Typhi como inmunógenos protectores que generan y mantienen una respuesta de anticuerpos con efecto bactericida específico de larga duración. En conclusión, nuestros resultados poseen una valiosa implicación para confirmar a las porinas como candidato a vacuna contra la fiebre tifoidea.

X. CONCLUSIONES.

- ◆ La inmunización con las porinas de *S. enterica* serovar Typhi, sin adyuvante, induce una respuesta de anticuerpos IgG2a e IgG2b con capacidad bactericida de larga duración.
- ◆ Los anticuerpos bactericidas anti-porinas no presentan reactividad cruzada contra *S. enterica* serovar Typhimurium, sin embargo se observó una ligera reactividad cruzada contra *E. coli* de la flora normal.
- ◆ El LPS contaminante presente en las preparaciones proteicas, no afecta la generación de los anticuerpos IgG2a e IgG2b anti-porinas con capacidad bactericidas de larga duración.
- ◆ OmpC es la proteína presente en la preparación proteica de porinas que posee mayor inmunogenicidad y efecto protector.

XI. BIBLIOGRAFIA.

1. Everest, P., J. Wain, M. Roberts, G. Rook, and G. Dougan. 2001. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol* 9:316-320.
2. Kauffmann, F. 1966. The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, Denmark:
3. Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol* 38:2465-2467.
4. Penner, J.L. 1988. International Committee on Systematic Bacteriology Taxonomic Subcommittee on Enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol* 38:223-224.
5. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Co. Inc. New York, N.Y.,
6. Popoff, M.Y., and L. Le Minor. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France,
7. Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other Salmonella infections. E. y S. Livinstong, L.T.D. London, 4-9 pp.
8. Hornick, R.B., S.E. Greisman, T.E. Woodward, H.L. DuPont, A.T. Dawkins, and M.J. Snyder. 1970. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med* 283:686-691.
9. Pang, T., M.M. Levine, B. Ivanoff, J. Wain, and B.B. Finlay. 1998. Typhoid fever: important issues still remain. *Trends Microbiol* 6:131-133.
10. Epidemiología, B.d. 2005. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Unico de Información. Año 2:(www.ssj.jalisco.gov.mx).
11. Baumler, A.J., R.M. Tsois, F.A. Bowe, J.G. Kusters, S. Hoffmann, and F. Heffron. 1996. The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* 64:61-68.
12. Baumler, A.J., R.M. Tsois, and F. Heffron. 1996. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:279-283.
13. van der Velden, A.W., A.J. Baumler, R.M. Tsois, and F. Heffron. 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 66:2803-2808.
14. Jepson, M.A., and M.A. Clark. 2001. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect* 3:1183-1190.
15. Pier, G.B., M. Grout, T. Zaidi, G. Meluleni, S.S. Mueschenborn, G. Banting, R. Ratcliff, M.J. Evans, and W.H. Colledge. 1998. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82.

16. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367.
17. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A.J. Bauml, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W.T. Parks, and F.C. Fang. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401:804-808.
18. Ohl, M.E., and S.I. Miller. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52:259-274.
19. Fu, Y., and J.E. Galan. 1999. A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401:293-297.
20. Hardt, W.D., L.M. Chen, K.E. Schuebel, X.R. Bustelo, and J.E. Galan. 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93:815-826.
21. Zhou, D., M.S. Mooseker, and J.E. Galan. 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283:2092-2095.
22. Jones, B.D., and S. Falkow. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14:533-561.
23. Biozzi, G., J.G. Howard, B.N. Halpern, C. Stiffel, and D. Mouton. 1960. The kinetics of blood clearance of isotopically labelled *Salmonella enteritidis* by the reticulo-endothelial system in mice. *Immunology* 3:74-89.
24. Yrlid, U., M. Svensson, A. Hakansson, B.J. Chambers, H.G. Ljunggren, and M.J. Wick. 2001. In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 69:5726-5735.
25. Miller, S.I., A.M. Kukral, and J.J. Mekalanos. 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5054-5058.
26. Wick, M.J., J.L. Madara, B.N. Fields, and S.J. Normark. 1991. Molecular cross talk between epithelial cells and pathogenic microorganisms. *Cell* 67:651-659.
27. Alpuche Aranda, C.M., J.A. Swanson, W.P. Loomis, and S.I. Miller. 1992. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10079-10083.
28. Dunlap, N.E., W.H. Benjamin, Jr., R.D. McCall, Jr., A.B. Tilden, and D.E. Briles. 1991. A 'safe-site' for *Salmonella typhimurium* is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microb Pathog* 10:297-310.
29. Cheminay, C., D. Chakravorty, and M. Hensel. 2004. Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect Immun* 72:468-477.

30. Monack, D.M., W.W. Navarre, and S. Falkow. 2001. *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* 3:1201-1212.
31. Bitar, R., and J. Tarpley. 1985. Intestinal perforation in typhoid fever: a historical and state-of-the-art review. *Rev Infect Dis* 7:257-271.
32. Wain, J., N.T. Hoa, N.T. Chinh, H. Vinh, M.J. Everett, T.S. Diep, N.P. Day, T. Solomon, N.J. White, L.J. Piddock, and C.M. Parry. 1997. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis* 25:1404-1410.
33. Ackers, M.L., N.D. Puhr, R.V. Tauxe, and E.D. Mintz. 2000. Laboratory-based surveillance of *Salmonella* serotype Typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. *Jama* 283:2668-2673.
34. Germanier, R. 1984. Typhoid fever. In *Bacterial Vaccines* (Germanier R. Eds.), Academic Press, 137-165 pp.
35. Cvjetanovic, B., and K. Uemura. 1965. The Present Status of Field and Laboratory Studies of Typhoid and Paratyphoid Vaccines with Special Reference to Studies Sponsored by World Health Organization. *Bull World Health Organ* 32:29-36.
36. Yugoslav-Typhoid-Commission. 1964. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-dried and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. *Bull World Health Organ* 30:623-630.
37. Hejfec, L.B., L.V. Salmin, M.Z. Lejtman, M.L. Kuz'minova, A.V. Vasil'eva, L.A. Levina, T.G. Bencianova, E.A. Pavlova, and A.A. Antonova. 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull World Health Organ* 34:321-339.
38. Polish-Typhoid-Committee. 1966. Controlled field trials and laboratory studies of the effectiveness of typhoid vaccines in Poland 1961-1964. *Bull World Health Organ* 34:211-222.
39. Levine, M.M., C. Ferreccio, R.E. Black, C.O. Tacket, and R. Germanier. 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 3:S552-567.
40. Collins, F.M. 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol Rev* 38:371-402.
41. Germanier, R., and E. Fuer. 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* 131:553-558.
42. Merican, I. 1997. Typhoid fever: present and future. *Med J Malaysia* 52:299-308.
43. Garmory, H.S., K.A. Brown, and R.W. Titball. 2002. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26:339-353.
44. Wahdan, M.H., C. Serie, Y. Cerisier, S. Sallam, and R. Germanier. 1982. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: three-year results. *J Infect Dis* 145:292-295.
45. Levine, M.M., C. Ferreccio, P. Abrego, O.S. Martin, E. Ortiz, and S. Cryz. 1999. Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine* 17 Suppl 2:S22-27.

46. Levine, M.M., C. Ferreccio, S. Cryz, and E. Ortiz. 1990. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. *Lancet* 336:891-894.
47. Simanjuntak, C.H., F.P. Paleologo, N.H. Punjabi, R. Darmowigoto, Soeprawoto, H. Totosudirjo, P. Haryanto, E. Suprijanto, N.D. Witham, and S.L. Hoffman. 1991. Oral immunisation against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine. *Lancet* 338:1055-1059.
48. Lundin, B.S., C. Johansson, and A.M. Svennerholm. 2002. Oral immunization with a *Salmonella enterica* serovar typhi vaccine induces specific circulating mucosa-homing CD4(+) and CD8(+) T cells in humans. *Infect Immun* 70:5622-5627.
49. Salerno-Goncalves, R., M.F. Pasetti, and M.B. Sztein. 2002. Characterization of CD8(+) effector T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 169:2196-2203.
50. Levine, M.M. 1999. Typhoid Fever Vaccines. In Vaccines (Plotkin S.A. and Orenstein W.A. Eds.), WB Saunders Company, Philadelphia, USA., 604-605 pp.
51. Felix, A., and R.M. Pitt. 1934. A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet* 2:186-191.
52. Felix, A., A.S. Krikorian, and R. Reitler. 1935. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigen in cases of typhoid fever and of Vi-antibody in their sera. *Journal of Hygiene* 35:421-427.
53. Felix, A., and R.M. Pitt. 1951. The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. *Journal of Hygiene* 49:92-109.
54. Looney, R.J., and R.T. Steigbigel. 1986. Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro. *J Lab Clin Med* 108:506-516.
55. Landy, M. 1954. Studies on Vi antigen. VI. Immunization of human beings with purified Vi antigen. *Am J Hyg* 60:52-62.
56. Landy, M., A.G. Johnson, and M.E. Webster. 1961. Studies on Vi antigen. VIII. Role of acetyl in antigenic activity. *Am J Hyg* 73:55-65.
57. Whiteside, R.E., and E.E. Baker. 1961. The Vi antigens of the Enterobacteriaceae. V. Serologic differences of Vi antigens revealed by deacetylation. *J Immunol* 86:538-542.
58. Wong, K.H., J.C. Feeley, R.S. Northrup, and M.E. Forlines. 1974. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. I. Isolation and immunologic properties in animals. *Infect Immun* 9:348-353.
59. Tacket, C.O., C. Ferreccio, J.B. Robbins, C.M. Tsai, D. Schulz, M. Cadoz, A. Goudeau, and M.M. Levine. 1986. Safety and immunogenicity of two *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. *J Infect Dis* 154:342-345.

60. Acharya, I.L., C.U. Lowe, R. Thapa, V.L. Gurubacharya, M.B. Shrestha, M. Cadoz, D. Schulz, J. Armand, D.A. Bryla, B. Trollfors, and et al. 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. *N Engl J Med* 317:1101-1104.
61. Wandel, G. 1997. Efficacy of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in South Africa. *Vaccine* 15:1815.
62. Klugman, K.P., H.J. Koornhof, J.B. Robbins, and N.N. Le Cam. 1996. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine* 14:435-438.
63. Kossaczka, Z., F.Y. Lin, V.A. Ho, N.T. Thuy, P. Van Bay, T.C. Thanh, H.B. Khiem, D.D. Trach, A. Karpas, S. Hunt, D.A. Bryla, R. Schneerson, J.B. Robbins, and S.C. Szu. 1999. Safety and immunogenicity of Vi conjugate vaccines for typhoid fever in adults, teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam. *Infect Immun* 67:5806-5810.
64. Szu, S.C., D.N. Taylor, A.C. Trofa, J.D. Clements, J. Shiloach, J.C. Sadoff, D.A. Bryla, and J.B. Robbins. 1994. Laboratory and preliminary clinical characterization of Vi capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Infect Immun* 62:4440-4444.
65. Saha, M.R., T. Ramamurthy, P. Dutta, and U. Mitra. 2000. Emergence of *Salmonella typhi* Vi antigen-negative strains in an epidemic of multidrug-resistant typhoid fever cases in Calcuta, India. *Natl. J. India* 13:54.
66. Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell envelope of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* 104:882-889.
67. Schnaitman, C.A. 1974. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. 3. Evidence that the major protein of *Escherichia coli* O111 outer membrane consists of four distinct polypeptide species. *J Bacteriol* 118:442-453.
68. Bragg, P.D., and C. Hou. 1972. Organization of proteins in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 274:478-488.
69. Inouye, M., and M.L. Yee. 1973. Homogeneity of envelope proteins of *Escherichia coli* separated by gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *J Bacteriol* 113:304-312.
70. Lugtenberg, B., and L. Van Alphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 737:51-115.
71. DiRienzo, J.M., K. Nakamura, and M. Inouye. 1978. The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. *Annu Rev Biochem* 47:481-532.
72. Osborn, M.J., and H.C. Wu. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 34:369-422.
73. Nikaido, H. 1996. Outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (F.C. Neidhard, J.L. Ingraham, R. Curtiss III, E.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger Eds.), ASM Press, Washington, D.C., 29-47 pp.

