



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**La respuesta de anticuerpos de memoria inducida por las  
porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi  
posee capacidad opsonofagocítica**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**



**MÉXICO, D.F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	Prof. Rodolfo Pastelin Palacios
<b>Vocal</b>	Prof. Saturnino León Chapa
<b>Secretario</b>	Prof. Constantino III Roberto López Macías
<b>1º. Suplente</b>	Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez
<b>2º. Suplente</b>	Prof. Armando Isibasi Araujo

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

Dr. Constantino III Roberto López Macías

**ASESOR**

M. en C. Cristina del Carmen Gil Cruz

**SUPERVISOR TÉCNICO**

Mario Adán Moreno Eutimio.

**SUSTENTANTE**

## DEDICATORIA

A mi familia.

Al Dr. Isibasi y al Dr. Constantino.

A la Dr. Lourdes Arriaga.

A todos mis compañeros de la UIMIQ.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Isibasi por darme la oportunidad de participar en este trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.

Al Dr. Constantino López por su confianza, apoyo e instrucción en mi formación como investigador.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano por toda su confianza y enseñanzas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Pastelin por su apoyo en el análisis y crítica profunda del presente trabajo.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ingeborg Becker, al Sr. Ricardo Vargas Orozco y el MVZ Daniel Sánchez Almaraz de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las invaluable facilidades prestadas y colaboración para del trabajo con animales.

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto: SALUD 2004-CO1-132 y por el Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social proyecto: 2006/1A)/I/022 otorgados al Dr. Constantino López Macías.

## INDICE

1.	ANTECEDENTES .....	- 10 -
1.1.	Respuesta inmune humoral.....	- 14 -
1.1.1.	Anticuerpos .....	- 14 -
1.1.2.	Generación del repertorio de anticuerpos .....	- 16 -
1.1.3.	Recombinación somática .....	- 17 -
1.1.4.	Activación de los linfocitos B.....	- 19 -
1.1.5.	Cooperación de los linfocitos T CD4+ para su activación .....	- 20 -
1.2.	Respuesta de anticuerpos de larga duración .....	- 23 -
1.3.	Funciones efectoras de los anticuerpos .....	- 24 -
1.3.1.	Neutralización del antígeno .....	- 25 -
1.3.2.	Activación del complemento .....	- 25 -
1.3.3.	Opsonización .....	- 26 -
1.3.4.	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos .....	- 27 -
1.4.	Modelo de Estudio.....	- 28 -
1.4.1.	Porinas.....	- 28 -
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	- 33 -
3.	HIPOTESIS .....	- 33 -
4.	OBJETIVO GENERAL .....	- 34 -
5.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	- 34 -
6.	MATERIALES .....	- 35 -
6.1.	Cepas Bacterianas: .....	- 35 -
6.2.	Línea celular:.....	- 35 -
6.3.	Animales de laboratorio:.....	- 35 -
6.4.	Sueros de ratón: .....	- 36 -
7.	METODOS .....	- 36 -

7.1.	Obtención de porinas de <i>S. typhi</i> , a través del método de Nikaido modificado.....	- 36 -
7.2.	Esquema de Inmunización .....	- 37 -
7.3.	Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA) .....	- 38 -
7.4.	Ensayos opsonofagocíticos .....	- 39 -
7.5.	Extracción del DNA plasmídico de la cepa bacteriana <i>Salmonella typhimurium-GFP</i> .....	- 40 -
7.6.	Cuantificación e integridad del DNA plasmídico .....	- 41 -
7.7.	Preparación de células competentes de <i>S. typhi</i> .....	- 42 -
7.8.	Transformación de <i>S. typhi</i> competente.....	- 42 -
8.	RESULTADOS.....	- 44 -
8.1.	Purificación de las porinas de <i>S. typhi</i> .....	- 44 -
8.2.	Obtención de <i>S. typhi</i> - GFP.....	- 45 -
8.3.	Caracterización de línea celular J774 A.1. ....	- 46 -
8.4.	Las porinas de <i>S. typhi</i> inducen una respuesta de anticuerpos de larga duración en ratones mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos. ....	- 47 -
8.5.	Los anticuerpos de memoria inducidos por las porinas de <i>S. typhi</i> son opsonizantes y median la fagocitosis de la bacteria. ....	- 50 -
8.6.	Los anticuerpos de memoria inducidos por las porinas de <i>S. typhi</i> no presentan capacidad opsonizante en contra de <i>Salmonella typhimurium</i> ..	- 53 -
9.	DISCUSIÓN .....	- 55 -
10.	CONCLUSIONES.....	- 57 -
11.	ANEXO.....	- 58 -
12.	BIBLIOGRAFIA .....	- 59 -

## RESUMEN

El objetivo de la vacunación es generar protección de larga duración contra un patógeno específico. Para lograr esto es necesario que la vacuna genere de manera eficiente un estado de memoria inmunológica, es decir inmunidad. La generación de altos títulos de anticuerpos protectores correlaciona con el estado inmune de larga duración de la vacunas actualmente en uso. Sin embargo, aunque muchos antígenos vacunales son capaces de generar altos títulos de anticuerpos de larga duración muchas veces estos no son capaces de conferir protección, por lo tanto es de suma importancia estudiar los mecanismos involucrados en la generación de anticuerpos de memoria y sus características. Para estudiar los mecanismos efectores de los anticuerpos de memoria contamos como antígeno modelo con las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) que son proteínas de la membrana externa de la bacteria y que actualmente se estudian como candidato a vacuna contra la fiebre tifoidea. La inmunización con porinas, sin adyuvantes, induce de manera vitalicia altos títulos anticuerpos bactericidas. No obstante, se desconoce si estos anticuerpos poseen capacidad opsonizante que permita la fagocitosis y eliminación más eficiente de la bacteria. Aquí se reporta que los anticuerpos anti-porinas de memoria poseen capacidad opsonizante y median un incremento en la fagocitosis de la bacteria. Se inmunizaron ratones libres de patógenos específicos (SPF) con 10 µg de porinas de *S. typhi* y se obtuvieron muestras de suero en los días 4, 8, 12, 20, 30, 90, 150, 210 y 288 posteriores a la inmunización. Se midieron los títulos de anticuerpos específicos de clase IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Se evaluó la capacidad opsonizante de los anticuerpos a través de la fagocitosis de los complejos inmunes formados por estos anticuerpos y una *S. typhi* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en macrófagos de ratón de la línea J774 A.1, por medio de citometría de flujo. Este estudio contribuye así al conocimiento sobre los mecanismos efectores de los anticuerpos de memoria y su papel en la protección inducida por las porinas de *S. typhi*.



## 1. ANTECEDENTES

Durante su evolución, el hombre ha desarrollado mecanismos de defensa con gran capacidad para combatir las infecciones causadas por virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos. Al conjunto de estos mecanismos se conoce como sistema inmune, el sistema inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo<sup>1</sup>.

Se denomina inmune al individuo que habiendo padecido una infección, mantiene luego una defensa permanente contra los patógenos que la provocaron, la inmunidad generada por las vacunas es similar a la originada por las enfermedades<sup>2,3</sup>.

La inmunología se creó a partir de los estudios de protección a enfermedades infecciosas<sup>4,5</sup>. Las vacunas durante la infancia protegen en contra de agentes infecciosos, pero los detalles de los mecanismos responsables de protección aun no son esclarecidos<sup>6</sup>.

Cuando un individuo se expone a un antígeno el sistema inmune monta una respuesta primaria, cuando posteriormente se expone al mismo antígeno se produce una respuesta secundaria caracterizada por la rápida aparición de títulos de anticuerpos y anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno<sup>7</sup>. Esta capacidad de respuesta de manera acelerada e intensas a un segundo estímulo inmunitario se le ha llamado memoria inmunológica. Por lo que entendemos como memoria la idea que el sistema inmune pueda "recordar" encuentros previos con un antígeno o vacuna. Que no necesariamente correlaciona con la protección contra patógenos<sup>2</sup>.

Quizá la consecuencia más importante de una respuesta inmunitaria adaptativa es el establecimiento de un estado de memoria inmunológica<sup>8</sup>.

La base de la memoria inmunológica ha sido difícil de explorar experimentalmente, a pesar de que el fenómeno fue descrito por vez primera por los chinos en el siglo X y se ha utilizado de forma habitual en programas de vacunación durante más de 200 años, no está totalmente establecido si la memoria refleja una población de células de larga vida o depende de la persistencia de niveles de antígeno indetectables que reestiman de forma continua linfocitos específicos de antígenos<sup>9</sup>. Algunos investigadores apoyan que la memoria es mantenida por células de larga vida inducidas por la exposición original, que persisten en estado de reposo hasta un segundo encuentro con el agente patógeno<sup>10-14</sup>, otros investigadores apoyan que los linfocitos activados por la exposición original al antígeno son reestimulados repetidamente aun en ausencia de reinfección por el agente patógeno, esto puede ocurrir de diversas maneras; una posibilidad es que el agente patógeno persista en pequeñas cantidades suficiente para reestimar las células activadas pero no para extender la infección a otras<sup>15-18</sup>, otra posibilidad es que la reestimulación se produzca mediante la exposición a otros antígenos con reacción cruzada o la reestimulación podría ser mediada también por citocinas producidas durante el curso de respuestas inmunitarias específicas de antígenos<sup>19</sup>.

La clave del éxito de las vacunas es generar una respuesta protectora de larga duración, todas las vacunas que protegen clínicamente en la actualidad son dependientes de una respuesta de anticuerpos neutralizantes<sup>15,20,21</sup>. No existen en la actualidad vacunas capaces de proteger exclusivamente a través de células T<sup>3</sup>. La importancia de los mecanismos mediados por anticuerpos es apoyada por la protección conferida por la transferencia feto-materno de anticuerpos y la indiscutible demostración de la inmunidad protectora conferida por la administración pasiva de anticuerpos inducidos por vacunas<sup>9,21</sup>.

La memoria inmunológica es un hito en el sistema inmune, la evolución puede enseñarnos, que brazos efectores de la memoria inmunológica, son biológicamente relevantes contra agentes infecciosos, los anticuerpos parecen ser

un mecanismo protector crítico contra algunos patógenos, por lo que evaluar la inducción de anticuerpos y sus funciones efectora resulta necesario como parámetro de eficacia de una vacuna<sup>22</sup>

Para la eliminación de un patógeno que haya atravesado las barreras epiteliales provocando una infección, lo primero que hace el sistema inmune es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo, para ello el sistema inmune ha desarrollado dos tipos de mecanismos innatos y adaptativos<sup>1</sup>.

La estrategia de la inmunidad innata no consiste en reconocer cada patógeno en particular, si no en reconocer un grupo de patrones moleculares altamente conservados comunes a un grupo o familia entera de patógenos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)<sup>1</sup>. Las células de la inmunidad innata reconocen de manera selectiva estos PAMPs mediante receptores presentes en la superficie de las células efectoras del sistema inmune, a tales receptores se les denominan receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs)<sup>23,24</sup>.

Los PAMPs al ser reconocidos por PRRs, inducen señalizaciones de traducción al interior de la célula dando como consecuencia la activación y el inicio de la respuesta inmune contra patógenos<sup>1,23</sup>.

La inmunidad innata es, por tanto, capaz de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio y durante sus primeras fases con gran eficacia, sin embargo no puede protegernos de todas las infecciones, por lo que los vertebrados han desarrollado una estrategia de reconocimiento que se conoce como inmunidad adaptativa, los responsables principales de la inmunidad adaptativa son un tipo de leucocitos denominados linfocitos T y B <sup>25</sup>, que tienen unos receptores de reconocimiento de patógenos extremadamente específicos, el receptor de células T (TCR) y el receptor de células B (BCR) respectivamente<sup>26</sup>.

Tanto la inmunidad innata como la adaptativa dependen de las actividad de los leucocitos, la inmunidad innata emplea principalmente células polimorfonucleares, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas, en cambio la respuesta adaptativa depende de los linfocitos B y T.<sup>1,24</sup> La integración de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo constituye un sistema de defensa notablemente eficaz gracias al cual, si bien pasamos nuestra existencia continuamente rodeados de microorganismos potencialmente patógenos, experimentamos enfermedades infecciosas con una relativa baja frecuencia<sup>24,27</sup>.

Cuando existe infección en la periferia, grandes cantidades de antígeno son captadas por células presentadoras de antígeno (APC), que viajan desde el lugar de la infección a través de los vasos linfáticos aferentes hasta los ganglios linfáticos. Allí estas células mostrarán el antígeno a los linfocitos a los cuales ayudan a activarse, una vez estos linfocitos activados experimentan un periodo de proliferación y diferenciación a células efectoras que son capaces, en el caso de las células B, de secretar anticuerpos, o en el caso de las células T de destruir células infectadas o activar otras células del sistema inmunitario, además esta activación provoca cambios en la expresión de moléculas de la superficie especializadas en adhesión, provocando que los linfocitos cesan de circular entre la sangre y la linfa para migrar entre las células endoteliales de los vasos del lugar de la infección<sup>8,26</sup>.

Las células del sistema inmunitario innato desempeñan un papel esencial en la iniciación y subsiguiente dirección de la respuesta inmune adaptativa, además, dado que existe un retraso de 4 a 7 días antes de que la respuesta inmunitaria adaptativa primaria sea ejecutada, la respuesta inmunitaria innata desempeña una función crucial para controlar la infección durante ese periodo de tiempo<sup>8</sup>.

La inducción de una respuesta adaptativa confiere inmunidad protectora frente a la reinfección por el mismo patógeno, durante toda la vida, a este fenómeno

característico de la respuesta inmune adaptativa se le conoce como memoria inmunológica y es la característica clave para el éxito de la vacunación<sup>10</sup>.