74. Datta, D.B., B. Arden, and U. Henning. 1977. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J Bacteriol* 131:821-829.
75. Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 415:335-377.
76. Galdiero, M., M. Vitiello, and S. Galdiero. 2003. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett* 226:57-64.
77. Singh, S.P., Y. Upshaw, T. Abdullah, S.R. Singh, and P.E. Klebba. 1992. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *J Bacteriol* 174:1965-1973.
78. Puente, J.L., V. Flores, M. Fernandez, Y. Fuchs, and E. Calva. 1987. Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61:75-83.
79. Fernandez-Mora, M., R. Oropeza, J.L. Puente, and E. Calva. 1995. Isolation and characterization of ompS1, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene* 158:67-72.
80. Fernandez-Mora, M., J.L. Puente, and E. Calva. 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi ompS2 porin gene. *J Bacteriol* 186:2909-2920.
81. Rodriguez-Morales, O., M. Fernandez-Mora, I. Hernandez-Lucas, A. Vazquez, J.L. Puente, and E. Calva. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ompS1 and ompS2 mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect Immun* 74:1398-1402.
82. Cowan, S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R.A. Pauptit, J.N. Jansonius, and J.P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358:727-733.
83. Kim, H. 1998. Crystallization of OmpC osmoporin from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54:1399-1400.
84. Arockiasamy, A., and S. Krishnaswamy. 1999. Crystallization of the immunodominant outer membrane protein OmpC; the first protein crystals from *Salmonella typhi*, a human pathogen. *FEBS Lett* 453:380-382.
85. Cowan, S.W., and J.P. Rosenbusch. 1994. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* 264:914-916.
86. Ried, G., I. Hindennach, and U. Henning. 1990. Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA, OmpC, and OmpF. *J Bacteriol* 172:6048-6053.
87. Ferguson, A.D., E. Hofmann, J.W. Coulton, K. Diederichs, and W. Welte. 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282:2215-2220.
88. Kuusi, N., M. Nurminen, H. Saxen, M. Valtonen, and P.H. Makela. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect Immun* 25:857-862.

89. Kuusi, N., M. Nurminen, H. Saxen, and P.H. Makela. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 34:328-332.
90. Gaines, S., H. Sprinz, J.G. Tully, and W.D. Tigertt. 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge, and the relationship between the numbers of bacilli and morphologic lesions. *J Infect Dis* 118:293-306.
91. Santos, R.L., S. Zhang, R.M. Tsohis, R.A. Kingsley, L.G. Adams, and A.J. Baumler. 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 3:1335-1344.
92. O'Brien, A.D. 1986. Influence of host genes on resistance of inbred mice to lethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Curr Top Microbiol Immunol* 124:37-48.
93. Parkhill, J., G. Dougan, K.D. James, N.R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K.L. Mungall, S.D. Bentley, M.T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connor, A. Cronin, P. Davis, R.M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T.T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T.S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B.G. Barrell. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413:848-852.
94. Zhang, S., R.A. Kingsley, R.L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R.M. Tsohis, L.G. Adams, and A.J. Baumler. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 71:1-12.
95. Powell, C.J., Jr., C.R. DeSett, J.P. Lowenthal, and S. Berman. 1980. The effect of adding iron to mucin on the enhancement of virulence for mice of *Salmonella typhi* strain TY 2. *J Biol Stand* 8:79-85.
96. Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. Gonzalez, J. Moreno, and J. Kumate. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d, Vi. *Infect Immun* 56:2953-2959.
97. Singh, M., N.K. Ganguly, L. Kumar, and H. Vohra. 1999. Protective efficacy and immunogenicity of Vi-porin conjugate against *Salmonella typhi*. *Microbiol Immunol* 43:535-542.
98. Basso, H., F. Rharbaoui, L.H. Staendner, E. Medina, F. Garcia-Del Portillo, and C.A. Guzman. 2002. Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* 70:5404-5411.
99. Spaun, J. 1964. Studies on the Influence of the Route of Immunization in the Active Mouse Protection Test with Intraperitoneal Challenge for Potency Assay of Typhoid Vaccines. *Bull World Health Organ* 31:793-798.
100. Verdugo-Rodriguez, A., L.H. Gam, S. Devi, C.L. Koh, S.D. Puthucheary, E. Calva, and T. Pang. 1993. Detection of antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein (OMP) preparation in typhoid fever patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 11:45-52.

101. Verdugo-Rodriguez, A., Y. Lopez-Vidal, J.L. Puente, G.M. Ruiz-Placios, and E. Calva. 1993. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:248-254.
102. Calderon, I., S.R. Lobos, H.A. Rojas, C. Palomino, L.H. Rodriguez, and G.C. Mora. 1986. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect Immun* 52:209-212.
103. Ortiz, V., A. Isibasi, E. Garcia-Ortigoza, and J. Kumate. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol* 27:1640-1645.
104. Isibasi, A., V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, R. Pelayo, C.R. Gonzalez, J.A. Garcia, and J. Kumate. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 10:811-813.
105. Paniagua, J., A. Isibasi, R. Pelayo, V. Ortiz, M. Muy, C. Gonzalez, J.A. Garcia, and S. Islas. 1989. [Monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Salmonella typhi* 9,12,VI:d. Analysis of passive protection in a mouse model of typhoid fever]. *Arch Invest Med (Mex)* 20:315-320.
106. Isibasi, A., J. Paniagua, M.P. Rojo, N. Martin, G. Ramirez, C.R. Gonzalez, C. Lopez-Macias, J. Sanchez, J. Kumate, and V. Ortiz-Navarrete. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann N Y Acad Sci* 730:350-352.
107. Alurkar, V., and R. Kamat. 1997. Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae. *Infect Immun* 65:2382-2388.
108. Gonzalez, C.R., A. Isibasi, V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, J.A. Garcia, F. Blanco, and J. Kumate. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol Immunol* 37:793-799.
109. Gonzalez, C.R., M.V. Mejia, J. Paniagua, V. Ortiz-Navarrete, G. Ramirez, and A. Isibasi. 1995. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. *Arch Med Res* 26 Spec No:S99-103.
110. Blanco, F., A. Isibasi, C. Raul Gonzalez, V. Ortiz, J. Paniagua, C. Arreguin, and J. Kumate. 1993. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J Infect Dis* 25:73-80.
111. Diaz-Quinonez, A., N. Martin-Orozco, A. Isibasi, and V. Ortiz-Navarrete. 2004. Two *Salmonella* OmpC K(b)-restricted epitopes for CD8⁺-T-cell recognition. *Infect Immun* 72:3059-3062.
112. Paniagua-Solis, J., N. Martín-Orozco, V. Ortiz-Navarrete, G. Ramírez, C. González-Bonilla, and A. Isibasi. 1995. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Immun & Infect Dis* 5:244-249.
113. **Secundino, I.**, J. Paniagua-Solis, A. Isibasi, and J. Sanchez. 1999. A cloning vector for efficient generation of cholera toxin B gene fusions for epitope screening. *Mol Biotechnol* 11:101-104.
114. Salazar-Gonzalez, R.M., C. Maldonado-Bernal, N.E. Ramirez-Cruz, N. Rios-Sarabia, J. Beltran-Nava, J. Castanon-Gonzalez, N. Castillo-Torres, J.A. Palma-Aguirre, M. Carrera-Camargo, C. Lopez-Macias, and A.

- Isibasi. 2004. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett* 93:115-122.
115. Matsui, K., and T. Arai. 1992. The comparison of cell-mediated immunity induced by immunization with porin, viable cells and killed cells of *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Immunol* 36:269-278.
116. Gupta, S. 1998. Priming of T-cell responses in mice by porins of *Salmonella typhimurium*. *Scand J Immunol* 48:136-143.
117. Galdiero, M., L. De Martino, A. Marcatili, I. Nuzzo, M. Vitiello, and G. Cipollaro de l'Ero. 1998. Th1 and Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella typhimurium* porins. *Immunology* 94:5-13.
118. Tabaraie, B., B.K. Sharma, P.R. Sharma, R. Sehgal, and N.K. Ganguly. 1994. Stimulation of macrophage oxygen free radical production and lymphocyte blastogenic response by immunization with porins. *Microbiol Immunol* 38:561-565.
119. Marcatili, A., M. D'Isanto, M. Galdiero, U. Pagnini, E. Palomba, M. Vitiello, and F. Martone. 2000. Role of *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* and *Salmonella typhimurium* porins on inducible nitric oxide release by murine macrophages. *Res Microbiol* 151:217-228.
120. Donnarumma, G., F. Brancaccio, G. Cipollaro de l'Ero, A. Folgore, A. Marcatili, and M. Galdiero. 1996. Release of GM-CSF, sE-selectin and sICAM-1 by human vascular endothelium stimulated with gram-negative and gram-positive bacterial components. *Endothelium* 4:11-12.
121. Tufano, M.A., C. Tetta, L. Biancone, E.L. Iorio, A. Baroni, A. Giovane, and G. Camussi. 1992. *Salmonella typhimurium* porins stimulate platelet-activating factor synthesis by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 149:1023-1030.
122. Galdiero, M., M. D'Isanto, M. Vitiello, E. Finamore, and L. Peluso. 2001. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induce TNF-alpha, IL-6 and IL-8 release by CD14-independent and CD11a/CD18-dependent mechanisms. *Microbiology* 147:2697-2704.
123. Galdiero, F., C. de L'ero G, N. Benedetto, M. Galdiero, and M.A. Tufano. 1993. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect Immun* 61:155-161.
124. Galdiero, M., G. Cipollaro de L'ero, G. Donnarumma, A. Marcatili, and F. Galdiero. 1995. Interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in human monocytes stimulated with *Salmonella typhimurium* porins. *Immunology* 86:612-619.
125. Galdiero, M., M.G. Pisciotto, E. Galdiero, and C.R. Carratelli. 2003. Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B cells and macrophages but not CD28 and CD152 on T cells. *Clin Microbiol Infect* 9:1104-1111.
126. Galdiero, M., M. D'Isanto, M. Vitiello, E. Finamore, and L. Peluso. 2003. Monocytic activation of protein tyrosine kinase, protein kinase A and protein kinase C induced by porins isolated from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Infect* 46:111-119.

127. Gupta, S., D. Kumar, H. Vohra, and N.K. Ganguly. 1999. Involvement of signal transduction pathways in *Salmonella typhimurium* porin activated gut macrophages. *Mol Cell Biochem* 194:235-243.
128. Galdiero, M., M. Vitiello, E. Sanzari, M. D'Isanto, A. Tortora, A. Longanella, and S. Galdiero. 2002. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activate the transcription factors activating protein 1 and NF- κ B through the Raf-1-mitogen-activated protein kinase cascade. *Infect Immun* 70:558-568.
129. Martin-Orozco, N., A. Isibasi, and V. Ortiz-Navarrete. 2001. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- γ activation. *Immunology* 103:41-48.
130. Saxen, H. 1984. Mechanism of the protective action of anti-*Salmonella* IgM in experimental mouse salmonellosis. *J Gen Microbiol* 130 (Pt 9):2277-2283.
131. Eisenstein, T.K., L.M. Killar, and B.M. Sultzer. 1984. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: mouse-strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J Infect Dis* 150:425-435.
132. Mastroeni, P., B. Villarreal-Ramos, and C.E. Hormaeche. 1993. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect Immun* 61:3981-3984.
133. Vidal, S.M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73:469-485.
134. Rawlings, D.J., and O.N. Witte. 1994. Bruton's tyrosine kinase is a key regulator in B-cell development. *Immunol Rev* 138:105-119.
135. O'Brien, A.D., I. Scher, and E.S. Metcalf. 1981. Genetically conferred defect in anti-*Salmonella* antibody formation renders CBA/N mice innately susceptible to *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 126:1368-1372.
136. Michetti, P., M.J. Mahan, J.M. Slauch, J.J. Mekalanos, and M.R. Neutra. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 60:1786-1792.
137. Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350:423-426.
138. Mittrucker, H.W., B. Raupach, A. Kohler, and S.H. Kaufmann. 2000. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 164:1648-1652.
139. McSorley, S.J., and M.K. Jenkins. 2000. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 68:3344-3348.
140. Gray, D. 1993. Immunological memory. *Annu Rev Immunol* 11:49-77.
141. MacLennan, I.C., C. Garcia de Vinuesa, and M. Casamayor-Palleja. 2000. B-cell memory and the persistence of antibody responses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:345-350.

142. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
143. Bachmann, M.F., B. Odermatt, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1996. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 183:2259-2269.
144. Schitteck, B., and K. Rajewsky. 1990. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346:749-751.
145. Slifka, M.K., R. Antia, J.K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8:363-372.
146. Zinkernagel, R.M., M.F. Bachmann, T.M. Kundig, S. Oehen, H. Pirchet, and H. Hengartner. 1996. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14:333-367.
147. McHeyzer-Williams, L.J., D.J. Driver, and M.G. McHeyzer-Williams. 2001. Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* 8:52-59.
148. Ziegner, M., G. Steinhauser, and C. Berek. 1994. Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants. *Eur J Immunol* 24:2393-2400.
149. Cumano, A., and K. Rajewsky. 1986. Clonal recruitment and somatic mutation in the generation of immunological memory to the hapten NP. *Embo J* 5:2459-2468.
150. Leanderson, T., E. Kallberg, and D. Gray. 1992. Expansion, selection and mutation of antigen-specific B cells in germinal centers. *Immunol Rev* 126:47-61.
151. Tarlinton, D.M., and K.G. Smith. 2000. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol Today* 21:436-441.
152. Xu, J., T.M. Foy, J.D. Laman, E.A. Elliott, J.J. Dunn, T.J. Waldschmidt, J. Elsemore, R.J. Noelle, and R.A. Flavell. 1994. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1:423-431.
153. Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.
154. Kelsoe, G. 1996. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 4:107-111.
155. Pulendran, B., R. van Driel, and G.J. Nossal. 1997. Immunological tolerance in germinal centres. *Immunol Today* 18:27-32.
156. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188:1679-1689.
157. Tangye, S.G., Y.J. Liu, G. Aversa, J.H. Phillips, and J.E. de Vries. 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 188:1691-1703.

158. Liu, Y.J., C. Barthelemy, O. de Bouteiller, C. Arpin, I. Durand, and J. Banchereau. 1995. Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* 2:239-248.
159. Gourley, T.S., E.J. Wherry, D. Masopust, and R. Ahmed. 2004. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16:323-333.
160. Crotty, S., E.N. Kersh, J. Cannons, P.L. Schwartzberg, and R. Ahmed. 2003. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421:282-287.
161. Cortes, M., and K. Georgopoulos. 2004. Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *J Exp Med* 199:209-219.
162. Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199-2202.
163. Mastroeni, P., C. Simmons, R. Fowler, C.E. Hormaeche, and G. Dougan. 2000. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect Immun* 68:46-53.
164. Ugrinovic, S., N. Menager, N. Goh, and P. Mastroeni. 2003. Characterization and development of T-Cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6(-/-)) mice with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 71:6808-6819.
165. Martinez-Flores, I., R. Cano, V.H. Bustamante, E. Calva, and J.L. Puente. 1999. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:556-562.
166. Benjamin, W.H., Jr., P. Hall, S.J. Roberts, and D.E. Briles. 1990. The primary effect of the Ity locus is on the rate of growth of *Salmonella typhimurium* that are relatively protected from killing. *J Immunol* 144:3143-3151.
167. Swanson, R.N., and A.D. O'Brien. 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: Ity gene is expressed in vivo by 24 hours after infection. *J Immunol* 131:3014-3020.
168. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
169. Nikaïdo, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol* 97:85-100.
170. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
171. Karkhanis, Y.D., J.Y. Zeltner, J.J. Jackson, and D.J. Carlo. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem* 85:595-601.

172. Yin, E.T., C. Galanos, S. Kinsky, R.A. Bradshaw, S. Wessler, O. Luderitz, and M.E. Sarmiento. 1972. Picogram-sensitive assay for endotoxin: gelation of *Limulus polyphemus* blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharides and lipid A from Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 261:284-289.
173. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
174. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
175. Engvall, E., and P. Perlman. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
176. Peeters, C.C., H.C. Rumke, L.C. Sundermann, E.M. Rouppe van der Voort, J. Meulenbelt, M. Schuller, A.J. Kuipers, P. van der Ley, and J.T. Poolman. 1996. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 14:1009-1015.
177. Reed, L.J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
178. Perlmutter, R.M., D. Hansburg, D.E. Briles, R.A. Nicolotti, and J.M. Davie. 1978. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J Immunol* 121:566-572.
179. Rubinstein, L.J., and K.E. Stein. 1988. Murine immune response to the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide. I. Ontogeny. *J Immunol* 141:4352-4356.
180. Bachmann, M.F., U.H. Rohrer, T.M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262:1448-1451.
181. Wright, J.C., J.N. Williams, M. Christodoulides, and J.E. Heckels. 2002. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 70:4028-4034.
182. Germann, T., M. Bongartz, H. Dlugonska, H. Hess, E. Schmitt, L. Kolbe, E. Kolsch, F.J. Podlaski, M.K. Gately, and E. Rude. 1995. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol* 25:823-829.
183. Casadevall, A. 1998. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 6:102-107.
184. Casadevall, A., and L.A. Pirofski. 2004. New concepts in antibody-mediated immunity. *Infect Immun* 72:6191-6196.
185. Einsen, H.N., and G.W. Siskind. 1969. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3:996-1008.
186. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133-134.

187. Obukhanych, T.V., and M.C. Nussenzweig. 2006. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* 203:305-310.
188. Wijburg, O.L., T.K. Uren, K. Simpfendorfer, F.E. Johansen, P. Brandtzaeg, and R.A. Strugnell. 2006. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med* 203:21-26.
189. Alugupalli, K.R., J.M. Leong, R.T. Woodland, M. Muramatsu, T. Honjo, and R.M. Gerstein. 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21:379-390.
190. Rosales-Reyes, R., C. Alpuche-Aranda, L. Ramirez-Aguilar Mde, A.D. Castro-Eguiluz, and V. Ortiz-Navarrete. 2005. Survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infect Immun* 73:3937-3944.
191. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
192. Thatte, J., S. Rath, and V. Bal. 1993. Immunization with live versus killed *Salmonella typhimurium* leads to the generation of an IFN-gamma-dominant versus an IL-4-dominant immune response. *Int Immunol* 5:1431-1436.

XII. ANEXO DE PUBLICACIONES.

ARTICULOS.

1.- **Secundino, I.**, Paniagua-Solís J., Isibasi, A. y Sánchez, J. **1999**. A cloning vector for efficient generation of cholera toxin B gene fusions for epitope screening. *Mol. Biotech.* 11(1): 101-104.

2.- **Secundino, I.**, López-Macías, C., Cervantes-Barragán, L., Gil-Cruz, C., Ríos-Sarabia, N., Pastelín-Palacios, R., Villasis-Keever, M., Becker, I., Puente, J.L., Calva, E. e Isibasi A. **2006**. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 117 (1): 59-70.

CAPITULOS EN LIBROS

1.- Isibasi, A., Patiño, G., Paniagua-Solís, J., **Secundino I.**, Sánchez, J., Tello, S., Maldonado, M. y López-Macias, C. **2001**. Empleo de proteínas quiméricas de regiones expuestas de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi : subunidad B de la toxina del cólera, para la inducción de inmunidad humoral en un modelo murino. En "Las múltiples facetas de la Investigación en Salud: Proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social (García, M., Reyes, H y Viniegra, L. Eds.). Instituto Mexicano del Seguro Social. 13-30 pp.

2.- López-Macias, C., Leclerc, D., Majeau, N., Bachmann, M., Jegelehner, A., **Secundino, I.**, Garcilazo, G., Ramírez, E., Maldonado, M. e Isibasi, A. **2002**. Nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas. En "Las múltiples facetas de la Investigación en Salud 2: Proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social (Martínez, H., Torres, J., Martínez-Cairo, S., García, M y Garduño, J. Eds). Instituto Mexicano del Seguro Social. 49-63 pp.

Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response

Ismael Secundino,¹ Constantino López-Macias,¹ Luisa Cervantes-Barragán,¹ Cristina Gil-Cruz,¹ Nora Ríos-Sarabia,¹ Rodolfo Pastelin-Palacios,² Miguel Angel Villasis-Keever,³ Ingeborg Becker,⁴ José Luis Puente,⁵ Edmundo Calva⁵ and Armando Isibasi¹

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) México, ³Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, México, ⁴Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, México, and ⁵Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México

doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02263.x

Received 29 March 2005; revised 5 August 2005; accepted 26 August 2005.

Ismael Secundino and Constantino López-Macias contributed equally to this work.

Correspondence: Dr Constantino López-Macias, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, PO Box A-047, C.P. 06703 Mexico City, Mexico.

Email: constantino@sminmunologia.org

Senior author: Armando Isibasi,

email: isibasi@prodigy.net.mx

Introduction

Upon antigen contact in the presence of cognate T-cell help, naive B cells differentiate into antibody-secreting plasma cells and memory B cells. During this process, which occurs in germinal centres, B cells undergo affinity maturation and class-switch recombination, giving rise to

Summary

We examined the ability of porins from *Salmonella enterica* serovar *typhi* to induce a long-term antibody response in BALB/c mice. These porins triggered a strong lifelong production of immunoglobulin G (IgG) antibody in the absence of exogenous adjuvant. Analysis of the IgG subclasses produced during this antibody response revealed the presence of the subclasses IgG2b, IgG1, IgG2a and weak IgG3. Despite the high homology of porins, the long-lasting anti-*S. typhi* porin sera did not cross-react with *S. typhimurium*. Notably, the antiporin sera showed a sustained lifelong bactericidal-binding activity to the wild-type *S. typhi* strain, whereas porin-specific antibody titres measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) decreased with time. Because our porin preparations contained the outer membrane proteins C and F (OmpC and OmpF), we evaluated the individual contribution of each porin to the long-lasting antibody response. OmpC and OmpF induced long-lasting antibody titres, measured by ELISA, which were sustained for 300 days. In contrast, although OmpC induced sustained high bactericidal antibody titres for 300 days, postimmunization, the bactericidal antibody titre induced by OmpF was not detected at day 180. These results indicate that OmpC is the main protein responsible for the antibody-mediated memory bactericidal response induced by porins. Taken together, our results show that porins are strong immunogens that confer lifelong specific bactericidal antibody responses in the absence of added adjuvant.

Keywords: bactericidal antibodies; memory B-cell response; OmpC; OmpF; porins; *Salmonella typhi*

different subclasses of immunoglobulin G (IgG) memory B cells, depending on the cytokine environment.^{1,2} Following re-exposure to the same antigen, memory B cells undergo rapid proliferation, culminating in differentiation into plasma cells and in the secretion of high-affinity IgG, which might persist in the circulation for years, thus providing long-term antibody production.^{1,3} However,

because the half-life of serum IgG is < 3 weeks,⁴ continuous antibody production is necessary to sustain IgG antibody titres for long-term antibody-mediated immunity. Thus, memory B-cell differentiation into short-lived or long-lived plasma cells represents an important source of protective antibodies for long-term immunity.^{3,5,6} Although some studies have demonstrated that high systemic antibody titres measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) correlate with immunity against pathogens, efficient B-cell memory and protection depend critically on the bactericidal or neutralizing activity of these antibodies.^{3,5,7} This long-term production of bactericidal-neutralizing antibody constitutes a hallmark of adaptive immunity and is the basis of most effective vaccines.

The mechanisms proposed to explain the long-lasting persistence of antibody titres include the following four explanations. (1) The existence of long-lived memory B cells that survive in the absence of the specific antigen, and which clonally expand to increase the number of antigen-specific cells available for another encounter with their specific antigens. After antigen re-exposure, these cells require less activation than naive B cells to differentiate into antibody-secreting cells. During the recall response, the host is able to respond faster, with higher antibody titres, to the specific antigen.¹ (2) Long-lived antibody-producing plasma cells survive in the bone marrow for long periods, maintaining high protective antibody titres for a long time in the absence of specific antigen.^{8,9} (3) An independent antigenic stimulation via polyclonal or bystander activation maintains memory B cells and provides a continuous source of new plasma cells.¹⁰ (4) An antigen-dependent mechanism, in which the persisting antigen is retained on follicular dendritic cells in germinal centres and maintains the specific switched B cells or memory B cells differentiated into short-lived plasma cells.^{5,11-13} Any or all of these non-exclusive mechanisms could be responsible for maintaining the memory B-cell response.

Long-term, high-affinity protective antibodies are maintained following infection or immunization.^{3,7} However, only a few purified antigens have been studied and found to induce a long-lasting, persisting antibody response in the absence of adjuvants.⁷ For this reason, the characterization of novel antigens with the ability to induce a neutralizing or bactericidal antibody memory response constitutes an important endeavour in understanding protective immunological memory.