El mecanismo mediante el cual la mayoría de las vacunas utilizadas actualmente generan protección de larga duración es a través de la inducción y mantenimiento de altos títulos de anticuerpos protectores (anticuerpos de memoria)<sup>20</sup>. A pesar de que muchos antígenos vacunales son capaces de generar y mantener altos títulos de anticuerpos muchas veces estos no son capaces de mediar la protección<sup>28</sup>.

### **1.1. Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral es mediada principalmente por las inmunoglobulinas. Los linfocitos B una vez activados se diferencian a células plasmáticas que son las células productoras de anticuerpos, estas células se producen en la médula ósea donde maduran para luego migrar hacia los órganos linfoides secundarios o periféricos, donde llevan a cabo las etapas de reconocimiento antigénico y activación<sup>29</sup>.

La respuesta inmunitaria humoral produce la destrucción de microorganismos extracelulares y previene la propagación de las infecciones intracelulares<sup>9</sup>.

#### **1.1.1. Anticuerpos**

Las inmunoglobulinas son un grupo amplio de proteínas presentes en el suero y fluidos de todos los mamíferos, pueden encontrarse principalmente en forma soluble conocidas como anticuerpos o anclados a la membrana de los linfocitos B constituyendo el receptor para antígeno de estas células BCR<sup>25,30,31</sup>.

Todas las moléculas de anticuerpos comparten características fisicoquímicas y estructurales muy semejantes. Cada molécula de anticuerpos esta constituida por cuatro cadenas polipeptídicas dos cadenas polipeptídicas que oscilan entre 55 y

77 KDa conocidas como cadenas pesadas y otras dos cadenas polipeptídicas de 25 KD conocidas como cadenas ligeras, que se unen por puentes disulfuro conformando una estructura en forma de Y. Tanto las cadenas pesadas como ligeras tienen una región variable y otra conservada. Ambas cadenas pesadas por un lado y las cadenas ligeras por otro son idénticas. La región variable de los anticuerpos se conoce como fracción de unión al antígeno (Fab) mientras que la región constante se conoce como fracción cristalizable (Fc)<sup>32</sup>.

Se conocen cinco clases o isotipos principales de cadenas pesadas  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\epsilon$  y dos de cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ . Las inmunoglobulinas formadas por cada uno de estos tipos de cadena pesada se conocen como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE respectivamente y pueden contener cualquiera de los isotipos de cadena ligera<sup>8</sup>.

Pequeñas variaciones dentro de las moléculas de los isotipos IgG e IgA permiten diferenciar cuatro subclases de inmunoglobulinas en humanos IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y dos de inmunoglobulinas IgA (IgA1 e IgA2).

Tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas están formadas por una unidad estructural básica de 110 aminoácidos (dominio inmunoglobulina), que se repite cuatro o cinco veces en las cadenas pesadas y dos veces en las cadenas ligeras. Este dominio está constituido por dos láminas  $\beta$ , cada una integrada por tres o cuatro hélices antiparalelas, estabilizada por efecto hidrofóbico y un puente disulfuro intracatenario<sup>33</sup>.

El primer dominio próximo al extremo amino terminal se conoce como dominio o región variable de la inmunoglobulina ( $V_L$  para las cadenas ligeras y  $V_H$  para las pesadas), el resto de los dominios hacia el extremo carboxilo terminal se encuentra conservado y por ellos se denominan dominios constantes ( $C_L$  y  $C_H$  para cadenas ligeras y pesadas respectivamente).

La variabilidad en las regiones V no es uniforme, sino que se concentra en tres segmentos cortos (aproximadamente de 10 aminoácidos) no contiguos de la secuencia denominada regiones de hipervariabilidad llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y estas son CDR1, CDR2 y CDR3. Las secuencias flanqueantes a las regiones de hipervariabilidad se denominan regiones marco (FRs). Cuando las cadenas se pliegan las regiones CDR se aproximan, proyectándose hacia el exterior de la molécula y generando la superficie de interacción con el antígeno conocido como paratopo<sup>33</sup>. Existe una región no globular de 10-60 aminoácidos entre el primer y segundo dominios constante de las cadenas pesadas conocida como región flexible, que confiere flexibilidad a la inmunoglobulina entre estas dos regiones, reduciendo impedimentos estéricos, lo que incrementa la fuerza de la unión antígeno-anticuerpo<sup>33</sup>.

Cuando son secretadas las IgM e IgA pueden polimerizarse, las IgM se encuentran en el plasma en forma de pentámeros principalmente, mientras que en las secreciones de mucosas las IgA se encuentran en forma de dímeros, la formación de polímeros se produce gracias a la asociación de una proteína llamada J que mantiene unida la estructura polimérica mediante puentes disulfuro con los extremos carboxilo terminal de la cadena pesada correspondiente<sup>26</sup>.

### **1.1.2. Generación del repertorio de anticuerpos**

El elevado número de antígenos que pueden ser reconocidos por las células B es un reflejo de la gran diversidad de anticuerpos que pueden producir esas células B<sup>34</sup>.

La suma total de los anticuerpos que puede generar un individuo se conoce como repertorio de anticuerpos se ha estimado que su valor está en torno a la  $10^{16}$  especificidades diferentes y refleja todos los posibles clones de linfocitos B capaces de sintetizar y secretar inmunoglobulinas en respuesta a una estimulación antigénica<sup>29</sup>. Esta gran diversidad en la producción de anticuerpos puede

explicarse si se tiene en cuenta que existe un número muy grande, aunque limitado, de genes con información para la síntesis de las diferentes partes de la molécula de inmunoglobulina, que estos genes se reordenan de forma aleatoria en el momento de su síntesis y que existen procesos de recombinación somática en las células B que afectan selectivamente a estos genes.

### **1.1.3. Recombinación somática**

Para codificar las regiones variables y, a menudo, las constantes de sus cadenas, el genoma contiene múltiples versiones, ligeramente distintas, de los genes correspondientes. Cada precursor de linfocito B podrá elegir para cada una de las cadenas cualquiera de las versiones disponibles que codifican para cada región. Este fenómeno ocurre al azar y es el principal responsable de la gran diversidad de BCRs posibles en los linfocitos B<sup>8</sup>.

Las regiones constantes son codificadas por un número reducido de segmentos génicos a los que se denomina C. Si se trata de cadenas pesadas los segmentos génicos se denominan  $C_H$  y en humanos son nueve, uno por cada isotipo de inmunoglobulina. La cadena ligera  $\kappa$  tiene copia única de su segmento, mientras que la cadena  $\lambda$  tiene al menos seis, aunque funcionalmente no hay diferencias entre ellas. Por analogía con las cadenas pesadas, los genes de las regiones constantes de las cadenas ligeras se denominan  $C_L$ <sup>26</sup>.

Las regiones variables ( $V_H$  en cadenas pesadas y  $V_L$  en cadenas ligeras) no son codificadas por una única familia de segmentos génicos, sino por dos (V y J) o tres (V, D Y J), según se trate de cadenas ligeras o pesadas.

Los segmentos génicos que codifican las regiones variables de las inmunoglobulinas se encuentran muy separados en el genoma, la aproximación de estos genes se produce en la médula ósea durante el proceso de maduración de los linfocitos B y tiene lugar por un proceso de recombinación entre los diferentes segmentos génicos denominado recombinación somática<sup>35,36</sup>.



Cada uno de las cadenas que constituyen las inmunoglobulinas está codificado por un complejo génico diferente. Existen tres o cuatro segmentos en cada una de estos complejos: V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), aunque el segmento D sólo existe en el caso de las cadenas pesadas. Los grupos de segmentos génicos V, D y J codifican los aminoácidos de la región variable y el segmento C codifica los aminoácidos de la porción constante de la inmunoglobulina, aunque ninguno de estos segmentos génicos se expresa como una unidad independiente. Para la síntesis de una unidad proteica que pueda ser expresada como cadena pesada o ligera, es necesario que los segmentos de la región variable se unan físicamente a uno de la región constante<sup>35</sup>.

Durante el proceso de diferenciación de las células B en la médula ósea, los genes V recombinan con el segmento de genes J asociado, dando lugar a una combinación génica tipo VJ. El DNA reordenado de esta manera puede ser entonces transcrito a RNA conteniendo intrones y exones. A continuación este transcrito primario es procesado, se eliminan los intrones y se produce la unión VJ con el segmento C y se forma el RNA mensajero maduro que va a ser traducido a proteína<sup>37</sup>.

La región variable de las cadenas pesadas también es codificada por genes V y J aunque, en este caso, un tercer grupo de genes D confiere algo más de diversidad al sistema. La diversidad adicional conferida por los genes D es debida a que estas regiones son muy variables en secuencia y número, a que varios segmentos D pueden unirse y a que pueden ser leídos en tres fases de lectura diferentes sin que se generen codones de terminación<sup>34,35,37</sup>.

La asociación de cualquiera de las posibles cadenas pesadas que se pueden producir con cualquiera de las cadenas ligeras, constituye el mecanismo básico de generación de diversidad en los linfocitos B. Sólo este mecanismo podría generar más de  $4 \times 10^6$  inmunoglobulinas distintas, un mecanismo adicional que aumenta la variabilidad es la diversidad de unión<sup>26,36</sup>. Este proceso se produce porque la

recombinación somática VDJ o VJ no es un mecanismo de alta precisión, de modo que las uniones entre los exones codificantes no son siempre iguales, aunque se elijan los mismos segmentos<sup>37</sup>.

Durante el proceso de maduración de la célula B es cuando tiene lugar el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas. El reordenamiento debido a la gran importancia de sus consecuencias se encuentra muy finamente regulado, de modo que cada célula B generada presenta en su membrana un único tipo de BCR, consistente en una única clase de cadena pesada asociada a una única clase de cadena ligera. El anticuerpo así resultante tiene dos sitios de unión a antígeno idénticos<sup>29</sup>.

#### **1.1.4. Activación de los linfocitos B**

Los receptores para el antígeno de los linfocitos B son inmunoglobulinas IgM o IgD unidas a la membrana. Asociadas a cada receptor se encuentran dos cadenas, denominadas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , que constituyen el módulo de señalización propiamente dicho del receptor para el antígeno<sup>38</sup>. Aunadas a estas señales, se combinan aquellas generadas por moléculas co-receptoras tales como CR2 (receptor de complemento, CD21), CD19 y CD81. El reconocimiento simultáneo de un antígeno (opsonizado por complemento) por el co-receptor CR2 y por las inmunoglobulinas de superficie de un linfocito B intensifica mucho la magnitud del estímulo<sup>39</sup>.

Los antígenos reconocidos por los anticuerpos pueden ser tan diversos como polisacáridos, lípidos, péptidos, ácidos nucleicos y pequeñas sustancias químicas. Los anticuerpos pueden reconocer epitopes lineales o bien determinantes conformacionales, resultantes del plegamiento de las cadenas polipeptídicas. El reconocimiento antigénico induce la endocitosis del antígeno, y su procesamiento para ser presentado por el linfocito B mediante moléculas MHC II <sup>25</sup>.

Los receptores de linfocitos B que no han tenido contacto con antígenos (células vírgenes), son del isotipo IgM e IgD. Estas células B vírgenes circulan

continuamente por los diversos tejidos linfoides hasta encontrar el antígeno específico de su receptor<sup>31</sup>.

En el momento en que esto sucede, los linfocitos B dejan de migrar, y como resultado de una secuencia de eventos moleculares se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos dentro de los ganglios linfáticos o tejidos linfoides asociados a mucosas. Dependiendo de las características del antígeno, los linfocitos B pueden activarse con o sin ayuda de linfocitos T CD4+ (ayudadores)<sup>38</sup>. Aquellas macromoléculas que contienen antígenos polivalentes, es decir que constan de múltiples epitopos idénticos como es el caso de polisacáridos y glicolípidos de las cápsulas de algunas bacterias (*Haemophilus influenzae*, pneumococo y meningococo), pueden unirse simultáneamente a varios receptores IgM, lo cual lleva al entrecruzamiento de los receptores y a la activación del linfocito B<sup>31,40,41</sup>.

#### **1.1.5. Cooperación de los linfocitos T CD4+ para su activación**

Cuando las características del antígeno no inducen el entrecruzamiento de varias moléculas de inmunoglobulinas, sino que solo comprometen a un receptor IgM, el linfocito B requiere de la ayuda de linfocitos T CD4+ para su activación<sup>42</sup>. En este caso, los antígenos proteicos unidos a un receptor IgM son endocitados, procesados y expuestos de nueva cuenta en la superficie celular por las moléculas MHC II del linfocito B<sup>29</sup>. Este proceso permite iniciar lo que se conoce como “cooperación entre linfocitos T y B”, proceso mediante el cual un linfocito T CD4+ cuyo TCR es específico para ese antígeno, reconoce al antígeno y genera una serie de señales intracelulares que finalmente van activar al linfocito B<sup>42-44</sup>.

Esta interacción molecular entre linfocitos T y B depende de la presencia simultánea de linfocitos B y T con receptores que reconocen determinantes antigénicos de un mismo microorganismo en los mismos órganos linfoides<sup>42</sup>.

Gracias a la migración constante de ambos grupos de linfocitos por el sistema linfoide, esto es posible. Actualmente se piensa que un linfocito T específico contra un antígeno microbiano determinado es activado previamente, y de manera independiente, por células presentadoras de antígeno que capturaron, procesaron y presentaron determinantes antigénicos del microorganismo a ese linfocito T en los ganglios linfáticos<sup>44</sup>. El determinante antigénico del microorganismo reconocido por los receptores de los linfocitos B puede ser totalmente distinto a los que le presente la célula B a los linfocitos T, y sin embargo la ayuda proporcionada por el linfocito T, favorece la producción de anticuerpos dirigidos contra el determinante antigénico inicial<sup>44</sup>. En otras palabras, los anticuerpos que produce el linfocito B activado reconocerán el mismo determinante antigénico que fue reconocido inicialmente por los anticuerpos que constituyen el receptor para el antígeno del linfocito B.

Las señales intracelulares generadas cuando los receptores para el antígeno reconocen a su antígeno no son suficientes para la activación adecuada del linfocito B y se requiere la participación de moléculas co-receptoras tanto de células B como T. Las moléculas co-receptoras expresadas por el linfocito B incluyen B 7.1 (CD80) y B 7.2 (CD86) cuyo ligando en células T es CD28. El linfocito T CD4<sup>+</sup> a su vez expresa la molécula co-estimuladora CD40L cuyo ligando en la célula B es CD40<sup>42</sup>. Esta co-estimulación, o segunda señal, es indispensable para la activación mutua, ya que sin ella los linfocitos entran en un estado de anergia. Adicionalmente, la IL-2 secretada por el linfocito T CD4<sup>+</sup> induce la activación y proliferación del linfocito B, transformándolo en célula plasmática productora de anticuerpos<sup>45,46</sup>.

#### **1.1.6. Hipermutación somática**

Uno de los eventos que ocurren en el linfocito B estimulado, es la activación del gen que codifica para la enzima TdT<sup>47</sup> (desoxinucleotidil transferasa terminal), responsable de generar mayor polimorfismo en la región variable de los

anticuerpos producidos por los linfocitos B, produciendo anticuerpos con distinta afinidad para el antígeno<sup>48</sup>. La maduración de la afinidad permite generar un polimorfismo adicional al generado durante la recombinación genética de los receptores de linfocitos B, incrementando aun mas (hasta  $10^9$ ) el número de posibles diferentes anticuerpos de muy alta afinidad<sup>46</sup>. Aquellos linfocitos B que expresan receptores de mayor afinidad para el determinante antigénico son seleccionados para seguir su desarrollo hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos de mayor afinidad que los receptores originales de membrana de los linfocitos B, mientras que los linfocitos B cuyos receptores tienen menos afinidad por el antígeno, mueren por apoptosis<sup>46</sup>. En general, los anticuerpos que se unen al antígeno durante la fase de reconocimiento antigénico son de menor afinidad y de otro isotipo que los que llevan a cabo la fase efectora de la respuesta humoral<sup>49</sup>.

#### **1.1.7. Cambio de isotipo**

Mediante los cambios de isotipos de los anticuerpos se generan anticuerpos con una misma especificidad antigénica (determinada por su fracción Fab), pero que tienen distintas regiones Fc<sup>50</sup>. El isotipo es determinado por el tipo de citocinas secretadas por los linfocitos T CD4+: IL-4 favorece la producción de IgE<sup>51</sup>, mientras que IL-5 y TGF- $\beta$  inducen IgA<sup>52</sup> e IFN- $\gamma$  favorece la diferenciación hacia las subclases IgG1 e IgG3<sup>53</sup>. Esto es importante, ya que distintos isotipos de anticuerpos llevan a cabo distintas funciones efectoras, a través de los distintos tipos de receptores para Fc expresados por diferentes células linfoides<sup>54</sup>.

Las células plasmáticas pueden salir de los ganglios linfáticos donde sufrieron su estimulación, proliferación y expansión clonal y migrar a distintos sitios del sistema inmune (ganglios o médula ósea) y secretar anticuerpos mientras persista el reto antigénico o bien, transformarse en células de memoria<sup>13</sup>, con capacidad de producir anticuerpos de alta afinidad muy rápidamente, en caso de la reaparición del reto antigénico<sup>11</sup>. Mientras que la respuesta primaria tarda de 7 a 10 días para

llegar a su máxima expresión, la respuesta inmune secundaria generada por linfocitos B de memoria, tarda entre 3 y 4 días<sup>12,13</sup>. Los anticuerpos circulan por la sangre y dependiendo de su isotipo, se asocian preferentemente a distintos tejidos o células efectoras, siendo que IgA se encuentra asociada a mucosas<sup>18</sup>, mientras que IgE se une a receptores FcεRI de alta afinidad en células cebadas y basófilos<sup>55</sup>.

## **1.2. Respuesta de anticuerpos de larga duración**

Después de que los linfocitos B son activados por el reconocimiento del antígeno estos forman un centro germinal y se diferenciarán a células plasmáticas productoras de anticuerpos y a linfocitos B de memoria. Como producto de esta diferenciación se obtendrán células de memoria con la capacidad de producir anticuerpos de diferentes clases dependiendo del microambiente de citocinas<sup>56,57</sup>.

Después que se entra nuevamente en contacto con el antígeno los linfocitos B de memoria generados previamente, proliferan rápidamente y se diferencia a células plasmáticas que secretan anticuerpos, principalmente de clase IgG, de mayor afinidad<sup>10,14</sup>.

En el suero los niveles de anticuerpos pueden mantenerse detectables durante varios años, sin embargo, la vida media de estas proteínas en el suero es de 3 semanas aproximadamente<sup>58</sup>, quedando implícita la necesidad de mantener la producción de nuevos anticuerpos y así mantener la protección mediada por estos.

Se han propuesto cuatro mecanismos para explicar la persistencia de títulos de anticuerpos, estos están basados en la diferenciación de los linfocitos B de memoria a células plasmáticas de vida larga o corta. Entre las teorías más aceptadas están:

a) La existencia de linfocitos B de memoria que sobreviven por largos periodos de tiempo en ausencia del antígeno y cuyo umbral de activación es mucho menor que el de los linfocitos B vírgenes<sup>10</sup>.

b) La existencia de células plasmáticas que sobreviven durante largos periodos de tiempo en ausencia del antígeno<sup>11-13</sup>.

c) Los linfocitos B de memoria son activados policlonalmente o por estimulación no específica produciendo nuevas células plasmáticas<sup>19</sup>.

d) El antígeno persiste acumulado en células dendríticas dentro de los centros germinales manteniendo la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas de vida corta<sup>14,16-18,59</sup>.

Actualmente no existe evidencia suficiente que nos permita determinar cual o cuales de estas hipótesis es la responsable de mantener los títulos de anticuerpos durante largos periodos de tiempo.

A pesar de que algunos estudios han demostrado que la persistencia en los niveles de anticuerpos medidos por ELISA correlaciona con la inmunidad en contra de patógenos, la capacidad neutralizante, opsonizante y bactericida es la que determina la eficiencia de la memoria de los linfocitos B en la protección<sup>10,14,60</sup>.

### **1.3. Funciones efectoras de los anticuerpos**

La función principal de los anticuerpos es unirse de forma específica a un determinado antígeno, debido a que las moléculas antigénicas son mucho más grandes que su región de unión con el anticuerpo este se une a ciertas regiones denominadas epitopos o determinantes antigénicos<sup>61</sup>. Una vez que el anticuerpo se une al antígeno pueden surgir diferentes consecuencias, como la neutralización, activación del complemento, opsonización o citotoxicidad

dependiente de anticuerpos (ADCC), la función efectora de los anticuerpos dependerá de la estructura, la localización anatómica y el isotipo del anticuerpo<sup>13</sup>.

Diversas células del sistema inmune expresan en su membrana receptores específicos de isotipo para las moléculas de inmunoglobulinas que se unen a ellos a través de su extremo carboxilo<sup>62</sup>. La mayoría de los FcR sólo se une a la inmunoglobulina cuando está unida al antígeno, ya que ésta sufre un cambio conformacional en la región Fc que lo permite<sup>50</sup>. Otras veces su afinidad por la inmunoglobulina es tan alta que la célula que los expresa va unida con las inmunoglobulinas que haya a su alrededor en cada momento<sup>55</sup>.

### **1.3.1. Neutralización del antígeno**

Muchos agentes nocivos como las toxinas y los fármacos o agentes infecciosos como los virus, las bacterias y los parásitos, inician la lesión celular o el proceso infectivo al unirse a receptores específicos de la superficie celular, los anticuerpos pueden dificultar estéricamente esta interacción mediante la unión a los determinantes antigénicos del agente, neutralizando por lo tanto el proceso tóxico o infeccioso, esta acción puede estar mediada por anticuerpos de cualquier isotipo<sup>20</sup>.

### **1.3.2. Activación del complemento**

La unión de los anticuerpos a los patógenos dirige la formación complejos antígeno-anticuerpo y permite la activación de la vía clásica del complemento, dando como resultado la formación de la molécula de ataque a la membrana (MAC) <sup>63</sup> que provoca la muerte de la célula blanco, así como la formación de anafilatoxinas y opsoninas<sup>64</sup>.

La vía clásica del complemento, se desencadena cuando una proteína del complemento se une a la región de la IgG o IgM unidas al antígeno, ni la IgG ni la



IgM libres se unen a la primera proteína implicada en la activación del complemento, llamada C1q, de forma que el complemento no se activa por los anticuerpos libres circulantes<sup>65,64</sup>. En el caso de la IgG se necesitan dos moléculas de inmunoglobulina para que se pueda unir C1q, que se forman cuando múltiples moléculas de IgG se unen a antígenos sobre la superficie celular<sup>66</sup>. La interacción de C1q se produce a través del dominio Cy2 de las moléculas de IgG. Los diferentes subtipos de IgG tienen diferentes capacidades para iniciar esta reacción, por ejemplo la IgG3 activa eficazmente el complemento, la IgG1 algo menos, la IgG2 muy poco y la IgG4 no activa con respecto a humanos, en ratones la IgG2a, la IgG2b y la IgG3 activan el complemento, pero no la IgG1<sup>65,67</sup>.

La activación del complemento por la IgM es más eficiente al ser esta pentamérica, la unión con la superficie celular provoca cambio en la conformación del anticuerpo, permitiendo el acceso de la molécula C1q a las regiones Fc, entonces el C1q puede unirse al dominio Cμ3<sup>65</sup>.

### **1.3.3. Opsonización**

Los patógenos que se replican afuera de las células pueden ser eliminados por mecanismos mediados por la interacción de la fracción Fc de los anticuerpos con sus específicos receptores en la superficie de células efectoras<sup>68-70</sup>.

Las células fagocíticas expresan receptores para las porciones Fc de los anticuerpos, cada uno con una afinidad y selectividad diferente para los distintos subtipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, el receptor FcγRI (CD64) exhibe apreciable afinidad por los anticuerpos de clase IgG1 y IgG3, el receptor FcγRII (CD32) presente en células fagocíticas une complejos monoméricos de IgG1 y IgG3, y el receptor FcγRIII-b (CD16) une polímeros de IgG1 y IgG3<sup>50,62</sup>. La mayoría de los FcR sólo se unen a las inmunoglobulinas cuando está unida al antígeno<sup>71,72</sup>. Otras veces su afinidad por la inmunoglobulina es tan alta que la

célula que los expresa va unida con las Inmunoglobulinas que haya a su alrededor en cada momento<sup>55</sup>.

Cuando las moléculas de IgG se unen a una partícula antigénica y la recubren, a este proceso se conoce como opsonización, la IgG unida es reconocida por los receptores FcγR de las células fagocíticas, lo que sirve para aumentar la eficacia de la fagocitosis, los subtipos que mejor se unen a estos receptores son la IgG1 e IgG3 siendo los que mejor favorecen la fagocitosis<sup>68-70</sup>.

La opsonización puede dar lugar algo más que el simple incremento de la unión de partículas a los fagocitos. Los receptores FcγR de alta y baja afinidad también están implicados en la activación metabólica de la fagocitosis, aumentando la eficacia de la posterior degradación intracelular de las partículas ingeridas<sup>73</sup>.

#### **1.3.4. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos**

Los eosinófilos y especialmente las células Natural Killer (NK), son capaces de lisar diferentes tipos de células blanco, pero requiere que este recubierta por IgG específica, denominándose al proceso lítico citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC)<sup>74</sup>. El reconocimiento de los anticuerpos unidos se produce a través del receptor de baja afinidad FcγRIII (CD16)<sup>75</sup>. En el caso de las células NK la IgG tiene dos funciones diferentes. Primero una función de reconocimiento; es decir, aquellas células diana a las que se ha unido la IgG serán lisadas de forma preferente respecto a las que no muestran IgG. Segundo, la ocupación de los FcγRIII sirve para activar a las células NK para que sintetizen y secreten citocinas como factor de necrosis tumoral TNF y el interferón gamma INF-γ<sup>76</sup>.

Los eosinófilos median un tipo especial de ADCC dirigida contra parásitos, en este caso, la IgE sirve como principal isotipo para proporcionar reconocimiento y

activación de células efectoras, por que los eosinófilos expresan receptores para el Fc de los anticuerpos IgE<sup>55,76</sup>.

## **1.4. Modelo de Estudio**

### **1.4.1. Porinas**

Las porinas son las proteínas más abundantes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Cada bacteria expresa alrededor de  $10^5$  moléculas en su superficie<sup>77</sup>. El término porina fue utilizado por primera vez para clasificar a las proteínas que formaban poros en la membrana externa de *Escherichia coli*. Su función principal es la de permitir el paso selectivo de moléculas protegiendo a la bacteria de los efectos de los antibióticos, sales biliares, defensinas, etc.<sup>78,79</sup>.

Estas proteínas se ensamblan en trímeros compuestos de subunidades idénticas, cada subunidad consiste en 16  $\beta$ -plegadas antiparalelas unidas por asas con algunas  $\alpha$ -hélices intercaladas. Cada monómero expone ocho asas cortas hacia el espacio periplásmico y 8 asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. La forma cilíndrica que caracteriza a las porinas se forma al cerrarse las estructuras  $\beta$ -plegadas de forma pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja  $\beta$ -16 y el extremo amino de la hoja  $\beta$ -1. (Figura 1).