Antibody responses are important to achieve protection against salmonella infection. We have previously reported that heat-inactivated sera specific for *Salmonella enterica* serovar *typhi* (hereafter referred as *S. typhi*) outer membrane proteins protected mice against challenge with 50 and 100 lethal doses of the virulent bacteria.¹⁴ In humans, high antibody titres specific to *S. typhi* surface antigens

such as Vi polysaccharide correlate with protection against infection.¹⁵ These studies portray the antibody response as essential to achieving protection against *S. typhi*. In mice, the contribution of the antibody-mediated immune response during salmonella infection has been studied in B-cell-deficient animals.¹⁶⁻¹⁸ These experiments established that protective immunity to *S. typhimurium* depends on the combined action of specific antibodies, B cells and T-cell-acquired immune responses.¹⁶⁻¹⁸ In addition, antibodies to lipopolysaccharide (LPS) O-chains, porin-LPS complexes and, to a lesser degree, native porins are important in acquired resistance to infection by *S. typhimurium*.¹⁹

Because of the ability of porins to elicit a host immune response and thus protection of the host against infection, our group and others have studied porins from *S. typhi* as candidates for a vaccine against typhoid fever,^{20,21} a life-threatening systemic disease that remains an important health problem in some developing countries.²² With up to 10⁵ molecules per cell, porins are the most abundant proteins found in the outer membrane of Gram-negative bacteria; porins assemble in trimers and form stable pores that allow the passive transport of nutrients.²³ The first evidence of the immunogenicity of porins was that the serum of patients in the acute and convalescent phases of typhoid fever induced IgM and IgG antibodies that recognize mainly these proteins.²⁴⁻²⁶ Moreover, porins from several pathogens have been described as activators of the innate and adaptive immune responses.^{27,28} These proteins are agonists for Toll-like receptor 2 (TLR2) and induce the expression of costimulatory molecules, up-regulation of major histocompatibility complex class II molecules, cytokine release by macrophages, and increased antibody production by B cells.²⁹⁻³¹ Immunization with purified porins can protect mice against challenge with virulent salmonella strains.³²⁻³⁶ During the host immune response, *S. typhi* porins induce T-cell and antiporin antibodies.^{20,37-41}

Previous studies have demonstrated that salmonella porins induce the production of predominantly IgG1 after 30 days in BALB/c mice.⁴² We have recently reported that human volunteers vaccinated with *S. typhi* porins produced bactericidal IgG1 and IgG2 antibodies 2 weeks after immunization.²⁰ These studies have demonstrated that porins are good immunogens. Because the ability of *S. typhi* porins to induce a B-cell memory response has not been analysed and bactericidal-neutralizing antibodies are essential for protective B-cell memory, we were interested in studying the capacity of porins to induce a long-term bactericidal antibody response.

We report that immunization of mice with *S. typhi* porins induces a bactericidal antibody response for life. Despite the high homology among porins of different salmonella strains, the long-lasting antiporin sera did not cross-react with *S. typhimurium*, suggesting that the

selection of bactericidal antibodies is directed at unshared exposed epitopes. Analysis of the specific antibody response against OmpC and OmpF porins showed that OmpC is the main component of porins responsible for the antibody-mediated memory bactericidal response.

Materials and methods

Bacterial strains

The wild-type *S. typhi* strain was obtained from ATCC 9993. Isogenic *Salmonella* mutant strains STYF302 (Δ ompF Km^R) and STYC171 (Δ ompC Km^R) expressing OmpC and OmpF, respectively, have been previously described.⁴³ The isogenic mutant strain VALE39 (Δ ompF Km^R Δ ompC Cm^R), deficient in both the OmpF and OmpC porins, was generated for this study. To evaluate cross-reactivity, an *Escherichia coli* strain was isolated from mouse faeces and characterized biochemically.

Immunogens

The salmonella porins (i.e. OmpC and OmpF) were purified from the wild-type *S. typhi* as previously described.²⁰ *Salmonella typhi* strains STYF302 (OmpF⁻) and STYC171 (OmpC⁻) were used as the source of OmpC and OmpF porins, respectively. LPS content was determined by means of the *Limulus* amoebocyte lysate assay (LAL) (Endosafe® KTA, Charles River Endosafe Laboratories, Charleston SC). LPS-free ovalbumin (OVA) Grade VI was purchased from Sigma Chemical Co., St Louis MO. Protein-free *S. typhi* LPS was kindly provided by Dr John S. Gunn, Ohio State University, Columbus, OH.

Mice

Female BALB/c or C3H/HeJ LPS-hyporesponsive mice, 8–10 weeks old, were used and kept in the animal facilities of the Experimental Medicine Department, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), and cared for in conformity with good laboratory practice guidelines.

Immunizations

Groups of mice (three or six mice/group) were immunized intraperitoneally (i.p.) on day 0 and boosted on day 15 with 10 µg of native antigen preparations: porins, OmpC, OmpF. Antigens were diluted in sterile isotonic saline solution (saline) to a total volume of 0.5 ml. No added adjuvant was used for these immunizations. Control mice were injected with saline only. Blood samples were collected from the retro-orbital sinus at various times as indicated in each figure. Individual serum samples were stored at -20° until analysis.

Determination of antibody titres by ELISA

IgM and IgG antibodies. High-binding 96-well polystyrene plates (Corning®, New York NY) were coated with 10 µg/ml of porins, OmpC, OmpF, or LPS and 150 µg/ml for experiments using OVA in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5. Plates were incubated for 1 hr at 37° and then overnight at 4°. Before use, plates were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Non-specific binding was blocked with 5% non-fat dry milk diluted in PBS (PBS-M) for 2 hr at 37°. After washing, mice sera were diluted 1 : 40 in PBS-M and two-fold serial dilutions were added to the wells. Plates were incubated for 2 hr at 37°, followed by six washes with PBS-T. The optimal dilution, 1000 : 1, of peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgM or IgG antibodies (Zymed, San Francisco, CA) was added, followed by 1 hr of incubation at 37° and eight additional washes with PBS-T.

IgG subclasses. Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b (Zymed) or IgG3 (Rockland, Gilbertsville, PA) antibodies were used to titrate the specific subclasses. All conjugates were used at 1 : 1000 dilution in PBS-M and incubated for 1 hr at 37°, followed by eight washes with PBS-T. Ortho-phenylenediamine (0.5 mg/ml; Sigma) in 0.1 M citrate buffer, pH 5.6, containing 30% H₂O₂ was used as the enzyme substrate. The reaction was stopped with 1.25 M H₂SO₄ and the optical densities were read at 490 nm using an automatic ELISA plate reader (Dynex Technologies MR11, Chantilly, VA) with BIOLINX 2.22 software. Antibody titres are given as -log₂ dilution × 40. Positive titres were defined as 3 SD above the mean values of the negative controls. In the graphs, symbols indicate the mean ± SD of three to six mice per group.

Flow cytometry

The ability of antiporin, antiOmpC and antiOmpF sera to bind to live bacteria was evaluated using the wild-type *S. typhi* strains, ATCC 9993 and *S. typhimurium* ATCC 14028, and commensal *E. coli*. We used a previously reported method with minor modifications.⁴⁴ Bacteria were washed with PBS and diluted to a final concentration of 10⁹ cells/ml. Preimmune or hyperimmune sera, 1 : 100, were incubated with 10⁸ bacteria for 60 min at 37°. Cells were washed and incubated with goat fluorescein-labelled anti-mouse IgG, 1 : 200 (Immunotech, Marseille, France) for 30 min at 37°. Analyses were performed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using the CELL QUEST Software (version 3.2.1). Acquisition gates were set on forward-scatter and

side-scatter modes to exclude lysed cells and cell aggregates. Ten thousand cells were analysed for each sample.

Complement-mediated bactericidal assay

Serum bactericidal activity was determined using a previously described method with minor modifications.⁴⁵ Briefly, antiporin, antiOmpC and antiOmpF sera were heat-inactivated for 30 min at 56°. Sterile U-bottomed 96-well polystyrene microtitre plates (Corning®) were used for the bactericidal assay. Duplicates of complement-inactivated sera were prediluted 1 : 40 in PBS, and two-fold serial dilutions were added to wells containing 200 ± 50 colony-forming units (CFU) of the wild-type *S. typhi* or the isogenic VALE39 strain, and a complement source (guinea-pig serum) 9% (v/v). Controls included samples containing: (1) a known positive sample; (2) bacteria and complement-inactivated antiporin sera; (3) bacteria and guinea-pig serum; and (4) bacteria, antiporin sera, and heat-inactivated guinea-pig serum. Plates were incubated for 18 hr at 37° and the CFU were counted. Bactericidal titres are given as $-\log_2$ dilution $\times 40$, and represent the lowest dilution at which $\geq 50\%$ killing of bacteria was observed.

Statistical analysis

The Mann-Whitney *U*-test was used to compare antibody titres between the experimental groups.

Results

Porins induce a strong lifelong antibody response

In a previous study, we reported that 10 μg of native porins confer strong active protection in mice.³³ Thus, to evaluate the time span of the antibody response induced by porins, BALB/c mice were immunized with 10 μg of native porins on day 0 and an identical booster dose was given on day 15. These antigens were diluted in saline as a vehicle, and injected i.p. in the absence of added adjuvant. During the primary antibody responses, an early 16-fold elevation of IgM and IgG antibody titres was observed on day 4 (Fig. 1a). After boosting (i.e. during the secondary response), the highest antibody titres were seen around day 30, with a 1024-fold increase in IgG titre over control values (Fig. 1a). On day 90, IgG titres had decreased to half their maximal values, and continued to decrease slowly to reach levels similar to those at day 4. The antibody titres remained 16 times the control levels until the last mouse died of apparently natural causes 476 days after the first immunization (Fig. 1a). Although the IgM antibody titres were lower, a long-lasting IgM response was observed, with a four-fold elevation at day 476 (Fig. 1a).

To examine whether the route of administration influenced the antibody response, BALB/c mice were immunized intravenously (i.v.) and subcutaneously (s.c.). The kinetics of the antibody titres were similar in these groups to those in animals immunized i.p. (data not shown). These results indicate that porins induce a lifelong antibody memory response in the absence of exogenous adjuvants, regardless of the route of immunization.

Porins induce a lifelong bactericidal antibody memory response

Because efficient B-cell memory depends on the concerted capacity of antibodies to achieve bactericidal or neutralizing activity, we used a complement-dependent bactericidal assay to examine whether antiporin antibodies could mediate *S. typhi* bacteriolysis. Although a weak bactericidal response was observed on day 4 after immunization, by day 10, the bactericidal titres had rapidly increased to 128 times the control level (Fig. 1b). During the secondary response, bactericidal activity showed a 512-fold increase on day 25, and remained at this level until day 476, even though the ELISA antibody titres markedly decreased after day 150 (Fig. 1b). The bactericidal activity of these sera was directed against porins, because sera from immunized mice failed to induce bacteriolysis of a porin-deficient *S. typhi* strain (OmpC⁻ OmpF⁻) (Fig. 1b).

The capacity of antibodies to recognize bacteria is essential for the induction of a bacteriolytic response. We next compared the antibody-binding capacities of sera (i.e. the ability of antibodies to recognize live bacteria). Antiporin IgG antibodies obtained from mice during the primary (day 4), secondary (day 25), and long-lasting (day 300) responses were analysed by flow cytometry. We found low reactivity at day 4, but specific binding on days 25 and 300 (Fig. 2a). In contrast, we observed no binding to *S. typhi* (OmpC⁻ OmpF⁻; data not shown). Taken together, these data indicate that the low memory antiporin antibody titres measured by ELISA were as efficient in killing and binding to bacteria as the high antiporin antibody titres observed during the secondary response.

Anti-*S. typhi* porin antibodies are species-specific

Because porins are conserved proteins among different salmonella strains,⁴⁶ we next asked whether long-lasting antiporin antibodies could cross-react with other related bacterial porins. Using flow cytometry, we evaluated the capacity of these antibodies to recognize surface-exposed epitopes on the bacteria. Day 300 antiporin IgG sera were incubated with *S. typhimurium* and commensal *E. coli*. Antiporin IgG antibodies did not bind to *S. typhimurium*, but exhibited a low cross-reactivity with *E. coli* (Fig. 2d). These results agree with previous findings that

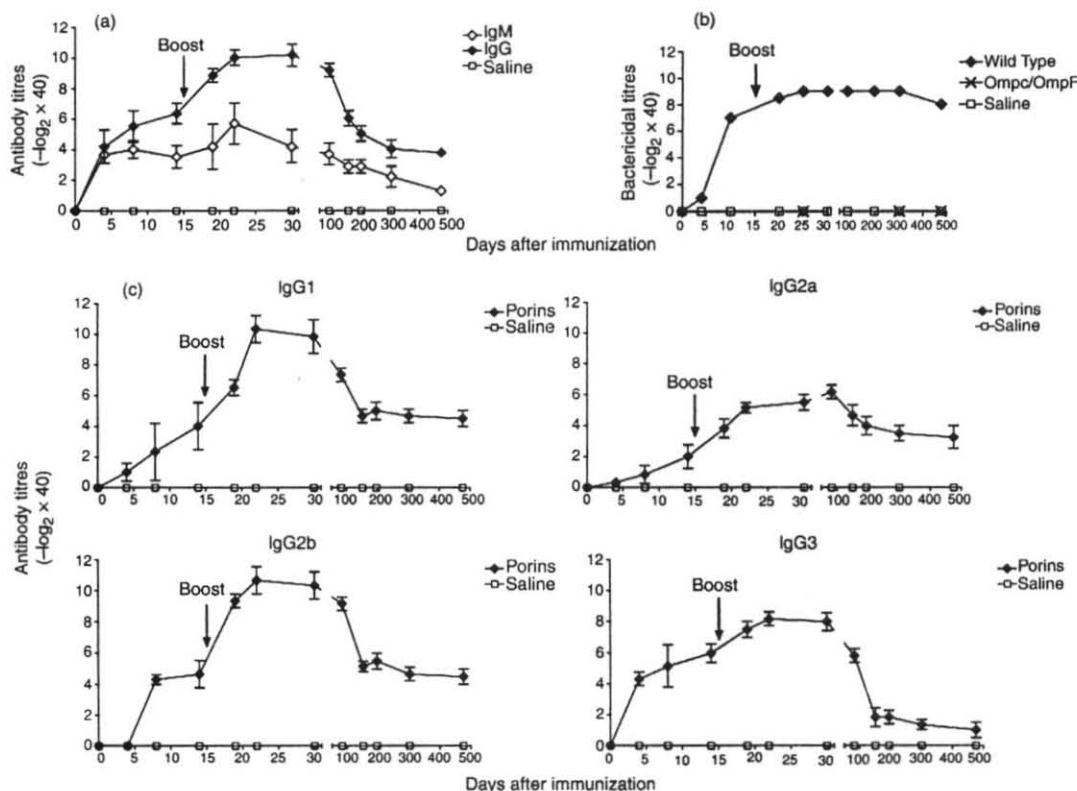


Figure 1. The lifelong bactericidal antibody memory response induced by porins. BALB/c mice were immunized i.p. with 10 µg of porins at day 0 and 15 (marked with an arrow). (a) ELISA antibody titres. Antiporin IgM (◇), antiporin IgG (◆), and saline immunized controls (□). (b) Bactericidal antibody response. Sera from experimental groups were pooled and the bactericidal effect was analysed against wild-type *S. typhi* (◆) and *S. typhi* (OmpC⁻ OmpF⁻) (×); saline immunized controls (□). (c) The antiporin IgG subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 (◆); saline immunized controls (□). The antibody response was evaluated in each mouse for 476 days after immunization until the last mouse died. Results are expressed as the mean ± SD, with three mice per group (a and c). Data correspond to one representative result from five independent experiments.

monoclonal antibodies directed to surface-exposed epitopes of porins are not cross-reactive, whereas antiporin antibodies toward buried regions present high cross-reactivity.⁴⁷ Overall, our data suggest that memory antiporin antibodies recognized specific *S. typhi* B-cell epitopes not shared between different bacterial strains.

Porin-specific antibodies are composed of all IgG subclasses

To characterize the porin-specific IgG response, we identified the IgG subclass composition in the antiporin sera. As shown in Fig. 1(c), the IgG3 response was rapid at day 4, followed by the IgG subclasses: IgG2b, IgG1 and IgG2a at days 8–14. We observed different IgG subclass antibody titres (IgG2b, IgG1, IgG3 and IgG2a) during the secondary response (Fig. 1c). During the long-lasting antibody response, the IgG subclass titre profile included IgG2b, IgG1, IgG2a and weak IgG3 (Fig. 1c). Because IgG1 is a poor complement-activating subclass,⁴⁸ these results

suggest that IgG2b and IgG2a are the main contributors to the long-lasting bactericidal memory response. Moreover, the presence of all IgG subclasses shows the strong immunogenicity of porins and suggests that additional protective biological activities are mediated by the non-bactericidal IgG subclasses.

LPS traces in the porin preparations are unlikely to account fully for the induction of lifelong bactericidal antibody memory responses

Porins form tight complexes with LPS.⁴⁹ We estimated that the LPS content in the porin preparations, determined by the LAL assay, was 0.02% (wt/wt), equivalent to 0.2 ng of LPS/µg of protein. We examined if such a low level of LPS contamination might play a role in the long-lasting bactericidal antibody memory response through three parallel approaches, which produced the following results.

First, antiporin sera from BALB/c mice (Fig. 1) were analysed by ELISA to detect anti-LPS antibody titres.

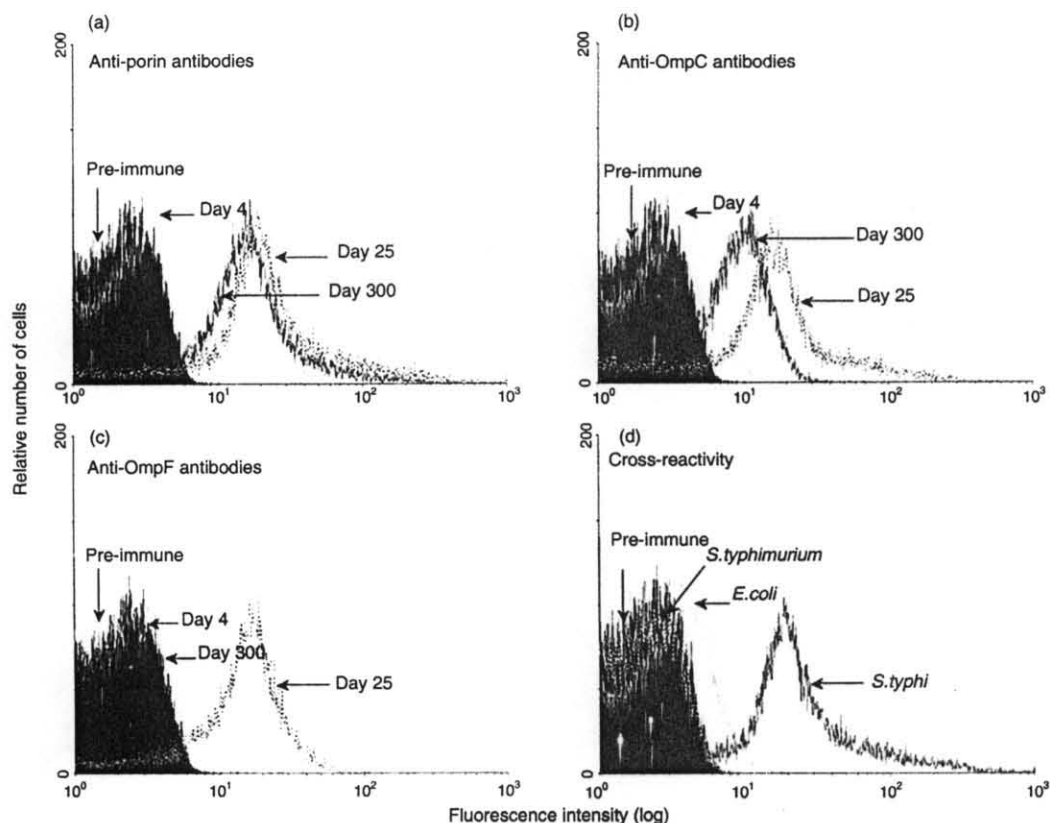


Figure 2. Binding of anti-porin, antiOmpC and antiOmpF IgG antibodies to *S. typhi* by flow cytometry. (a–c) The histograms show the results of specific IgG-binding to wild-type *S. typhi*: (a) anti-porin sera, (b) antiOmpC sera and (c) antiOmpF sera. In all cases, data represent sera from mice immunized on day 4 (open histogram, grey thin line); on day 25 (open histogram, black dotted line); on day 300 (open histogram, black straight line); the controls correspond to the preimmune sera (black filled histogram). (d) Species-specific recognition of anti-porin memory antibodies (day 300). The cross-reactivity effect of long-lasting porin sera was evaluated against *S. typhi* (open histogram, black line); *S. typhimurium* (open histogram, dotted line); and *E. coli* (open histogram, grey line).

Anti-LPS IgM antibody titres increased by about four-fold, but this response was no longer seen after day 40 postimmunization (Fig. 3a), and background anti-LPS IgG titres were detected only after day 19 (Fig. 3a). However, these anti-LPS antibodies were unable to lyse *S. typhi* (OmpC⁻ OmpF⁻) (Fig. 1b and data not shown), indicating that these antibodies do not play a role in the observed bactericidal activity. Second, because C3H/HeJ mice possess a missense mutation in the *tlr4* gene and are hyporesponsive to LPS,⁵⁰ they provide a useful model to evaluate whether possible LPS contamination induced the bactericidal memory response. Figure 3(b) shows that C3H/HeJ mice produced a rapid anti-porin IgG antibody response at day 4, which peaked on day 22 with a 256-fold increase, and which remained elevated 32-fold above control levels throughout the lifetime. These antibodies also exhibited bactericidal activity, with a 128-fold increase at day 22, which remained unchanged until day 390, even though ELISA titres decreased over time (Fig. 3c). In addition, IgG1, IgG2a and IgG2b anti-porin subclasses were observed during this long-term memory

bactericidal response in C3H/HeJ mice. Notably, we found IgG2a and IgG2b until the last mice died on day 390 postimmunization, supporting the role of both subclasses in the long-lasting bactericidal activity (Fig. 3d). In contrast to BALB/c mice, in C3H/HeJ mice, anti-LPS IgM and IgG antibody titres were barely detected (1 to 2 ± 1 log titres) on day 12 after porin immunization (data not shown).

Third, we studied the adjuvant effect induced by 0.2 ng of *S. typhi* LPS/ μ g of protein using the model antigen OVA. Groups of six BALB/c mice were immunized i.p. on day 0 with 10 μ g OVA, 10 μ g OVA + 2 ng LPS, 10 μ g OVA + 5 μ g LPS, or saline. Mice were boosted on day 15 using the same antigen composition and dose. Specific antibody titres in sera from immunized animals were measured by ELISA. The Mann-Whitney *U*-test was used to compare the groups. OVA induced only 2 ± 1 log specific IgG1 antibody titres on day 12 after immunization, and the antibody titres increased 4 ± 2 -fold on day 5 after boosting (day 20). Antibody titres did not increase significantly in animals immunized with 10 μ g

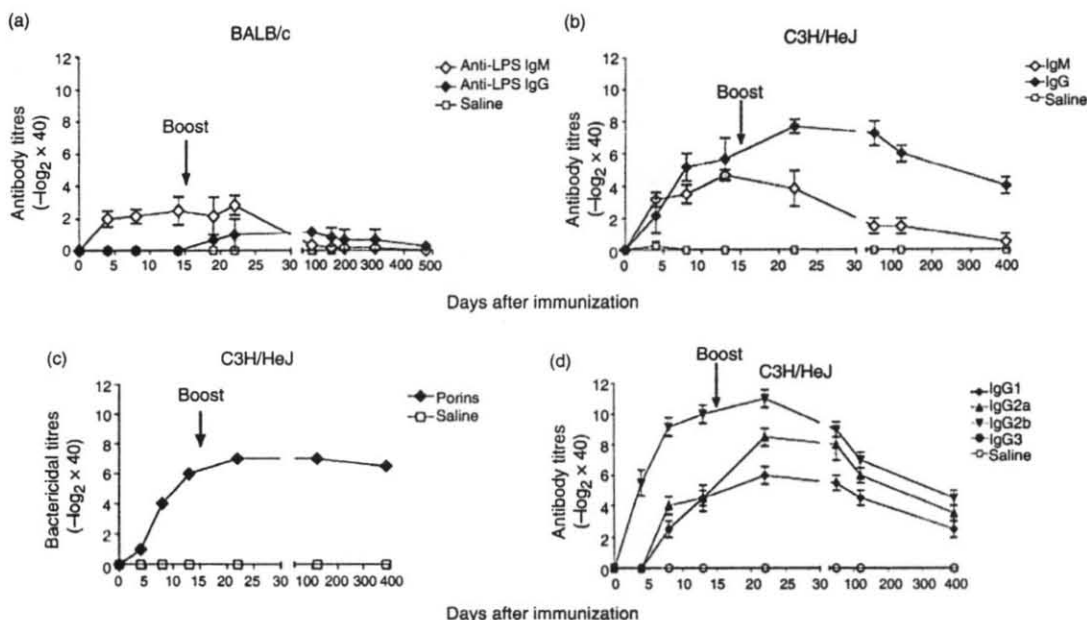


Figure 3. LPS traces in porin preparations are unlikely to account fully for the induction of lifelong bactericidal antibody memory responses. All mice were immunized i.p. with 10 μ g porins at days 0 and 15 (marked with an arrow). (a) Anti-LPS IgM (\diamond) and anti-LPS IgG (\blacklozenge) antibody titres in BALB/c mice. (b) Antiporin IgM (\diamond) and antiporin IgG (\blacklozenge) antibody titres in LPS hyporesponsive C3H/HeJ mice. (c) Bactericidal antibody memory responses in C3H/HeJ mice against wild-type *S. typhi* (\blacklozenge); saline-immunized controls (\square). (d) Antiporin IgG subclasses in C3H/HeJ mice: IgG1 (\blacklozenge), IgG2a (\blacktriangle), IgG2b (\blacktriangledown) and IgG3 (\bullet); saline-immunized controls (\square). Results are expressed as the mean \pm SD with six mice per group. Data correspond to one representative result from three independent experiments.