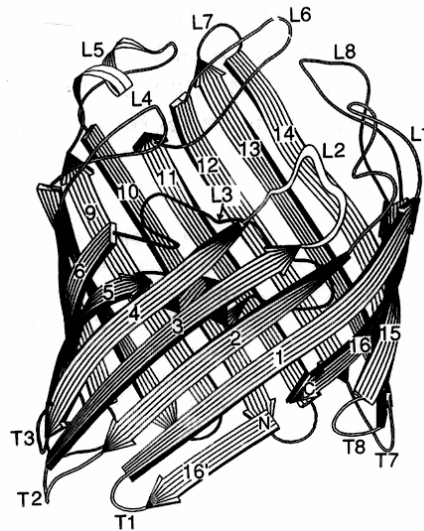


Figura 1. Modelo tridimensional de la porina OmpF de *E. coli*. Estructura definida por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.4 Å. Tomado de Cowan, S. W. y col. L, asas externas; T, asas internas; N, extremo amino terminal; C, extremo carboxilo terminal.

La entrada del poro está restringida por las asas largas que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11-19Å<sup>80,81</sup>. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15-22Å y esta definida por las asas 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<sup>81</sup>.

#### 1.4.1.1. Inmunogenicidad de las porinas de *S. typhi*

*S. typhi* expresa en su superficie a las porinas OmpC y OmpF principalmente<sup>82</sup> con un peso molecular de ~36 y 38 kDa respectivamente, también puede expresar a las porinas, OmpS1 y OmpS2 las cuales se producen en bajas concentraciones<sup>83,84</sup> y la porina OmpA que es termosensible<sup>79</sup>.

En ensayos de protección realizados con extractos completos de las proteínas de membrana externa (OMPs), obtenidas con el método de Schnaitman<sup>85</sup> se observó que el 100% de los ratones inmunizados con 30 µg de OMPs sobrevivían al reto con 1000 DL<sub>50</sub> de *S. typhi*<sup>86</sup> inmunizada con mucina.

Por otra parte, un estudio realizado en pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda demostró que 60% de los anticuerpos de clase IgG y 20% de los anticuerpos de clase IgM reconocían a las OMPs de *S. typhi*<sup>87,88</sup>.

A partir de estos estudios se comenzó a caracterizar la respuesta inmune inducida por las porinas de *S. typhi*. Los primeros ensayos de protección utilizando porinas purificadas en vez de la mezcla de OMPs y se encontró que 90% de los ratones inmunizados con porinas sobrevivieron al reto con 500 DL<sub>50</sub><sup>89</sup>.

Las respuesta inmune celular inducida por las porinas ha sido caracterizada y provoca un incremento en la respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH)<sup>90</sup>. En ensayos de proliferación *in vitro*, utilizando células de bazo de ratones previamente inmunizados, las porinas inducen una proliferación de linfocitos T<sup>91</sup>.

La caracterización de la respuesta inmune celular contra *S. typhi* ha sido estudiada ampliamente en los macrófagos y linfocitos T<sup>92-94</sup>.

Diversos estudios<sup>95-98</sup> sobre la respuesta protectora contra *S. typhi* que inducen las porinas de esta bacteria han puesto en evidencia que la participación de los anticuerpos es importante para conferir protección.

En pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda o fase convaleciente presentan una mayor respuesta de anticuerpos de clase IgG contra las porinas que contra los antígenos O y H de *S. typhi*<sup>95,99</sup>.

En estudios con voluntarios sanos que recibieron la administración subcutánea de 10 µg de porinas (Fase I) se encontró 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<sup>100</sup>.

En ratones la importancia de los anticuerpos contra *Salmonella* ha sido demostrada a través de experimentos de protección pasiva mediante la transferencia de suero hiperinmune a ratones que posteriormente son infectados con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium<sup>96,101,102</sup>.

En ratones deficientes de linfocitos B se demostró que se requiere de la acción combinada de Linfocitos T y B para alcanzar la máxima protección. Otro estudio realizado con anticuerpos monoclonales y sueros de ratones hiperinmunes se vio que la transferencia de los anticuerpos dirigidos contra el LPS, complejos porinas-LPS y en menor proporción contra las porinas confería protección contra *S. typhimurium*<sup>97,103-105</sup>.

La participación de los anticuerpos en los mecanismos de protección inducidos por las porinas se evaluó mediante un experimento de protección pasiva y se observó que el empleo de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas confirió una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub><sup>106</sup>.

Recientemente se demostró que los anticuerpos inducidos por la inmunización de 10 µg de porinas y una reinmunización con la misma dosis inducen anticuerpos bactericidas de clase IgM e IgG que se mantienen durante toda la vida del raton<sup>107</sup>.

Finalmente, se demostró que la inmunización intraperitoneal de porinas inducía también la producción de IgA<sup>95</sup>.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril infecto-contagiosa sistémica causada por la ingestión e invasión intestinal de *S. typhi*, esta enfermedad es frecuente en los países en vías de desarrollo, se estima que anualmente hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea y 600,000 muertes. Por lo que es necesario contar con una vacuna que sea capaz de conferir protección de larga duración.

La vacuna experimental contra la fiebre tifoidea hecha a base de Porinas de *S. typhi* induce títulos de anticuerpos bactericidas en forma vitalicia en ratones, por lo que resulta un buen modelo de estudio para evaluar la función efectora de estos anticuerpos de memoria.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las vacunas eficaces inducen una respuesta de anticuerpos protectores de larga duración (anticuerpo de memoria), a pesar de que muchos antígenos son capaces de generar altos títulos de anticuerpos que se mantienen por tiempos prolongados, muchas veces estos no son capaces de mediar la protección. La vacuna experimental contra la fiebre tifoidea hecha a base de porinas de *S. typhi* induce de manera vitalicia, altos títulos anticuerpos bactericidas. Sin embargo, se desconocen otras propiedades efectoras de estos anticuerpos que participen en el establecimiento del estado protector (inmunidad) como es la capacidad opsonizante de estos anticuerpos que facilitarían la fagocitosis y la eliminación más eficiente de la bacteria.



### 3. HIPOTESIS

Los anticuerpos de memoria inducidos por las porinas de *Salmonella typhi* son opsonizantes y favorecen la fagocitosis de la bacteria.

### 4. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de los anticuerpos de memoria anti-porinas para opsonizar e incrementar la fagocitosis de *S. typhi* en macrófagos de ratón.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar porinas de *S. typhi*.
- Evaluar los títulos de anticuerpos de memoria anti-porinas de clase IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en suero de ratones inmunizados con porinas.
- Generar *Salmonella enterica serovar Typhi* verdes a través de un plásmido pVFPV25 que expresa la proteína verde fluorescente.
- Analizar la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos inducidos por las porinas de *S. typhi*.

## **6. MATERIALES**

### **6.1. Cepas Bacterianas:**

Se utilizó la cepa ATCC 9993 de *Salmonella enterica* serovar Typhi, para la purificación de las porinas por el método de Nikaido<sup>79</sup> y para la transformación con el plásmido pVFPV25<sup>108</sup>.

Se utilizó la cepa de *Salmonella typhimurium* con un plásmido (pFPV25) que expresa la proteína verde fluorescente para evaluar la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos anti-porinas.

### **6.2. Línea celular:**

Se utilizó la línea celular de macrófagos de ratón J774 A.1 para evaluar la capacidad fagocítica de los complejos inmunes formados por los anticuerpos anti-porinas y *S. typhi*-GFP.

### **6.3. Animales de laboratorio:**

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c hembras, de 6-8 semanas de edad, adquiridos en Harlan® de México, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

#### **6.4. Sueros de ratón:**

Los ratones fueron sangrados por cavidad retroorbital colectando la sangre en tubos microtainer con gel separador (Becton Dickinson®). La sangre se centrifugó a 5 000 rpm durante 10 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero fue descomplementado a 56 °C durante 30 minutos y posteriormente almacenado a -70°C hasta el momento de su utilización.

### **7. METODOS**

#### **7.1. Obtención de porinas de *S. typhi*, a través del método de Nikaido modificado.**

Se cultivó *S. typhi* en 10 L. de medio mínimo A ( 70g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5g citrato de sodio, 10g extracto de levadura, 50g glucosa, 0.1% MgSO<sub>4</sub> ) hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 540 nm que corresponde a la fase logarítmica tardía del crecimiento de la bacteria. Se cosechó centrifugando a 7,000 rpm 15 minutos a 4°C. La biomasa bacteriana se pesó y se resuspendió en solución de Tris-Cl 0.05M (pH 7.7) hasta obtener 50 mL de suspensión bacteriana. Se rompió por sonicación (Sonicator Ultra Sonic) durante una hora treinta minutos y la suspensión de bacteria rota se centrifugó a 7,000 rpm 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró y se trató con 25µL de DNAsa 10 000 U/mL y 25µL de RNAsa 10 000 U/mL y 2.77 mL de solución de MgCl<sub>2</sub> 1M por cada 10g de biomasa

húmeda obtenida de la cosecha, por 30 minutos a 37°C 120 rpm para eliminar el DNA y RNA.

Se ultracentrifugó a 45 000 rpm durante 45 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 100 mL de solución de Tris HCl-SDS 2%, se incubó 30 minutos a 32°C 120 rpm y se ultracentrifugó a 40 000 rpm, 30 minutos a 20°C. El botón resultante se resuspendió en 25 mL de solución de Tris HCl-SDS 2%, se incubó nuevamente por 30 minutos a 32°C 120 rpm y se ultracentrifugó a 40,000 rpm 30 minutos 20°C. El botón se resuspendió en 20 mL de amortiguador de Nikaido SDS 1% (Tris 0.05M, NaCl 0.4M, EDTA 0.005M) pH 7.7. Se incubó 2 horas a 37°C 120 rpm y se ultracentrifugó a 40 000 rpm 45 minutos a 20°C. Se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante se purificó en una columna de Sephacryl S-200 (XK100 Pharmacia) a un flujo de 5mL/min con amortiguador de Nikaido SDS 0.5% pH 7.7. Se colectó el pico obtenido en el cromatograma y se dializó con solución de PBS durante 4 días para eliminar el SDS. La concentración de la proteína se determinó por medio de la técnica de Lowry<sup>109</sup>.

## **7.2. Esquema de Inmunización**

Se utilizaron dos grupos de 6 ratones de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, el grupo uno fue inmunizado vía intraperitoneal (i.p) con 10 µg de porinas de *S. typhi*, las porinas fueron disueltas en solución salina isotónica sin adyuvante en un volumen de 500 µL. Al segundo grupo se le administro vía i.p. amortiguador de Nikaido SDS 0.5%, en el cual se encuentran disueltas las porinas de *S. typhi*. Se

obtuvieron muestras de suero en los días 0, 4, 8, 12, 20, 30, 90, 150, 210 y 288 posteriores a la inmunización, las muestras se obtuvieron por la cavidad retroorbital. Los ratones fueron adquiridos en Harlan® México y mantenidos en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina.

### **7.3. Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA)**

El título de anticuerpos específicos se evaluó mediante la técnica de ELISA. Para ello se sensibilizaron placas de 96 pozos para inmunoensayo (Corning®) con 100 µl por pozo de amortiguador de carbonatos (pH 8.6) conteniendo: 1 µg de porinas de *S. typhi*, se incubaron a 37°C durante una hora (incubadora Shel-lab, 2100) y toda la noche a 4°C.

Se lavaron las placas cuatro veces con solución de lavado (solución de PBS al 0.1 % de Tween 20) y se bloquearon con 150 µL de leche descremada al 5.0% (Svelty, Nestle) disuelta en PBS incubando las placas a 37°C por una hora. Posteriormente, se lavaron cuatro veces con la solución de lavado, las placas se refrigeraron hasta su empleo.

Los sueros fueron diluidos 1:40 (5µL en 195 µL) en PBS-Leche al 5%, a partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas en factor de dos transfiriendo 100 µL de la dilución a otro pozo que contenía 100 µl de PBS-Leche hasta completar los 12 pozos de la placa de micro dilución de fondo cónico (Corning). Se transfirieron las diluciones a la placa para inmunoensayo sensibilizada con porinas, se incubaron a 37°C por una hora, se lavaron 4 veces con solución de

lavado y se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de anticuerpo anti-Ig respectivo (anticuerpo de cabra anti IgM, IgG totales, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 de ratón conjugado a peroxidasa de rábano, Zymed, USA) diluido 1:1000 en PBS-Leche, se incubaron por una hora a 37°C, se lavaron cuatro veces con solución de lavado y se revelaron con la solución reveladora (0.5mg/mL de o-fenilendiamina en solución amortiguadora de citratos pH 5.6 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se incubando en ausencia de luz por diez minutos, se detuvo la reacción adicionando 10  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2.5 N. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas (Dynex Technologies, MRX II) a 410 nm. Los títulos de anticuerpos específicos se determinaron como aquella dilución en donde la absorbancia fuera equivalente a 3 veces el fondo (generalmente fue igual a 0.3) y se graficaron en forma logarítmica los títulos contra el día a que corresponda el suero. Se utilizaron como controles positivos sueros de ratón previamente titulados para el antígeno respectivo.

#### **7.4. Ensayos opsonofagocíticos**

Se evaluó la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos anti-porinas mediante la fagocitosis de los complejos inmunes formados por estos anticuerpos y *S. typhi*-proteína verde fluorescente (GFP) en una línea celular de macrófagos (J774 A.1) de ratón, utilizando citometría de flujo<sup>110,111</sup>. Para esto se ajustó la concentración de *S. typhi*-GFP considerando una  $DO^{540nm} = 0.930 \pm 0.005$  como  $1.0 \times 10^9$  UFC/mL. Se lavaron 5 mL de la suspensión bacteriana previamente ajustada a  $1.0 \times 10^9$  UFC/mL con PBS. El botón de bacterias se resuspendió en 2.5 mL, se agregó en un eppendorf 100  $\mu$ L de la suspensión de bacterias y se adiciono 100  $\mu$ L de la dilución 1:50 de los sueros a evaluar. La suspensión bacteriana con el

siero se incubo durante 15 minutos a 37 °C, para opsonizar la bacteria. Transcurrido el tiempo se lavo la suspensión bacteriana en dos ocasiones, para retirar el anticuerpo en exceso.

Se colocaron  $1 \times 10^6$  macrófagos de la línea J774 A.1 por pozo en placas de 6 pozos en medio libre de SFB, se adicionó 50  $\mu$ L de la suspensión *S. typhi*-GFP opsonizada con los sueros a evaluar, que equivale a  $50 \times 10^6$  bacterias. Después de 60 minutos de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> se agregó 15  $\mu$ L de gentamicina (1  $\mu$ g/mL) para inactivar a la bacteria que no fue internalizada. Se realizaron dos lavados con PBS y finalmente se resuspendió en botón final en 500  $\mu$ L para ser leídas en el citómetro de flujo (CyAn™ ADP Dako®). Se capturaron al menos 10 000 eventos en el citómetro de flujo. Se analizaron los datos obtenidos mediante el Software Summit version 4.3.

### **7.5. Extracción del DNA plasmídico de la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium*-GFP**

Para extraer el plásmido pFPV25<sup>108</sup> que tiene la cepa *Salmonella typhimurium*-GFP se utilizo un kit comercial denominado QUIAGEN Plasmid Midi®. Para esto se sembró la bacteria *S. typhimurium*-GFP por estría cruzada en placas de LB-Amp (Bacto peptona/tristona 1%, NaCl 1 %, extracto de levadura 0.5 %, agar 2 %, ampicilina 100  $\mu$ g/mL, pH=7.0.). Se incubo durante 18 horas a 37°C, se transfirió una colonia a un tubo con 5 mL de LB-Amp y se incubo durante 8 horas a 37°C con agitación. Se paso 1 mL del cultivo anterior a un matraz con 100 mL de LB-Amp y se incubo por 16 horas a 37°C en agitación. Se cosechó la bacteria por

centrifugación (6 000 rpm en Sorvall, 15 minutos a 4°C), se eliminó todos los restos del sobrenadante por inversión del tubo y se resuspendió el botón en 10 mL de Buffer P1 (adicionado con RNAasa A, 0.18 µg/mL). Se adicionó 10 mL del Buffer P2 (Solución de Lisis: NaOH/SDS) y se dejó actuar durante 5 minutos, finalmente se adicionó 10 mL de Buffer P3 (Solución neutralizante). Se centrifugó a 6 000 rpm durante 1 hora a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se hizo pasar por una columna QUIAGEN-Tip 100 previamente eluida con 5 mL de Buffer QF. Se lavó la columna en dos ocasiones con 10 mL de Buffer QF y se alícuotó el eluido en tubos Eppendorf. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C y se resuspendió el botón en 100 µL de agua nanopura.

#### **7.6. Cuantificación, verificación de pureza e integridad del DNA plasmídico**

Con el DNA plasmídico obtenido se hace una dilución 1:100 en agua nanopura y se leyó en una celda de cuarzo a una longitud de onda de 260 nm, utilizando como blanco el agua nanopura. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de DNA plasmídico presente en la muestra. Para verificar la integridad del DNA plasmídico se realizó un gel de agarosa al 1% en regulador de tris-boratos-EDTA (TBE) con Bromuro de etidio en una concentración de 0.5 µg/mL, se vertió en un sistema para electroforesis y se dejó polimerizar al menos treinta minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se llenó la cámara con regulador TBE, se colocaron 5 µL de marcadores de peso moleculares en el carril número uno y 1 µg de DNA plasmídico en el carril número 2. Se aplicó un voltaje constante de 60 V durante una hora para separar las



muestras. Trascurrido el tiempo se observó el gel en el analizador de imágenes Alpha Innotech Corporation®.

### **7.7. Preparación de células competentes de *S. typhi*.**

Para obtener células competentes de *S. typhi*, se sembró una colonia en 5 mL de caldo LB y se incubó a 37 °C toda la noche. Se sembró 300 µL del cultivo anterior en 300 mL de caldo LB, se incubó a 37 °C en agitación hasta obtener un D.O de 0.7 a una longitud de onda de 540 nm. Una vez alcanzada esa absorbancia se centrifugó 15 minutos a 7 000 rpm a 4 °C, se decantó, se resuspendió en 75 mL de CaCl<sub>2</sub> dihidratado 0.1 M y se dejó 60 minutos en hielo. Trascurrido el tiempo se centrifugó 5 minutos a 5 000 rpm a 4 °C. Finalmente se decantó y se resuspendió el botón en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y 5 mL de glicerol al 40%. Se realizaron alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf y se congeló a -70 °C hasta su utilización.

### **7.8. Transformación de *S. typhi* competente.**

Se adicionó 150 ng de DNA plasmídico a 100 µL de células competentes, se incubó por 45 minutos en hielo, posteriormente se incubó durante 90 segundos a 42 °C en baño de agua y finalmente se incubó durante 5 minutos en hielo. Trascurrido el tiempo de incubación se adicionó 1 mL de medio SOC (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubó a 37 °C por 1 hora con agitación. Se sembró 200 µL sobre una placa de LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó toda la

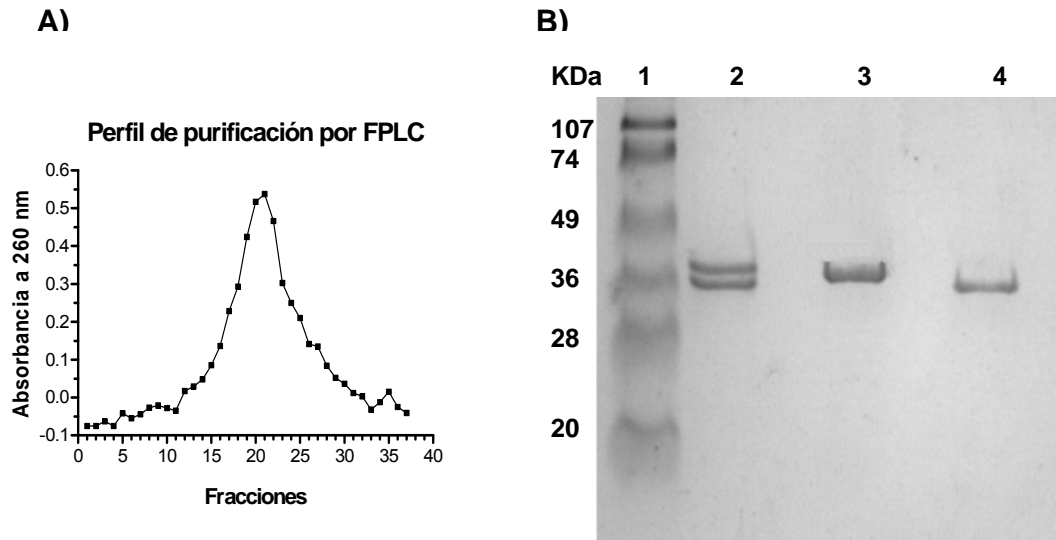
noche a 37 °C. Se selecciona una colonia para transferir a 5 mL de caldo LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubo durante 8 horas a 37°C en agitación. Se transfirió 2 mL del cultivo anterior a un matraz con 200 mL de caldo LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubo a 37°C en agitación hasta alcanzar una absorbancia de 1 a 540 nm. Una vez alcanzada la absorbancia se cosecho por centrifugación a 6 000 rpm, se decanto y el botón se resuspendió en 10 mL de caldo LB-Ampicilina adicionado con 10% de glicerol. Se realizaron alícuotas de 100 µL y se almacenaron a -70 °C.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Purificación de las porinas de *S. typhi*.

Las porinas de *S. typhi* se purificaron por el método de Nikaido y fueron separadas por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200, la cual descarta a las otras proteínas de membrana externa y la mayor parte de LPS, se obtuvieron diferentes fracciones que se representan en el cromatograma de la figura 1A. Las porinas 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 fueron identificadas con el número de lote P07/0504, la concentración de estas proteínas fue de 188.18 µg/mL determinada por el método de Lowry<sup>109</sup>. El contenido de LPS fue de 0.02 % que correspondió a 0.2 ng de LPS/µg de proteína, determinado por medio de la prueba de Limulus.

Con el objetivo de analizar la eficiencia de la purificación de las porinas de *S. typhi* e identidad, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (Figura 1B). La presencia de dos bandas con un corrimiento electroforético relativo a 36 y 38 KDa corresponde a las porinas OmpC y OmpF de *S. typhi*, indicando que se obtuvo un producto sin contaminación con otras proteínas de diferentes pesos moleculares.

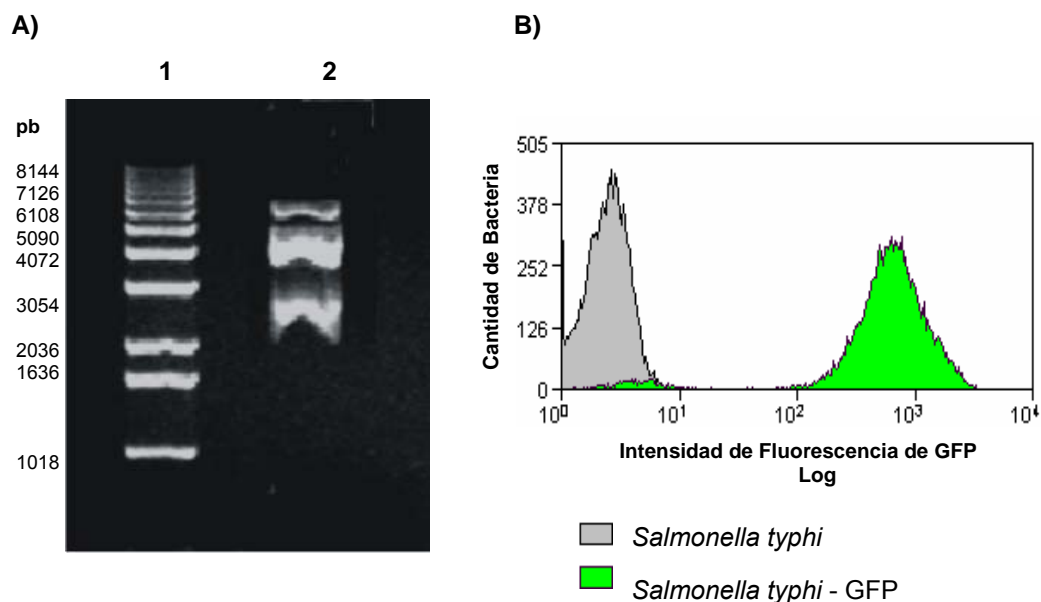


**Figura 1. Purificación de las porinas de *S. typhi*.** **A)** Perfil de purificación de las porinas de *S. typhi*, por cromatografía de exclusión molecular, se obtuvieron las porinas en la fracción 15 a la 28. **B)** SDS-PAGE Acrilamida al 12% en condiciones reductoras; carril 1, marcadores de pesos moleculares; carril 2, porinas purificadas a partir de *S. typhi*; carril 3, Porina OmpF purificada a partir de *S. typhi* STYF302 ( $\Delta ompC Km^R$ ); carril 4, porina OmpC purificada a partir de *S. typhi* STYF302 ( $\Delta ompF Km^R$ ). En cada carril la concentración proteica fue de 2  $\mu$ g.

## 8.2. Obtención de *S. typhi* - GFP.

Se obtuvo el plásmido pPFv25 que tiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente y confiere resistencia a ampicilina de una cepa de *Salmonella typhimurium*-GFP utilizando un kit comercial denominado QUIAGEN Plasmid Midi<sup>®</sup>. La integridad del plásmido se comprobó mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 2A). Se hicieron *S. typhi* competentes y se transformaron con el plásmido pPFv25 por choque térmico. Se verificó la expresión de la proteína verde fluorescente en la bacteria *S. typhi* transformada con el plásmido pPFv25 (*S. typhi*-GFP) mediante un citómetro de flujo (CyAn<sup>™</sup> ADP Dako<sup>®</sup>) evaluando la intensidad de

fluorescencia en el canal FL1 y se capturaron al menos 10 000 eventos (Figura 2B).

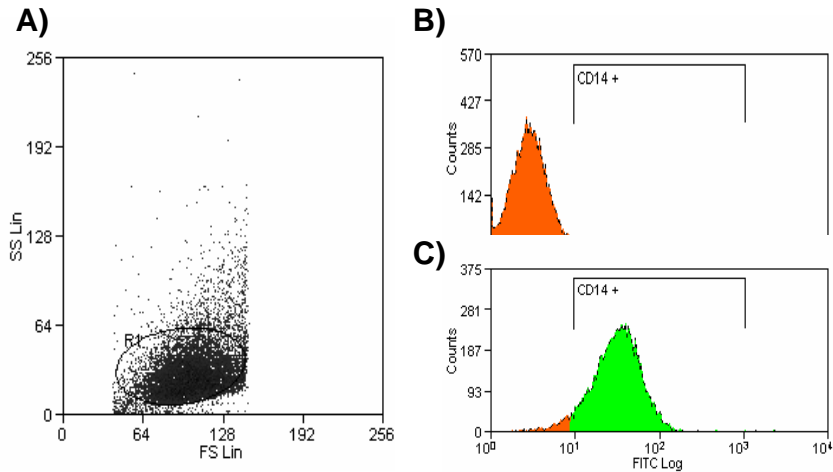


**Figura 2. Generación de *S. typhi* verde.** **A)** Gel de agarosa al 1 %; Carril 1, pesos moleculares 1Kb DNA Invitrogen®; carril 2, DNA plasmídico extraído de *S. typhimurium*-GFP. Se observan tres bandas en el carril número dos perteneciente al DNA plasmídico en sus diferentes topoisómeros. **B)** Histograma de la proteína verde fluorescente de la bacteria *S. typhi* transformada con el plásmido pFPV25. En verde se muestra el cultivo de *S. typhi* después de ser transformada con el plásmido pFPV25, en gris se muestra el cultivo de *S. typhi* antes de ser transformada.