OVA + 2 ng LPS ($P > 0.05$) and antibody titres of other IgG antibody subclasses such as IgG2a, IgG2b (1 ± 1 log titre) and IgG3 were not detected (data not shown). In contrast, the antibody titre increased 64-fold in mice immunized with 10 μ g OVA + 5 μ g LPS on day 12 and 512-fold on day 20. The IgG2b antibody titres increased 16-fold on day 20, whereas IgG2a and IgG3 antibody titres were not detected (data not shown). The experiment was repeated to confirm these results. Because OVA is a poor immunogenic protein compared with porins, the OVA dose-response experiment was performed to determine the optimal OVA dose to be used for control experiments. Groups of five BALB/c mice were immunized i.p. with 10 μ g, 100 μ g, 1 mg, 2 mg or 5 mg OVA. Blood from immunized animals was collected for 30 days and OVA-specific antibody titres were measured in sera using ELISA. The optimal dose-response was observed in mice immunized with 2 mg OVA (data not shown). Two milligrams of OVA was then used for immunizations. OVA induced a 64-fold increase in IgG1 antibody titre on days 12 and 20 compared with that induced by 10 μ g OVA. Two milligrams of OVA also induced a 16-fold increase in IgG2b antibody titre but only on day 20, whereas no IgG2a or IgG3 antibody titres were detected. A similar pattern of antibody titres and curve kinetics was observed when mice were immunized with 2 mg

OVA + 2 ng LPS. In contrast, mice immunized with 2 mg OVA + 5 μ g LPS exhibited a 128-fold increase in specific IgG2b titres and 8-fold to 32-fold increases in OVA-specific IgG2a antibody titres, showing the adjuvant effect of 5 μ g LPS (data not shown). These results indicate that traces of LPS present in porin preparations do not significantly contribute to the high specific antibody titres or to the high IgG subclass titres induced by porins.

Taken together, these results suggest that the small amount of LPS contamination detected in the porin preparations is unlikely to account fully for the induction of the long-lasting antibody memory response.

OmpC is the main porin responsible for the antibody-mediated memory bactericidal response

Porins purified from wild type *S. typhi* consist of a mixture of OmpC and OmpF porins.^{20,33} To evaluate the contribution of independently isolated OmpC or OmpF porins in the antibody memory response, we purified each protein from either OmpF or OmpC salmonella-deficient strains (data not shown). During the primary and long-lasting responses, OmpC induced a stronger production of IgG antibody than OmpF (Fig. 4a). The initial IgG3 production observed with porin immunization (Fig. 1c) was induced by the OmpC porin, which

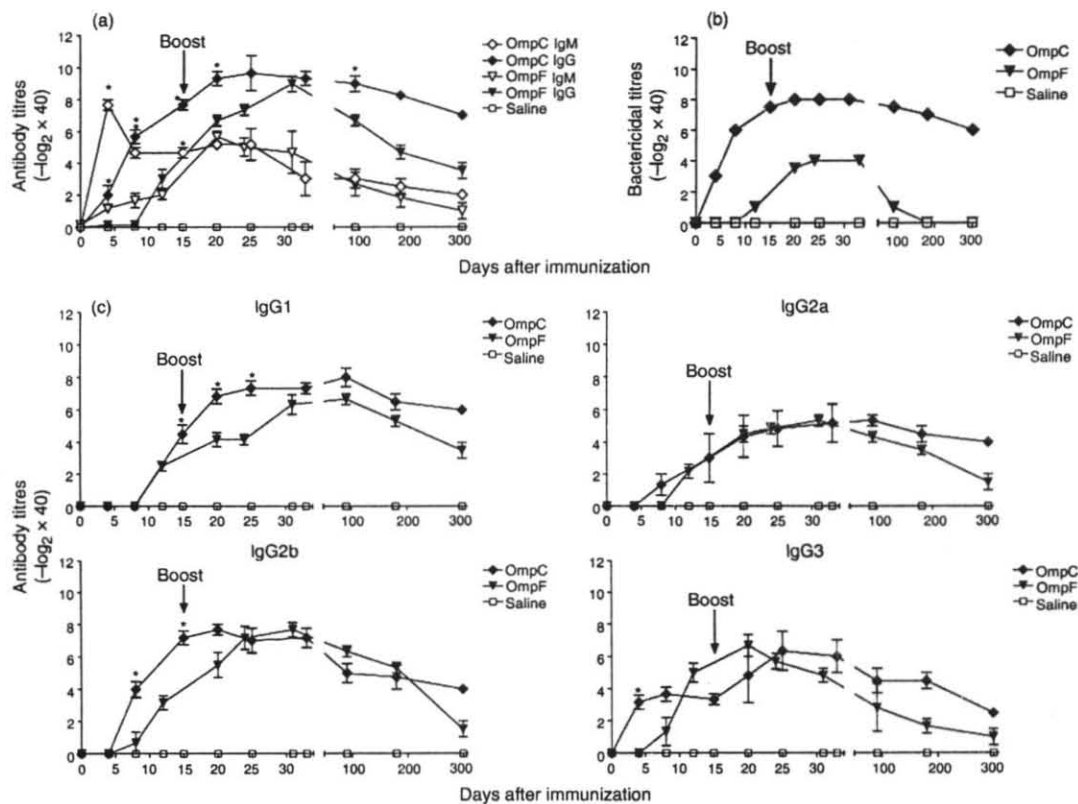


Figure 4. The long-lasting binding-bactericidal antibody memory response induced by OmpC and OmpF porins. BALB/c mice were immunized i.p. with 10 μ g OmpC or OmpF porins at days 0 and 15 (marked with an arrow). (a) Serum IgM (\diamond antiOmpC, ∇ antiOmpF); IgG (\blacklozenge antiOmpC, \blacktriangledown antiOmpF); and saline-immunized controls (\square). (b) The long-lasting bactericidal antibody memory response against wild-type *S. typhi* was evaluated using a pool of either antiOmpC (\blacklozenge) or antiOmpF (\blacktriangledown), and control sera (\square). (c) AntiOmpC (\blacklozenge) or antiOmpF (\blacktriangledown) IgG subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3. In all cases, the antibody response was evaluated for 300 days postimmunization (latest point tested). Results are expressed as the mean \pm SD, with three mice per group. The Mann-Whitney *U*-test was used to compare groups; $P < 0.05$ is indicated by asterisks. The experiment was repeated three times with similar results.

presented an eight-fold elevation on day 4 (Fig. 4c). After boosting, whereas antiOmpC IgG titres reached maximum titres with a 1024-fold increase above control levels on day 25, the greatest response of antiOmpF titres occurred on day 31, with a 512-fold elevation (Fig. 4a). During this secondary response, both porins showed a similar pattern of production of IgG subclasses: IgG2b, IgG1, IgG3 and IgG2a (Fig. 4c). Notably, whereas antiOmpC IgG titres remained unchanged until day 300 (the last point tested) with a 256-fold increase, antiOmpF IgG titres decreased to a level that was 16-fold above the control level at day 300 (Fig. 4a). The long-lasting antiOmpC IgG subclass profile changed to a gradual decrease of IgG3 compared with the other subclasses: IgG1, IgG2b, IgG2a and weak IgG3 at day 300 (Fig. 4c).

The presence of high bactericidal antibody titres confirmed that OmpC had the strongest immunogenicity. AntiOmpC and antiOmpF antibodies reached their maximum bactericidal titres during the secondary response (Fig. 4b). AntiOmpC bactericidal titres exhib-

ited a 256-fold increase, whereas antiOmpF bactericidal titres were elevated only 16-fold above control levels (Fig. 4b). Moreover, the strong bactericidal response induced by OmpC was sustained at a level 64 times the control level at day 300, the last point tested (Fig. 4b). In contrast, the bactericidal activity induced by OmpF decreased to a level only twice that of the control level at day 90, and was no longer detected at day 180, even though the ELISA showed antiOmpF IgG antibody titres (Figs 4a-c). Consistent with these data, antiOmpC antibodies still bound *S. typhi* at all the time points studied. The antiOmpC IgG primary response showed a weak recognition on day 4, which increased to its highest capacity at day 25 and was still present at day 300 (Fig. 2b). This pattern contrasted with the observation that antiOmpF IgG antibodies bound *S. typhi* only at day 25, and then decreased below the detection limit after day 180 (Fig. 2c). These results suggest that OmpC induced a persistent bactericidal-binding antibody memory response, whereas the long-lasting antiOmpF anti-

bodies recognized B-cell epitopes not exposed on the bacterial surface.

Discussion

Maintaining the production of bactericidal and neutralizing antibodies over time is essential to achieve an efficient protective B-cell memory response. Long-term protective antibodies are apparent after vaccination with live-attenuated micro-organisms (e.g. smallpox, poliovirus, or rubella) or by the application of several booster doses of subunit antigens (e.g. tetanus toxoid or hepatitis B surface antigen).^{7,51} Because micro-organisms contain a mosaic of antigens, the elicited memory immune response is complex. Thus, characterizing antigens that can sustain the production of long-term protective antibodies would help identify and explain the mechanisms responsible for the induction of immunological memory.

We found that immunization with *S. typhi* porins in mice induced a sustained lifelong bactericidal/binding antibody response, even in the absence of added adjuvants (Figs 1 and 2). Notably, these antiporin antibodies did not cross-react with *S. typhimurium* (Fig. 2d). The long-lasting antiporin IgG antibodies showed a sustained bactericidal/binding activity to *S. typhi*, even though the long-lasting antibody titres measured by ELISA were lower (Figs 1 and 2). This notable immunogenicity of porins to sustain bactericidal antibody memory response could be explained by either of the following non-exclusive mechanisms. First, because salmonella porins are good immunogens^{20,21,27,33,36-42} and porins from other pathogens have been identified as TLR2 agonists.²⁹⁻³¹ Thus, during the initial immune response, it is possible that salmonella porins might be simultaneously recognized by B-cell receptors and innate receptors, such as TLRs, thereby inducing the differentiation of naive B cells into effector antibody-secreting plasma cells. We speculate that this strong initial activation would sustain antibody production by inducing the efficient generation of memory B cells or long-lived plasma cells. Second, porins are highly hydrophobic proteins,²³ a property that could favour the formation of antigenic deposits in germinal centres, which might maintain the persisting antiporin antibody titres for life.

The long-term antibody titres measured by ELISA decreased over time (Fig. 1a). For example, at day 180, antibody titres decreased 32-fold compared with the maximum peak (secondary response). However, the bactericidal-binding capacities of these antibodies did not decrease with time (Figs 1b and 2a) and showed no cross-reactivity (Fig. 2d). These results might indicate that a process of selection or affinity maturation of species-specific antiporin antibodies occurs during the antibody-mediated memory bactericidal response. The mechanisms involved in the induction of porin-specific memory anti-

body response are currently under investigation. Because IgM has a short half-life, the presence of low long-lasting antiporin IgM antibody titres (Fig. 1a) was an intriguing result. Consistent with our observation, a previous study described the production of anti-*Borrelia* IgM by B1b lymphocytes (IgM^{high} IgD^{low} Mac1⁺ CD5⁻) for 230 days after infection.⁵² It is possible that the long-term antiporin IgM antibody levels are produced by B1b cells.