### 8.3. Caracterización de línea celular J774 A.1 a través de la expresión de CD14

Para determinar la identidad, homogeneidad y pureza de la línea celular J774 A.1 de macrófagos de ratón a utilizarse en el presente estudio, se evaluó la expresión del marcador CD14 utilizando un anticuerpo específico conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo (CyAn™ ADP Dako®) evaluando la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 y se capturaron al menos 10 000 eventos. Las células analizadas mostraron

un patrón de expresión homogéneo en el 96.4 % de las células J774 A.1 (Figura 3).



**Figura 3. Verificación de la expresión del marcador CD14 en la línea celular de macrófagos de ratón J774 A.1** Se incubó  $1 \times 10^6$  macrófagos con un anticuerpo anti-CD14 conjugado con FITC y se analizó el porcentaje de células positivas por citometría de flujo utilizando un citómetro CyAn™ ADP Dako®. Para el análisis se capturaron al menos 10 000 eventos de la zona seleccionada. **A)** Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad donde se muestra la población de macrófagos **B)** Histograma de las células sin anticuerpo (autofluorescencia) **c)** Histograma de las células con el anticuerpo anti-CD14 conjugado con FITC se obtuvo un 96.4 % de células positivas para la expresión de CD14.

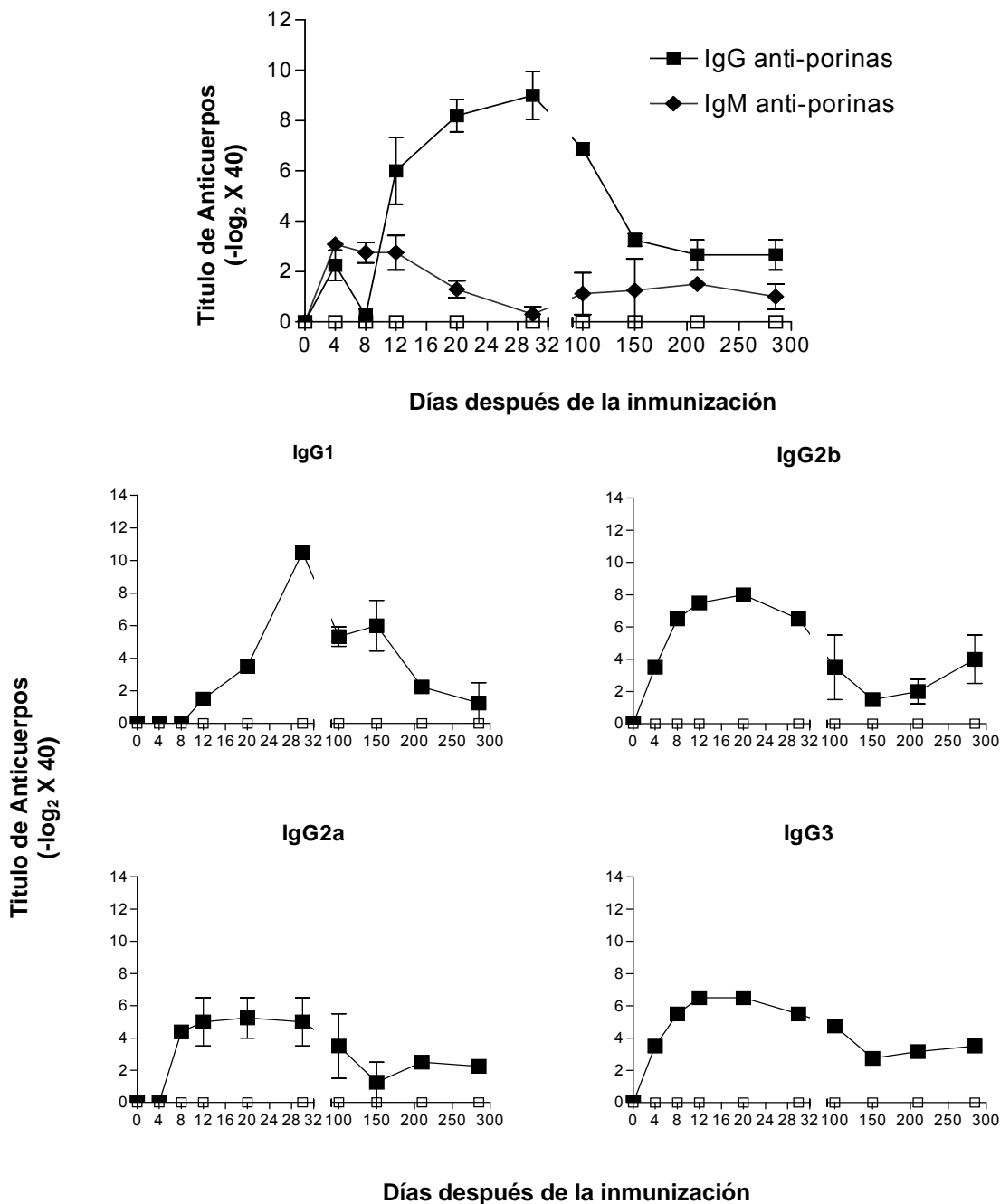
#### **8.4. Las porinas de *S. typhi* inducen una respuesta de anticuerpos de larga duración en ratones mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos.**

Los estudios previos realizados con porinas de *S. typhi* han demostrado que la administración de dos dosis de 10 µg de porinas a los días 0 y 15 pueden inducir la producción de anticuerpos específicos detectables hasta el día 500 post-inmunización (anticuerpos de memoria), sin embargo no se descartó la posibilidad de que este efecto no fuera causado por la estimulación cruzada con otras proteínas de membrana externa provenientes de microorganismos ambientales.

Por lo tanto en este estudio decidimos caracterizar la capacidad de las porinas de *S. typhi* para inducir la producción de anticuerpos de larga duración con una sola dosis, en ratones BALB/c (adquiridos en Harlan<sup>®</sup> México) mantenidos en condiciones libres de patógenos específico. Estos experimentos fueron realizados en ratones de la cepa BALB/c de 6 y 8 semanas de edad mantenidos en condiciones SPF. Los ratones fueron inyectados i.p con 10 µg de porinas de *S. typhi* resuspendidos en SSI en un volumen final de 500 µL. Las muestras de sangre fueron obtenidas por la cavidad retroorbital en los días señalados en las gráficas. Los sueros obtenidos fueron congelados a -70°C y analizados al mismo tiempo por el método de ELISA indirecta. Se detectaron anticuerpos de clase IgM, IgG totales y todos los isotipos de IgG.

Estos datos (Figura 4) nos muestran que una sola inmunización con 10 µg de porinas de *S. typhi* es suficiente para generar altos títulos de anticuerpos de larga duración (anticuerpos de memoria). La cinética de producción de anticuerpos se caracterizo por la rápida producción de anticuerpos de clase IgM, IgG y los isotipos de IgG, se observa titulo de anticuerpos a partir del día 4 y se alcanzan niveles máximos de anticuerpos entre los días 20 y 30. En los subsecuentes días se mantienen niveles detectables de anticuerpos hasta el día 288 posterior a la inmunización.

Sin embargo, que las cinéticas de producción de anticuerpos, sean evaluadas y permanezca durante 288 días posteriores a la inmunización no implica que se mantenga la capacidad efectora de estos anticuerpos



**Figura 4.** La inmunización con una sola dosis de porinas de *S. typhi* induce la producción de altos títulos anticuerpos específicos de memoria. Grupos de 6 ratones BALB/c mantenidos en condiciones SPF fueron inmunizados intraperitonealmente con 10 µg porinas de *S. typhi* sin adyuvante. Los títulos de anticuerpos específicos se determinaron mediante ELISA hasta el día 288 posterior a la inmunización con solución de Nikaído (cuadros cerrados) A) Se produjeron anticuerpos de clase IgG e IgM hasta el último día analizado. B) Se produjeron anticuerpos específicos de todas las subclases de IgG hasta el último día analizado.



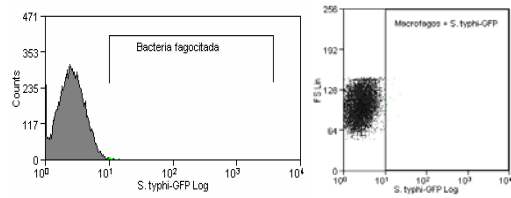
### **8.5. Los anticuerpos de memoria inducidos por las porinas de *S. typhi* son opsonizantes y median la fagocitosis de la bacteria.**

La cinética de producción de anticuerpos inducida por las porinas *S. typhi* presentan títulos de anticuerpos detectables durante toda la vida del ratón y estos anticuerpos poseen capacidad bactericida a través de la fijación del complemento<sup>107</sup>, sin embargo esto no implica que los anticuerpos generados presenten capacidad opsonizante y favorezcan la fagocitosis de la bacteria.

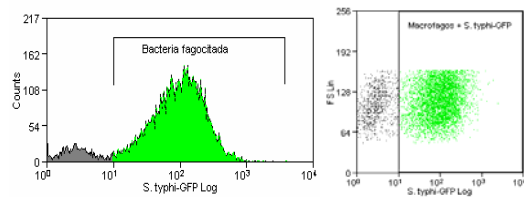
Para evaluar si los anticuerpos generados por la inmunización de 10 µg de porinas de *S. typhi* presentan capacidad opsonofagocítica, opsonizamos una cepa de *S. typhi*-GFP y se incubo con macrófagos de ratón de la línea celular J774 A.1. La cantidad relativa de bacteria que fue internalizada por los macrófagos fue determinada mediante un citómetro de flujo CyAn™ ADP Dako®. Analizando a lo menos 10 000 eventos.

Como se muestra en la figura 5 las porinas inducen anticuerpos que presentan capacidad opsonizante desde el día 4 después de la inmunización y alcanza el nivel máximo al día 30 y mantienen esta capacidad hasta el día 288 posterior a la inmunización con porinas de *S. typhi*.

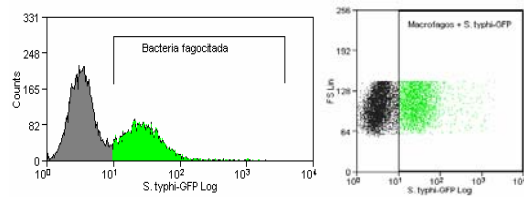
**A. Macrófagos**



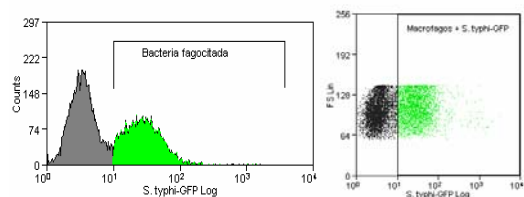
**B. Suero anti – *S. typhi*-GFP  
BF = 90.43%. IMF = 133.39**



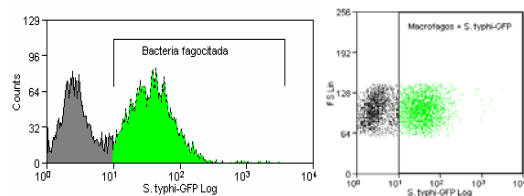
**C. Macrófagos con *S. typhi*-GFP  
BF = 38.29%. IMF = 55.42**



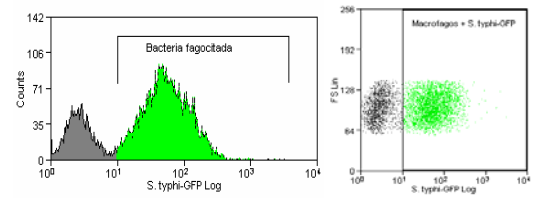
**D. Suero anti-porinas del día 0  
BF = 42.33%. IMF = 53.37**



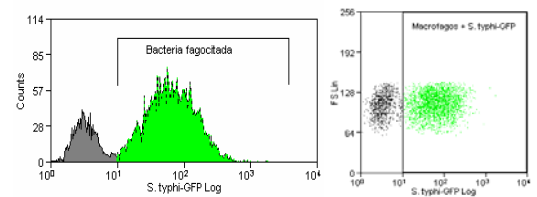
**E. Suero anti-porinas del día 4  
BF = 62.05%. IMF = 74.25**



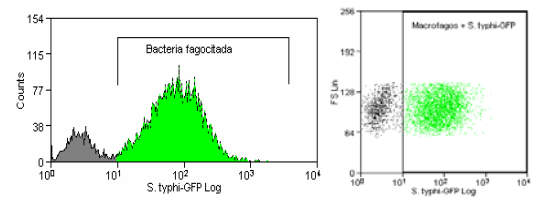
**F. Suero anti-porinas del día 8  
BF = 75.18 % IMF = 79.34**



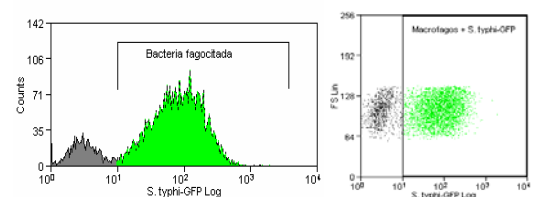
**G. Suero anti-porinas del día 12  
BF = 78.57 % IMF = 100.68**



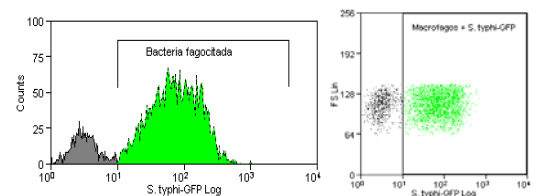
**H. Suero anti-porinas del día 20  
BF = 81.73% IMF = 104.11**



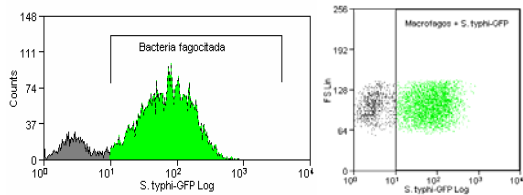
**I. Suero anti-porinas del día 30  
BF = 85.34%. IMF = 114.45**



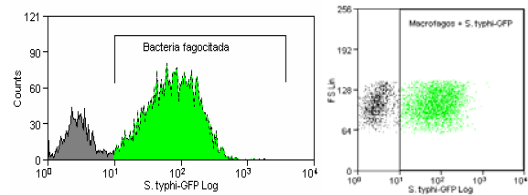
**J. Suero anti-porinas del día 90  
BF = 86.18%. IMF = 117.01**



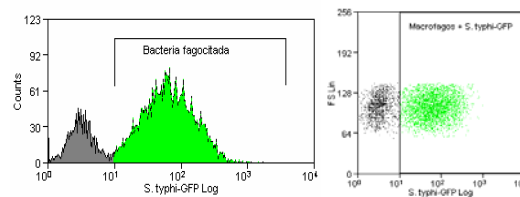
**K.** Suero anti-porinas del día 150  
BF = 84.73% IMF = 102.97



**L.** Suero anti-porinas del día 210  
BF = 80.71%. IMF = 106.61

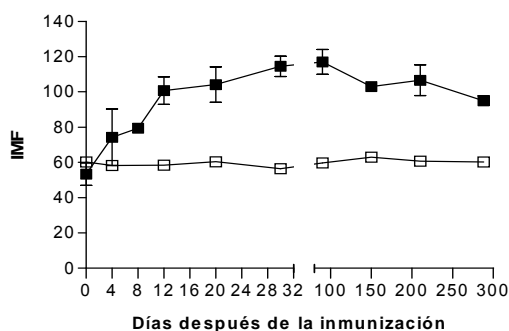


**M.** Suero anti-porinas del día 288  
BF = 78.54%. IMF = 94.94

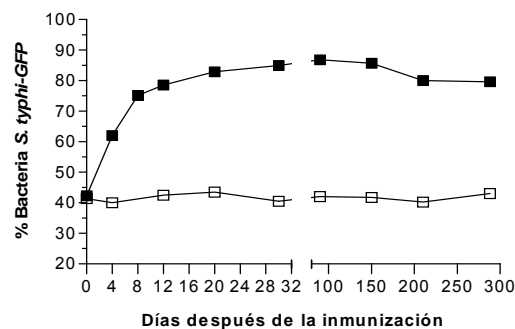


**Figura 5.** Los anticuerpos de memoria inducidos por la inmunización con porinas de *S. typhi* son opsonizantes y median la fagocitosis de la bacteria. Se evaluó la capacidad opsonofagocítica, poniendo el suero de los diferentes días posteriores a la inmunización con porinas en contacto con *S. typhi-GFP* e incubando con macrófagos de la línea celular J774 A.1. La cantidad relativa de bacteria que fue internalizada se midió en el citómetro de flujo CyAn™ ADP. A la izquierda se muestra los histogramas de la intensidad de fluorescencia de los macrófagos que internalizaron *S. typhi-GFP*, a la derecha se muestran las gráficas de puntos del porcentaje de macrófagos que internalizaron *S. typhi-GFP*. BF= Porcentaje de bacteria Internalizada. IMF=Intensidad Media de Fluorescencia. **A)** Macrófagos de la línea celular J774 A.1 (autofluorescencia). **B)** Bacteria opsonizada con suero anti - *S. typhi* **C)** *S. typhi-GFP* con macrófagos de la línea celular J774 A.1 (entrada basal de la bacteria). **D, E, F, G, H, I, J, K, L, M)** *S. typhi-GFP* opsonizada con los diferentes sueros de los días posteriores a la inmunización con macrófagos de la línea J774.A.1.

**A)**



**B)**



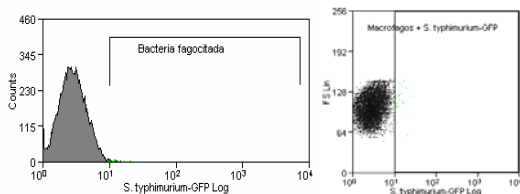
**Figura 6.** Las porinas de *S. typhi* inducen una respuesta de anticuerpos de memoria con capacidad opsonofagocítica. Se evaluó la capacidad opsonofagocítica, poniendo el suero de los diferentes días con *S. typhi-GFP* y se incubó con macrófagos de la línea celular J774 A.1 La cantidad relativa de bacteria que fue internalizada se midió en el citómetro de flujo CyAn™ ADP.(cuadros cerrados). Como grupo control se empleó ratones inmunizados con solución de Nikaido (cuadros abiertos). **A)** Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los macrófagos que internalizaron *S. typhi-GFP*. **B)** Se muestra el porcentaje de macrófagos que internalizaron *S. typhi-GFP*.

## 8.6. Los anticuerpos de memoria inducidos por las porinas de *S. typhi* no presentan capacidad opsonizante en contra de *Salmonella typhimurium*.

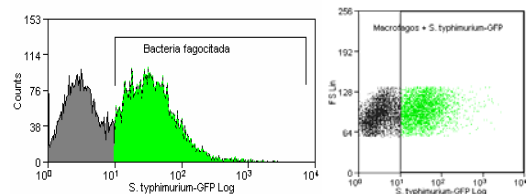
Una sola inmunización con porinas de *S. typhi* induce títulos de anticuerpos específicos de manera vitalicia con capacidad bactericida y además estos anticuerpos presentan capacidad opsonofagocítica. Debido a la homología que existe entre las porinas de *S. typhi* con las porinas de *Salmonella typhimurium*, nos preguntamos si existe algún efecto opsonizante de estos anticuerpos de memoria contra *Salmonella typhimurium-GFP*.

Se encontró que no existe una capacidad opsonizantes en contra de *S. typhimurium* de los anticuerpos de memoria inducidos por la inmunización de una sola dosis de 10 µg de porinas de *S. typhi*.

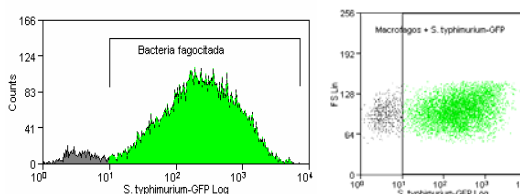
**A.** Macrófagos J 774 A.1



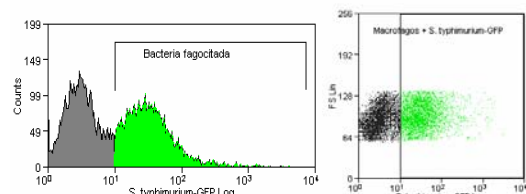
**C.** Macrófagos con *S. typhimurium-GFP*  
BF = 60.04% IMF = 58.85

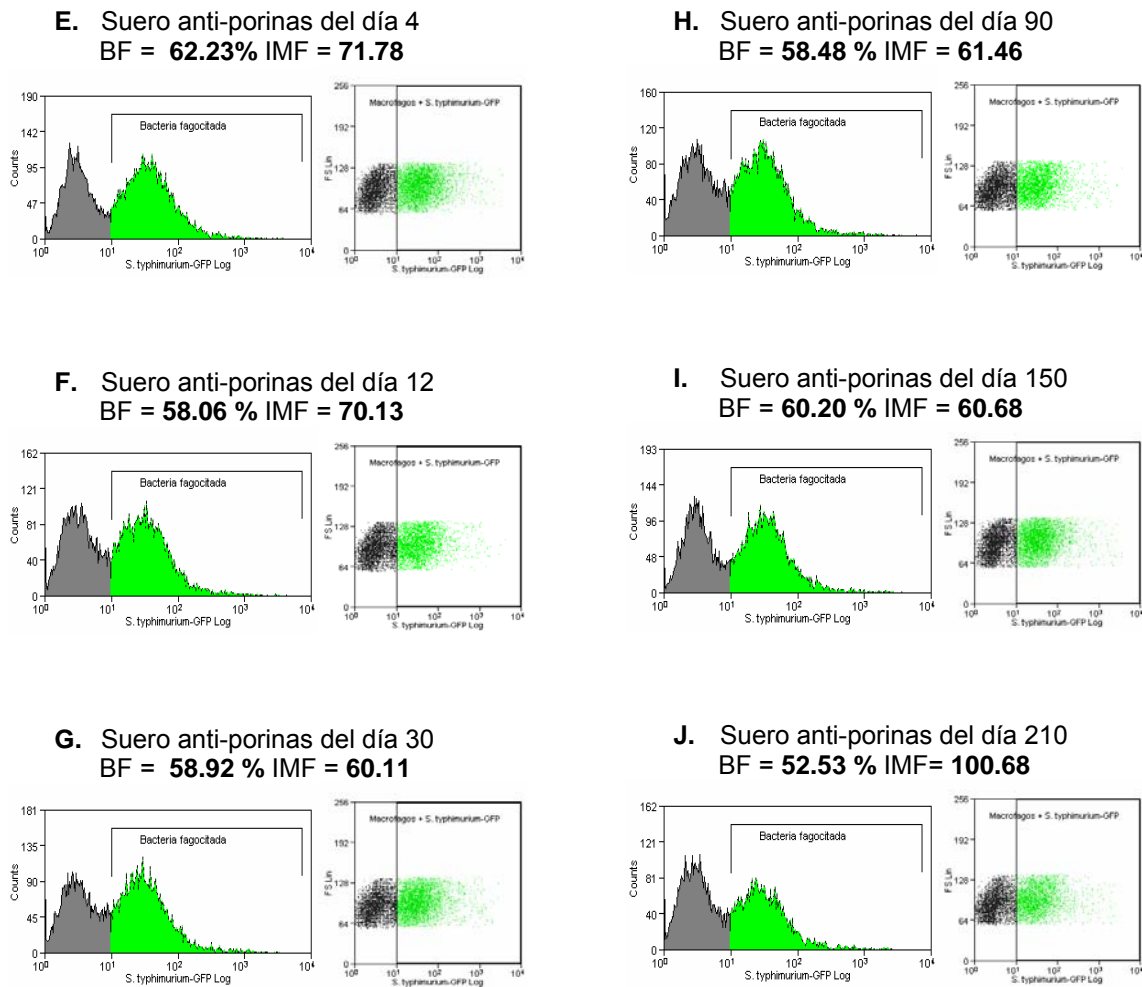


**B.** Suero anti – *S. typhimurium-GFP*  
BF = 93.69% IMF = 459.73



**D.** Suero anti-porinas del día 0  
BF = 53.69% IMF = 62.94





**Figura 7. Los anticuerpos de memoria inducidos por las porinas de *S. typhi* no presentan capacidad opsonizante en contra de *S. typhimurium*.** Se evaluó la capacidad opsonofagocítica, poniendo el suero de los diferentes días posteriores a la inmunización con porinas de *S. typhi* en contacto con *S. typhimurium-GFP* e incubando con macrófagos de la línea celular J774 A.1. La cantidad relativa de bacteria que fue internalizada se midió en el citómetro de flujo CyAn™ ADP. A la izquierda se muestra los histogramas de la intensidad de fluorescencia de los macrófagos que internalizaron *S. typhimurium-GFP*, a la derecha se muestran las gráficas de puntos del porcentaje de macrófagos que internalizaron *S. typhimurium-GFP*. BF= Porcentaje de bacteria Internalizada. IMF=Intensidad Media de Fluorescencia. **A)** Macrófagos de la línea celular J774 A.1 (autofluorescencia). **B)** Bacteria opsonizada con suero anti - *S. typhimurium* con macrófagos de la línea celular J774 A.1 **C)** *S. typhimurium-GFP* con macrófagos de la línea celular J774 A.1 (entrada basal de la bacteria). **D, E, F, G, H, I, J)** *S. typhimurium-GFP* opsonizada con los diferentes sueros de los días posteriores a la inmunización con porinas de *S. typhi* en contacto con macrófagos de la línea J774 A.1.

## 9. DISCUSIÓN

Pocos son los antígenos que pueden inducir títulos de anticuerpos de forma vitalicia, con una sola administración y sin la necesidad de adicionar adyuvante, sin embargo la presencia de altos títulos de anticuerpos no necesariamente correlaciona con protección<sup>3</sup>, por lo que evaluar la función efectora como capacidad opsonizante, bactericida y neutralizante dependiente de anticuerpos podría ser un mecanismo efector que participe en la protección.

El objetivo de un antígeno vacunal es general protección de larga duración, en la actualidad se conoce que las vacunas exitosas clínicamente son capaces de generar protección a través de mantener títulos de anticuerpos neutralizantes principalmente<sup>10</sup>.