The predominantly IgG subclasses in the antiporin memory response were IgG2b, IgG1 and IgG2a (Fig. 1c). Because IgG1 has been described as a poor complement-fixing subclass,⁴⁸ it appears that the IgG2b and IgG2a are the main subclasses responsible for the long-lasting bactericidal effect. In addition, we found all IgG subclasses in the secondary response (Fig. 1c), despite the Th2-prone predisposition in BALB/c mice. This supports the role of porins as strong immunogens with the ability to generate a microenvironment that efficiently favours the immunoglobulin switch independent of genetic background. In addition, the presence of the poor complement-fixing IgG1 and IgG3 subclasses suggests that additional protective biological activities are mediated by these non-bactericidal IgG subclasses.

Because our antigen preparations contained traces of LPS, we addressed the possible adjuvant role of LPS in the generation of the long-lasting bactericidal antibody memory response by immunizing the LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice with our porin preparation. We found strong antiporin bactericidal titres for life (Fig. 3b), indicating that the long-lasting bactericidal memory response induced by porins did not depend on the TLR4 adjuvant signal mediated by LPS.⁵⁰ This observation is supported by the low anti-LPS antibody titres in BALB/c mice (Fig. 3a) unable to kill the porin-deficient salmonella strain (Fig. 1b); this rules out the possibility that the bactericidal activity mediated by antiporin antibodies was the result of the presence of natural or induced anti-LPS antibodies. In addition, control experiments using OVA + 2 ng LPS (equivalent to the calculated trace amount of LPS present in porins) for immunization had no adjuvant effect on OVA-specific IgG1 antibody titres or on the induction of other IgG subclasses. In contrast, immunization with OVA + 5 µg LPS induced a strong adjuvant effect, which was reflected in the increase in OVA-specific IgG1 antibody titres and in the induction of OVA-specific IgG2a and IgG2b antibody titres. Taken together, these results indicate that LPS was unlikely to account fully for the bactericidal antibody memory response induced by porins.

Because porins are composed of OmpC and OmpF, we investigated whether the OmpC or the OmpF porin is required for induction of the long-lasting antibody memory response. Although antiOmpC and antiOmpF IgG subclasses showed similar kinetics, mostly during the secondary response (Fig. 4a), we found high antiOmpC bacte-

ricidal titres after 300 days (the last point tested), whereas antiOmpF bactericidal titres increased after boosting and were not detected by day 180 (Fig. 4b). These results suggest a differential contribution of antiOmpC or antiOmpF antibodies to the bactericidal memory response: OmpC induces a persistent bactericidal response and OmpF generates only bactericidal antibodies after boosting, suggesting that the long-lasting antiOmpF antibodies recognize mainly epitopes not exposed on the bacterial surface. These results support the predominant role of OmpC in inducing the memory B-cell bactericidal immune response.

Porins, especially OmpC, are highly conserved proteins among different salmonella strains.⁴⁶ Despite the high homology of porins, there have been reports of specific regions of the *S. typhimurium* OmpC porin that correspond to external loops.⁴⁷ Additionally, we have previously reported that strain-specific epitopes on the *S. typhi* OmpC porin, which correspond to external loops 6 (L6) and 7 (L7) expressed at the bacterial surface, are available for non-cross-reactive antibody-binding recognition.^{44,53} The observed lack of cross-reactivity to *S. typhimurium* in our current study indicates a strong bactericidal/binding specificity of the long-lasting antiporin sera (Figs 1 and 2d). Thus, it seems likely that antiporin IgG antibodies are directed against species-specific B-cell epitopes in the OmpC porin, such as L6 and L7.

In conclusion, our study showed the capacity of *S. typhi* porins to induce a sustained, lifelong and specific bactericidal antibody response, independent of a possible TLR4-adjuvant signal delivered by traces of LPS present in our porin preparation. These unique antigenic characteristics are not found in most antigens, particularly in bacterial subunit vaccines. Our data support the use of porins as a suitable model to study the induction of immunological memory and to improve the development of subunit vaccines with the ability to confer long-lasting immunity.

Acknowledgements

This work was funded by the Fondo para el Fomento de la Investigación (FOFOI) from the Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), grants numbers FP 0038/311, 0038/994, 2001/377 and 2002/072, and by grants from the Mexican Council for Science and Technology (Conacyt), numbers 33137-M and 45261-M awarded to Constantino López-Macías. Edmundo Calva and José Luis Puente were supported by grants from the Conacyt (46115-N) and Dgapa-UNAM (IN223603). Ismael Secundino was supported by a fellowship from Conacyt, UNAM-DGEP and IMSS.

We are grateful to Dr José Moreno-Rodríguez, Dr Vianney Ortiz-Navarrete, Dr César González-Bonilla and Dr Laura Bonifaz-Alfonzo for their critical reviews of the manuscript. We acknowledge the valuable support for

care of the mice provided by Mr Ricardo Vargas Orozco and Daniel Sánchez Almaraz, DVM, from the animal facilities of the Experimental Medicine Department, Faculty of Medicine, UNAM. We also thank Patricia Rojo Aguilar, MSc, for technical assistance with the flow cytometry, and Dr Alejandra Vázquez for her valuable help in the construction of the VALE39 mutant.

References

- 1 Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**:333–67.
- 2 Tarlinton DM, Smith KG. Dissecting affinity maturation. A model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol Today* 2000; **21**:436–41.
- 3 Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 2004; **16**:323–33.
- 4 Vieira P, Rajewsky K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 1988; **18**:313–16.
- 5 Ochsenbein AF, Pinschewer D, Siervo S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:13263–8.
- 6 Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:367–86.
- 7 Zinkernagel RM. On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**:515–46.
- 8 Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 1998; **8**:363–72.
- 9 Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997; **388**:133–4.
- 10 Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002; **298**:2199–202.
- 11 Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 1980; **53**:29–59.
- 12 Askonas BA, Williamson AR, Wright BE. Selection of a single antibody-forming cell clone and its propagation in syngeneic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; **67**:1398–403.
- 13 Gray D, Skarvall H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 1988; **336**:70–3.
- 14 Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J, Kumate J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d.Vi. *Infect Immun* 1988; **56**:2953–9.
- 15 Robbins JB, Schneerson R. Future vaccine development at NICHHD. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1038**:49–59.
- 16 Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE, Dougan G. Igh-6(−/−) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect Immun* 2000; **68**:46–53.
- 17 Ugrinovic S, Menager N, Goh N, Mastroeni P. Characterization and development of T-cell immune responses in B-cell-deficient

- Igh-6^(-/-) mice with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2003; **71**:6808–19.
- 18 Mittrucker HW, Raupach B, Kohler A, Kaufmann SH. Cutting edge. Role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* 2000; **164**:1648–52.
 - 19 Singh SP, Williams YU, Benjamin WH, Klebba PE, Boyd D. Immunoprotection by monoclonal antibodies to the porins and lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Microbial Pathogenesis* 1996; **21**:249–63.
 - 20 Salazar-Gonzalez RM, Maldonado-Bernal C, Ramirez-Cruz NE *et al.* Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar Typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett* 2004; **93**:115–22.
 - 21 Singh M, Ganguly NK, Kumar L, Vohra H. Protective efficacy and immunogenicity of Vi-porin conjugate against *Salmonella typhi*. *Microbiol Immunol* 1999; **43**:535–42.
 - 22 Everest P, Wain J, Roberts M, Rook G, Dougan G. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol* 2001; **9**:316–20.
 - 23 Nikaïdo H. Outer membrane. In: Neidhard, FC, Ingraham, JL, Curtiss, R III *et al.*, eds. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Washington D.C.: ASM Press, 1996:29–47.
 - 24 Calderon I, Lobos SR, Rojas HA, Palomino C, Rodriguez LH, Mora GC. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect Immun* 1986; **52**:209–12.
 - 25 Ortiz V, Isibasi A, Garcia-Ortigoza E, Kumate J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol* 1989; **27**:1640–5.
 - 26 Verdugo-Rodriguez A, Lopez-Vidal Y, Puente JL, Ruiz-Placios GM, Calva E. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; **12**:248–54.
 - 27 Galdiero M, De Martino L, Marcatili A, Nuzzo I, Vitiello M, Cipollaro DL. Th1 and Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella typhimurium* porins. *Immunology* 1998; **94**:5–13.
 - 28 Wetzler LM, Ho Y, Reiser H. Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* 1996; **183**:1151–9.
 - 29 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**:1533–7.
 - 30 Galdiero M, Finamore E, Rossano F, Gambuzza M, Catania MR, Teti G, Midiri A, Mancuso G. *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* 2004; **72**:1204–9.
 - 31 Ray A, Biswas T. Porin of *Shigella dysenteriae* enhances Toll-like receptors 2 and 6 of mouse peritoneal B-2 cells and induces the expression of immunoglobulin M, immunoglobulin G2a and immunoglobulin A. *Immunology* 2005; **114**:94–100.
 - 32 Kuusi N, Nurminen M, Saxen H, Valtonen M, Makela PH. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. *Infect Immun* 1979; **25**:857–62.
 - 33 Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Pelayo R, Gonzalez CR, Garcia JA, Kumate J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 1992; **10**:811–13.
 - 34 Isibasi A, Paniagua J, Rojo MP *et al.* Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann NY Acad Sci* 1994; **730**:350–2.
 - 35 Muthukkumar S, Muthukkaruppan VR. Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect Immun* 1993; **61**:3017–25.
 - 36 Singh M, Vohra H, Kumar L, Ganguly NK. Induction of systemic and mucosal immune response in mice immunized with porins of *Salmonella typhi*. *J Med Microbiol* 1999; **48**:79–88.
 - 37 Sharma P, Ganguly NK, Sharma BK, Sharma S, Rawal IJ, Saxena SN, Sehgal R. Humoral and cell mediated immune responses to porins of *Salmonella typhi*. *Jpn J Exp Med* 1989; **59**:73–7.
 - 38 Gonzalez CR, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Garcia JA, Blanco F, Kumate J. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol Immunol* 1993; **37**:793–9.
 - 39 Blanco F, Isibasi A, Gonzalez CR, Ortiz V, Paniagua J, Arreguin C, Kumate J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J Infect Dis* 1993; **25**:73–80.
 - 40 Gonzalez CR, Mejia MV, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Ramirez G, Isibasi A. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. *Arch Med Res* 1995; **26**:S99–S103.
 - 41 Diaz-Quinonez A, Martin-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Two *Salmonella* OmpC K(b)-restricted epitopes for CD8⁺ T-cell recognition. *Infect Immun* 2004; **72**:3059–62.
 - 42 Nandakumar KS, Muthukkaruppan VR. Influence of immunopotentiators on the antiporin immunoglobulin G subclass: distribution and protective immunity against murine salmonellosis. *Scand J Immunol* 1999; **50**:188–94.
 - 43 Martinez-Flores I, Cano R, Bustamante VH, Calva E, Puente JL. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999; **181**:556–62.
 - 44 Paniagua-Solis J, Martin-Orozco N, Ortiz-Navarrete V, Ramirez G, Gonzalez-Bonilla C, Isibasi A. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Immun Infect Dis* 1995; **5**:244–9.
 - 45 Senn BM, Lopez-Macias C, Kalinke U, Lamarre A, Isibasi A, Zinkernagel RM, Hengartner H. Combinatorial immunoglobulin light chain variability creates sufficient B cell diversity to mount protective antibody responses against pathogen infections. *Eur J Immunol* 2003; **33**:950–61.
 - 46 Puente JL, Juarez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. The *Salmonella* ompC gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 1995; **156**:1–9.
 - 47 Singh SP, Upshaw Y, Abdullah T, Singh SR, Klebba PE. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *J Bacteriol* 1992; **174**:1965–73.
 - 48 Germann T, Bongartz M, Dlugonska H *et al.* Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol* 1995; **25**:823–9.

- 49 Ried G, Hindennach I, Henning U. Role of lipopolysaccharide in assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA, OmpC, and OmpF. *J Bacteriol* 1990; **172**:6048–53.
- 50 Poltorak A, He X, Smirnova I *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**:2085–8.
- 51 West DJ, Calandra GB. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. *Vaccine* 1996; **14**:1019–27.
- 52 Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 2004; **21**:379–90.
- 53 Secundino I, Paniagua-Solis J, Isibasi A, Sanchez J. A cloning vector for efficient generation of cholera toxin B gene fusions for epitope screening. *Mol Biotechnol* 1999; **11**:101–4.