En estudios previos se ha reportado que las porinas de *S. typhi* inducen de forma vitalicia títulos de anticuerpos y estos tienen capacidad bactericida<sup>107</sup>, en el presente estudio se observó que estos anticuerpos son capaces de opsonizar y favorecer la fagocitosis de estos complejos inmunes, esta capacidad se mantiene hasta el último día de análisis (día 288 posterior a la inmunización), aunque la cinética de anticuerpos muestra un descenso después del día 30, la capacidad opsonofagocítica se mantienen, por lo que nos sugiera que no necesariamente se necesitan tener altos títulos de anticuerpos.

Sin embargo existe la posibilidad que la presencia de anticuerpo opsonizantes favorezca la infección de las células del sistema inmune, y ser utilizadas como acarreadores para diseminar la infección. Por otra parte el contar con anticuerpos de larga duración que sean opsonizantes no necesariamente nos indica la eliminación de la bacteria, por lo que será necesario evaluar en estudios posteriores la eliminación de la bacteria mediada por los macrófagos.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la cinética de anticuerpos específicos se necesita una constante migración de las células plasmáticas para mantener una respuesta de anticuerpos de larga duración, esto podría ser un indicio que existe una generación constante de células plasmáticas. Además el hecho de que los anticuerpos aumenten su capacidad efectora en poco tiempo implica que las células efectoras han pasado por un proceso de competencia y selección continua, lo que nos llevaría a proponer que el mecanismo de generación de una respuesta de anticuerpos de memoria es dependiente del antígeno y que las células plasmáticas generadas son de vida corta.

Estos resultados junto con los antecedentes de que las porinas son proteínas de membrana externa, altamente hidrofóbicas, con una organización repetitiva (8 asas externas y formación de trímeros)<sup>112</sup> y reconocidas por PRRs<sup>113</sup> apoyan a la teoría de que los antígenos-PAMP son altamente inmunogénicos. Estas características del antígeno podrían participar en la generación de anticuerpos de memoria ya que facilitan la estimulación sostenida de los linfocitos B bajando el umbral de activación y formando agregados antigénicos.

## **10. CONCLUSIONES**

Las porinas son capaces de inducir la producción de altos títulos de anticuerpos específicos de larga duración que muestran capacidad opsonizante y que median la fagocitosis de la bacteria.



## 11. ANEXO

### Reactivos utilizados para las determinaciones por ELISA.

#### **Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4**

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7g

Fosfato monobásico de sodio 0.7g

Fosfato dibásico de sodio 2.7g

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

#### **Solución reguladora de Carbonatos (SAC) pH 9.5**

Pese exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g

Carbonato de sodio 2.8 g

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

#### **Solución reguladora de citratos (SBC) pH 5.6**

Pesar exactamente:

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

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

#### **Solución de lavado (agua Tween 0.1%)**

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

#### **Solución de Bloqueo (PBS + leche 5%)**

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

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

#### **Solución de revelado.**

Por cada 12 mL de SBC agregar 0.006g de OPD (SIGMA) y 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (SIGMA).

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

#### **Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N**

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

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
2. Zinkernagel, R. M. 2002. On differences between immunity and immunological memory. *Curr.Opin.Immunol.* 14:523-536.
3. Zinkernagel, R. M. and H. Hengartner. 2006. Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol.Rev.* 211:310-319.
4. Fenner, F. 1949. Mouse-pox; infectious ectromelia of mice; a review. *J.Immunol.* 63:341-373.
5. Sabin, A. B., P. Albrecht, A. K. Takeda, E. M. Ribeiro, and R. Veronesi. 1985. High effectiveness of aerosolized chick embryo fibroblast measles vaccine in seven-month-old and older infants. *J.Infect.Dis.* 152:1231-1237.
6. Parkin, J. and B. Cohen. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-1789.
7. Zinkernagel, R. M. 2000. Immunity 2000. *Immunol.Today* 21:422-423.
8. Janeway C Jr, Travers P, Walport M, and Shlomchik M. Immunobiology: the Immune System in Health and Disease. 2001. New York, Garland Publishing.
9. Manz, R. A., A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Maintenance of serum antibody levels. *Annu.Rev.Immunol.* 23:367-386.
10. Zinkernagel, R. M. 2003. On natural and artificial vaccinations. *Annu.Rev.Immunol.* 21:515-546.
11. Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity.* 8:363-372.
12. Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133-134.
13. Manz, R. A., S. Arce, G. Cassese, A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr.Opin.Immunol.* 14:517-521.
14. Gourley, T. S., E. J. Wherry, D. Masopust, and R. Ahmed. 2004. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin.Immunol.* 16:323-333.

15. Zinkernagel, R. M. 2000. On immunological memory. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 355:369-371.
16. Mandel, T. E., R. P. Phipps, A. Abbot, and J. G. Tew. 1980. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol.Rev.* 53:29-59.
17. Gray, D. and H. Skarvall. 1988. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336:70-73.
18. Tew, J. G., R. P. Phipps, and T. E. Mandel. 1980. The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. *Immunol.Rev.* 53:175-201.
19. 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.
20. Zinkernagel, R. M., A. Lamarre, A. Ciurea, L. Hunziker, A. F. Ochsenbein, K. D. McCoy, T. Fehr, M. F. Bachmann, U. Kalinke, and H. Hengartner. 2001. Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv.Immunol.* 79:1-53.
21. Zinkernagel, R. M. 2001. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N.Engl.J.Med.* 345:1331-1335.
22. Zinkernagel, R. M. 2000. What is missing in immunology to understand immunity? *Nat.Immunol.* 1:181-185.
23. Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* 40:845-859.
24. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2:675-680.
25. Clark, E. A. and J. A. Ledbetter. 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367:425-428.
26. Goldsby RA, Kindt TJ, and Osborne BA. Kuby Immunology. 2007. New York, W.H. Freeman and Company.  
Ref Type: Generic
27. Galaktionov, V. G. 2004. [The main directions of studies in evolutionary immunology]. *Izv.Akad.Nauk Ser.Biol.*645-658.
28. Zinkernagel, R. M. 2002. Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunol.Rev.* 185:103-125.
29. DeFranco, A. L. 1991. All about B cells. *Cancer Cells* 3:450-453.

30. Hess, J., A. Werner, T. Wirth, F. Melchers, H. M. Jack, and T. H. Winkler. 2001. Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:1745-1750.
31. Ollila, J. and M. Vihinen. 2005. B cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 37:518-523.
32. Padlan, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol.Immunol.* 31:169-217.
33. Padlan, E. A. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol.Immunol.* 31:169-217.
34. Senn, B. M., C. Lopez-Macias, U. Kalinke, A. Lamarre, A. Isibasi, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 2003. Combinatorial immunoglobulin light chain variability creates sufficient B cell diversity to mount protective antibody responses against pathogen infections. *Eur.J.Immunol.* 33:950-961.
35. Sakano, H., K. Huppi, G. Heinrich, and S. Tonegawa. 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280:288-294.
36. Cobb, R. M., K. J. Oestreich, O. A. Osipovich, and E. M. Oltz. 2006. Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv.Immunol.* 91:45-109.
37. Schatz, D. G. and E. Spanopoulou. 2005. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 290:49-85.
38. Ehrenstein, M. R. and B. Hahn. 2002. T cell-B cell interactions. *Lupus* 11:790-792.
39. Hjelm, F., F. Carlsson, A. Getahun, and B. Heyman. 2006. Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand.J.Immunol.* 64:177-184.
40. Ghia, P., E. ten Boekel, A. G. Rolink, and F. Melchers. 1998. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol.Today* 19:480-485.
41. Melchers, F. and A. R. Rolink. 2006. B cell tolerance--how to make it and how to break it. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 305:1-23.
42. Parker, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu.Rev.Immunol.* 11:331-360.
43. DeFranco, A. L. 1987. Molecular aspects of B-lymphocyte activation. *Annu.Rev.Cell Biol.* 3:143-178.

44. Maclennan, I. C. 1994. Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol.* 12:117-139.
45. Maclennan, I. C. 2005. Germinal centers still hold secrets. *Immunity.* 22:656-657.
46. Kuppers, R., M. Zhao, M. L. Hansmann, and K. Rajewsky. 1993. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.* 12:4955-4967.
47. Benedict, C. L., S. Gilfillan, T. H. Thai, and J. F. Kearney. 2000. Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol.Rev.* 175:150-157.
48. Honjo, T., M. Muramatsu, and S. Fagarasan. 2004. AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity.* 20:659-668.
49. Wagner, S. D. and M. S. Neuberger. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu.Rev.Immunol.* 14:441-457.
50. Hulett, M. D., N. Osman, I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1991. Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine high affinity receptor for IgG. *J.Immunol.* 147:1863-1868.
51. Bonnefoy, J. Y., J. F. Gauchat, S. Lecoanet-Henchoz, P. Graber, and J. P. Aubry. 1996. Regulation of human IgE synthesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 796:59-71.
52. Fagarasan, S. and T. Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat.Rev.Immunol.* 3:63-72.
53. Frasca, D., R. L. Riley, and B. B. Blomberg. 2004. Effect of age on the immunoglobulin class switch. *Crit Rev.Immunol.* 24:297-320.
54. Honjo, T., K. Kinoshita, and M. Muramatsu. 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu.Rev.Immunol.* 20:165-196.
55. Prussin, C. and D. D. Metcalfe. 2006. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:S450-S456.
56. 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.
57. Zinkernagel, R. M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.

58. Vieira, P. and K. Rajewsky. 1988. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur.J.Immunol.* 18:313-316.
59. Askonas, B. A., A. R. Williamson, and B. E. Wright. 1970. Selection of a single antibody-forming cell clone and its propagation in syngeneic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 67:1398-1403.
60. Ochsenbein, A. F., D. D. Pinschewer, S. Sierro, E. Horvath, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. 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.U.S.A* 97:13263-13268.
61. Manz, R. A., A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2005. Maintenance of serum antibody levels. *Annu.Rev.Immunol.* 23:367-386.
62. Mellman, I., T. Koch, G. Healey, W. Hunziker, V. Lewis, H. Plutner, H. Miettinen, D. Vaux, K. Moore, and S. Stuart. 1988. Structure and function of Fc receptors on macrophages and lymphocytes. *J.Cell Sci.Suppl* 9:45-65.
63. Esser, A. F. 1991. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol.Today* 12:316-318.
64. Tomlinson, S. 1993. Complement defense mechanisms. *Curr.Opin.Immunol.* 5:83-89.
65. Cooper, N. R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv.Immunol.* 37:151-216.
66. Schifferli, J. A. and R. P. Taylor. 1989. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. *Kidney Int.* 35:993-1003.
67. Bhakdi, S. and J. Tranum-Jensen. 1991. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol.Today* 12:318-320.
68. Joshi, T., J. P. Butchar, and S. Tridandapani. 2006. Fcgamma receptor signaling in phagocytes. *Int.J.Hematol.* 84:210-216.
69. Aderem, A. and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17:593-623.
70. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu.Rev.Immunol.* 20:825-852.
71. Sears, D. W., N. Osman, B. Tate, I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1990. Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J.Immunol.* 144:371-378.

72. Indik, Z. K., J. G. Park, S. Hunter, and A. D. Schreiber. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86:4389-4399.
73. Voice, J. K. and P. J. Lachmann. 1997. Neutrophil Fc gamma and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complexes and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. *Eur.J.Immunol.* 27:2514-2523.
74. Sanchez-Mejorada, G. and C. Rosales. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J.Leukoc.Biol.* 63:521-533.
75. Warren, H. S. and B. F. Kinnear. 1999. Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J.Immunol.* 162:735-742.
76. Radaev, S. and P. D. Sun. 2003. Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 32:93-114.
77. Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 67:593-656.
78. Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* 97:85-100.
79. Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J.Biol.Chem.* 269:3905-3908.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.

85. Schnaitman, C. A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J.Bacteriol.* 108:545-552.
86. 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.
87. Verdugo-Rodriguez, A., L. H. Gam, S. Devi, C. L. Koh, S. D. Puthuchery, 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.
88. 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.
89. 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.
90. Alurkar, V. and R. Kamat. 1997. Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae. *Infect.Immun.* 65:2382-2388.
91. 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.
92. Blanco, F., A. Isibasi, G. C. Raul, 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.
93. Galdiero, M., M. Vitiello, and S. Galdiero. 2003. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol.Lett.* 226:57-64.
94. 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-gamma activation. *Immunology* 103:41-48.
95. 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.



96. 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.
97. 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.
98. Singh, S. P., Y. U. Williams, P. E. Klebba, P. Macchia, and S. Miller. 2000. Immune recognition of porin and lipopolysaccharide epitopes of *Salmonella typhimurium* in mice. *Microb.Pathog.* 28:157-167.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Saxen, H. 1984. Mechanism of the protective action of anti-*Salmonella* IgM in experimental mouse salmonellosis. *J.Gen.Microbiol.* 130:2277-2283.
103. 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.
104. Mittrucker, H. W. and S. H. Kaufmann. 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J.Leukoc.Biol.* 67:457-463.
105. 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.
106. 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.

107. Secundino, I., C. Lopez-Macias, L. Cervantes-Barragan, C. Gil-Cruz, N. Rios-Sarabia, R. Pastelin-Palacios, M. A. Villasís-Keever, I. Becker, J. L. Puente, E. Calva, and A. Isibasi. 2006. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 117:59-70.
108. Valdivia, R. H. and S. Falkow. 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277:2007-2011.
109. 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.
110. Lehmann, A. K., S. Sornes, and A. Halstensen. 2000. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 243:229-242.
111. Plested, J. S. and P. A. Coull. 2003. Opsonophagocytosis assay using flow-cytometry. *Methods Mol.Med.* 71:263-275.
112. Garavito, R. M. and J. P. Rosenbusch. 1980. Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial x-ray analysis. *J.Cell Biol.* 86:327-329.
113. Gil-Cruz, C. Evaluación de la respuesta inmune innata inducida por las Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi. 2006. Instituto Politécnico Nacional.