A Cloning Vector for Efficient Generation of Cholera Toxin B Gene Fusions for Epitope Screening

Ismael Secundino,¹ Jorge Paniagua-Solis,¹
Armando Isibasi,¹ and Joaquin Sanchez^{*2}

Abstract

Gene fusion proteins with epitopes attached to the amino end of cholera toxin B subunit (CTB) are useful to raise immunological responses. We describe a cloning vector, designated pCTBTet, carrying a tetracycline resistance gene (Tet^R) between the leader peptide and mature CTB. Removal of Tet^R to insert oligonucleotides encoding fusion epitopes allowed for screening of tetracycline-sensitive clones. Restoration of the correct CTB reading phase was subsequently used to choose gene fusion candidate colonies. The use of pCTBTet permitted the rapid construction of 8 fusion proteins carrying 9–24 aa from *Salmonella typhi* OmpC and 6 hybrids with 7–31 aa from *Escherichia coli* colonization factor CFAI.

Index Entries: Gene inactivation cloning vector; fusion proteins; cholera toxin B-subunit; epitope mapping; gene fusion banks.

Introduction

The use of the B subunit of cholera toxin (CTB) as an adjuvant has been of particular interest to raise humoral and mucosal immune responses (1,2). More recently, CTB has also been proposed as an agent to induce immune tolerance (3,4). For immunological studies, CTB has been either coadministered or chemically coupled to the antigen of interest. Genetic attachment of epitopes to CTB has also been developed. Epitopes from an *Escherichia coli* enterotoxin (5), from the capsid VP4 rotavirus protein (6), from *Streptococcus mutans* glucosyltransferase (7), from an *Entamoeba histolytica* surface protein (8), and from *Salmonella typhi* OmpC (9) have been fused to the amino end of the protein. Genetic addition of epitopes has also been carried at the carboxy end of CTB (10), whereas epitopes from the GP120 protein of HIV and from the pre-S2 hepatitis B virus protein have been introduced at internal positions in CTB (11). The diversity of epitopes

fused to the amino end of CTB, including those here reported, suggests that this site in the protein may be particularly permissive. For fusions to the amino end of CTB, all vectors to date utilize closely located restriction sites at in-frame junctions between the leader peptide and mature CTB (5,7,12). To avoid inefficiency in double digests for directional insertion of fusion epitopes to CTB, we decided to split neighboring restriction sites apart through insertion of an unrelated DNA fragment. To be more useful, the fragment should be long enough to facilitate visual follow-up of double digestions in agarose gels. Furthermore, if the inserted DNA interrupted the CTB gene, successful epitope insertion could be monitored by restitution of the correct reading phase. To comply with these requirements, but to improve the screening methodology further, we decided to insert an expressible tetracycline resistance gene (Tet^R) into pJS752-3 (10). This offered the extra possibility of substituting the Tet^R fragment by oligonucleotides encoding fusion epitopes. This

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: ¹Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. México, D.F. ²CISEI, Instituto Nacional de Salud Pública. Present address: Facultad de Medicina, UAEM. Av. Universidad No. 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210 Mexico. E-mail: joaquin.sanchez@microbio.gu.se

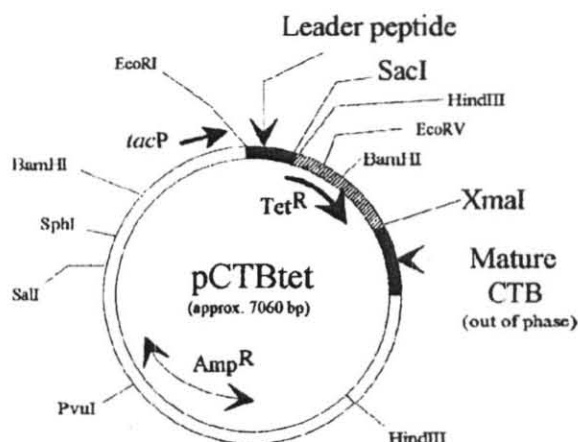


Fig. 1. Plasmid vector pCTBtet. An approximate restriction map shows relevant single restriction sites. The positions and transcription orientation for promoter *tacP* and *Tet^R* are shown with heavy arrows. The interrupted CTB gene is represented by filled-in squares. Note: Plasmid pCTBtet is available to all interested. Requests (to J. S.) are to be accompanied by a noncommercial exploitation statement.

step was very useful for simple screening recombinants for tetracycline-sensitive phenotypes.

2. Materials and Methods

A 1.2-kbp tetracycline (*tet*) gene from plasmid pBR322 (13) was amplified using *Taq* Polymerase (Promega, Madison, WI) with the synthetic (NBI) upstream primer: 5'GCGCGGAGCTCATGTTTGACAGC3', introducing a *SacI* site and downstream primer: 5' GCGAGGTGCCGCCCCGGCTTCC 3' introducing an *XmaI* site. The amplified *tet* gene included its natural promoter (13). The amplification product was digested with *SacI* and *XmaI* (New England Biolabs) and joined to *SacI/XmaI* cut pJS752-3 using T4 DNA ligase (Promega). Ligation mixtures were electroporated (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, cell-porator) into *E. coli* strain DH10B (Gibco-BRL). Colonies were selected on LB agar containing ampicillin and tetracycline. The resulting plasmid pCTBtet (Fig. 1) was doubly digested (*SacI/XmaI*) to be ligated to pairs of synthetic complementary oligonucleotides bearing compatible single-stranded ends. Inserted oligonucleotides, designed to contain optimized

E. coli codons, encoded postulated OmpC-exposed loop sequences (to be published) as follows: loop1 (L1) SDDKGSDDG; L2 GNQTEG SNDSWT; L3 PEFGGDTYGADNFMQQRGN; L4 KNQSVSGENTNGRSLLNQNGDGYG; L5 RTADQNNTANARLYGNGDRA; L6 GTSNGS NPSTSYGFAN; L7DISNGYGYGASYGDQDI; L8 LLDKNDFTRDGINTDD or the enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor antigen (CFAI) (14) related sequences AIDLLQP, AVIDLLQP, AVIDLLQVIDLLQP, APVEKNITVTASVDPTIDLLQ, and V E K N I T V T A S V D P T I D L L Q A D G N A L P S A V K L. Concentrations of CTB were estimated by GM1-ELISA using ganglioside GM1-coated plates, specific anti-CTB monoclonal antibodies and an anti-mouse IgG peroxidase conjugate (15).

3. Results and Discussion

Recombinant ampicillin-resistant tetracycline-sensitive colonies were assayed by GM1-ELISA (15). Approximately 80% of all tetracycline-sensitive clones expressed CTB, and of these, 80–90% had a recombinant plasmid with the correct insert. GM1-ELISA CTB levels in culture supernatants of positive clones ranged between 55 and 280 ng/mL/culture absorbance unit (600 nm) (not shown). GM1-ELISA-positive clones were subjected to plasmid DNA isolation (Wizard miniprep, Promega). The sizes of *BamHI/XmaI* restriction fragments demonstrated the presence of inserted oligonucleotides (Fig. 2). Equivalent results were obtained for CFAI constructs (not shown). Western blot analysis, with polyclonal anti-CTB goat antiserum (Gibco-BRL), of concentrated cell sonicates has shown CTB-reactive protein bands with sizes fully compatible with those anticipated for the eight OmpC hybrids (not shown). Similarly, reactivity with anti-CFAI and anti-CTB monoclonal antibodies (MAbs) in GM1-ELISA and Western blots of the three longest CFAI-related fusions (Sanchez, J., et al., to be published) proved the correct constructs have been obtained.

As detailed, oligonucleotide insertions into pCTBtet simultaneously led to a tetracycline-sensitive CTB-positive phenotype, making screening

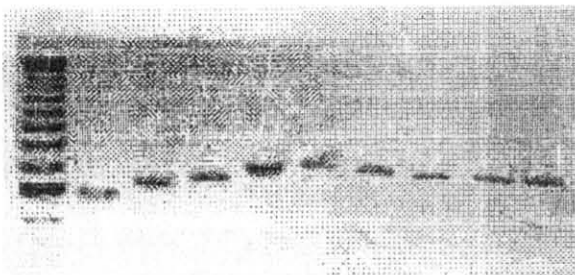


Fig. 2. *Bam*HI/*Xma*I restriction patterns for pCTBtet derivatives on a 3% agarose gel. From left to right, 50-bp ladder (Gibco-BRL), control plasmid pJS752-3, pCTBtet derivatives with OmpC loops L1-L8. The bands shown contain the fused oligonucleotides, and migration varies accordingly.

simple, fast, and economical. Confirmation by restriction analysis was necessary only at the last cloning stage. At the end of the procedure, there was a very high probability of having selected the correct recombinant. For OmpC constructs, initial detection of the fused epitopes was not necessary. Therefore, pCTBtet was especially useful because antibodies against the joined peptide loops were not previously available.

4. Conclusion

Use of vector pCTBtet allowed for the fast and convenient construction of 14 fusion proteins with insertions of 7-31 amino acids residues. The peptides attached were either highly charged, predominantly hydrophobic, or uncharged hydrophilic. When considering these sequences together with others previously joined (5-10), it emerges that the amino end of CTB might be particularly suitable for indiscriminate gene fusions. To obtain CTB-derived fusion protein banks, plasmid pCTBtet could prove very valuable owing to ease of screening and practical independence of epitope-specific antibodies. Potential applications include B- and T-cell epitope mapping and creation of large sets of viral and bacterial recombinant antigens for mucosal administration.

Acknowledgments

This work was supported by grant SPE-VACC-HN-01(SIDA-SAREC, Sweden) to J. S. J. P.-S.,

A. I., and J. S. gratefully acknowledge stipends by Sistema Nacional de Investigadores (SNI, Mexico). We thank APSA and Mallinckrodt-Baker (Mexico) for an undergraduate student stipend. J. P.-S. is currently a member of Laboratorios Silanes, Mexico.

References

1. Elson, C. O. (1997) In defense of mucosal surfaces. Regulation and manipulation of the mucosal immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **412**, 373-385.
2. Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (1992) Cholera as a model for research on mucosal immunity and development of oral vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 387-391.
3. Sun, J.-B., Rask, C., Olsson, T., Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (1996) Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7196-7201.
4. Bergerot, Y., Ploix, C., Petersen, J., Moulin, V., Rask, C., Fabien, N., et al. (1997) A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4610-4614.
5. Sanchez, J., Svennerholm, A. M., and Holmgren, J. (1988) Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B subunit. *FEBS Lett.* **241**, 110-114.
6. González, R., Sanchez, J., Holmgren, J., López, S., and Arias, C. (1993) Immunological characterization of a rotavirus-neutralizing epitope fused to the cholera toxin B subunit. *Gene* **133**, 227-232.
7. Laloï, P., Munro, C. L. Jones, K. R., and Macrina, F. L. (1996) Immunological characteristics of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase B sucrose-binding site peptide-cholera toxin B-subunit chimeric protein. *Infect. Immun.* **64**, 28-36.
8. Ryan, E. T., Butters, J. R., Zhang, T., Baker, M. A., Stanley, S. L., Jr., and Calderwood, S. B. (1997) Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody responses in mice. *Infect. Immun.* **65**, 3118-3125.
9. Paniagua-Solis, J., Sanchez, J., Ortiz, V., Gonzalez, C., and Isibasi, A. (1996) Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* OmpC peptide loops. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 31-36.
10. Sanchez, J., Johansson, S., Lowenadler, B., Svennerholm, A. M., and Holmgren, J. (1990) Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res. Microbiol.* **141**, 971-979.

11. Bäckström, M., Holmgren, J., Schödel, F., and Lebens, M. (1995) Characterization of an internal permissive site in the cholera toxin B-subunit and insertion of epitopes from human immunodeficiency virus-1, hepatitis B virus and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gene* **165**, 163-171.
12. L'hoir, C., Renard, A., and Martial, J. A. (1990) Expression in *Escherichia coli* of two mutated genes encoding the cholera toxin B subunit. *Gene* **89**, 47-52.
13. Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneke, H. L., and Boyer, H. W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
14. Cassels, F. J., Jarboe, D. L., Reid, R. H., Lees, A., and Deal, C. D. (1997) Linear epitopes of colonization factor antigen I and peptide vaccine approach to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 66-70.
15. Svennerholm, A. M. and Holmgren, J. (1978) Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunoabsorbent assay (GM1-ELISA). *Curr. Microbiol.* **1**, 19-23.