



Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Química.

Capacidad adyuvante de la porina OmpC de
Salmonella typhi sobre la vacuna
experimental hecha con la proteína P38 de
Mycobacterium tuberculosis

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Montecillo Sandoval Raúl Enrique.

MEXICO, D. F.

2009



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:

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL: Profesor: Constantino III Roberto López Macías.

SECRETARIO: Profesor: Laura Cecilia Bonifaz Alonzo

1er. SUPLENTE: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarria

2° SUPLENTE: Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica. (UIMIQ).
1er piso del Hospital de Especialidades.
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).
Av. Cuauhtémoc 330 C.P. 06020 México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS.

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): M. EN C. CRISTINA DEL CARMEN CRUZ GIL.

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): MONTECILLO SANDOVAL RAÚL ENRIQUE.

(nombre (s) y firma (s))

DEDICATORIA.

A mis padres, por haber confiado en mi y estar siempre a mi lado, no existen palabras para expresar mi gratitud...simplemente los quiero mucho, GRACIAS.

A mis hermanos: Karen, Nata y Alex, por ser la fuerza que me alienta para seguir adelante cada día.

A mis amigos: Luz, Ere, Sebas, Lili, por ser los mosqueteros incansables en la larga jornada.

A Jan, por tu apoyo incondicional y todos los momentos que ahora son solo uno.

Agradecimientos

Al Dr. Armando Isibasi por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, pero sobre todo por su apoyo incondicional en mi vida.

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

A M en C Cristina del Carme Cruz Gil y M en C Christian Shibayama por su apoyo en el análisis y crítica profunda del presente trabajo, pero sobre todo por su confianza y apoyo por compartir esta etapa de mi vida.

A la Dra. Clara Espitia por proporcionar todo su apoyo en la realización de este trabajo.

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

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

**No vayas por donde el camino te lleve.
Ve en cambio por donde no hay camino y deja rastro.**

Ralph Waldo Emerson.

INDICE.

1. Resumen
2. Lista de abreviaturas.
3. Marco teórico.
4. Planteamiento del problema
5. Hipótesis
6. Objetivo
 - 6.1 Objetivo general
 - 6.2 Objetivos particulares
7. Modelos experimentales
8. Materiales y métodos
9. Resultados
10. Discusión
11. Conclusiones
12. Referencias

Capacidad adyuvante de la porina OmpC de *Salmonella typhi* sobre la vacuna experimental hecha con la proteína P38 de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.0 Resumen.

El conocimiento sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de la memoria inmunológica constituye actualmente la base para el diseño y desarrollo de vacunas efectivas.¹ A lo largo de la evolución el sistema inmune ha desarrollado la propiedad denominada **memoria inmunológica**, que se ha definido como la capacidad de responder de manera más rápida y eficiente durante una segunda exposición al antígeno. La respuesta de memoria es lo que confiere inmunidad a los organismos, entendiéndose como inmunidad al estado de protección frente a la re-infección y siendo está una consecuencia muy importante del establecimiento de la memoria inmunológica.²

Actualmente la tuberculosis (Tb) es una enfermedad que ha resurgido y constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial.³ Es la primera enfermedad en ser declarada emergencia global por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ocasionando la muerte de 2 millones de personas anualmente y se estima que un tercio de la población mundial está infectada. Sin embargo, actualmente no se cuenta con una vacuna eficiente que permita controlar la enfermedad, convirtiéndose en una prioridad el desarrollo de una vacuna efectiva.⁴

En 1921 Albert Calmette y Camilla Guérin describieron la primera vacuna en contra de la tuberculosis que utiliza como plataforma a *Mycobacterium bovis* (BCG). Esta vacuna es utilizada a nivel mundial en un programa de vacunación encabezado por la OMS, sin embargo, su eficacia es bastante variable en la población.⁵ Como parte del desarrollo de vacunas en contra de la TB se encuentran diversas estrategias, que sugieren emplear: cepas de BCG recombinante (rBCG), cepas de *M. tuberculosis* atenuadas, subunidades del patógeno, o bien vectores virales.⁶ Siguiendo con estas estrategias se ha observado que la proteína de 38 kDa (P38) de *M. tuberculosis* es un antígeno inmunodominante y es propuesta como un posible blanco para el desarrollo de una vacuna en contra de la TB.⁷ Sin embargo, es reconocido que empleo de subunidades, aumenta la seguridad de la preparación vacunal, no obstante la inmunogenicidad y capacidad de generar protección contra el microorganismo se ven disminuidas,⁸ para

poder compensar esta desventaja se ha hecho uso de adyuvantes, siendo la alúmina uno de los más empleados en vacunas para uso humano.

En nuestro laboratorio se han desarrollado nuevos candidatos para ser empleados como adyuvantes, tal es el caso de la porina OmpC de *Salmonella* entérica serovar Typhi. En varios estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las porinas de *S. typhi* se han caracterizado cómo antígenos que inducen una respuesta de anticuerpos de larga duración.⁹ También se ha observado que es capaz de activar eficientemente linfocitos B y células dendríticas y de inducir efecto adyuvante de larga duración sobre la respuesta de anticuerpos en contra de antígenos modelo y que esta capacidad se conserva aun en el día 400 posterior a la inmunización.^{10,11} Recientemente Cervantes-Barragan y col recientemente describieron la participación de TLR-2 y TLR-4 en la generación de una respuesta de anticuerpos de larga duración.¹²

Con base en lo anterior en el presente trabajo evaluamos la capacidad adyuvante de la porina OmpC sobre la proteína P38. Los resultados muestran un efecto adyuvante sobre la respuesta inmune humoral en contra de la proteína P-38 y

Con respecto a la sobre-expresión de moléculas coestimuladoras se observó que la coadministración de la proteína P38 con la porina OmpC, incrementan la expresión de CD80, CD 86 y CD69. Estos resultados nos indican una eficiente activación de las células dendríticas y macrófagos, pueden promover un ambiente de citocinas adecuado que permita inducir y potenciar la respuesta en contra de P38 generando inmunidad protectora que es necesaria para el desarrollo de una vacuna eficiente en contra de la TB.

4.0 MARCO TEORICO.

4.1 Vacunas y memoria inmunológica.

El conocimiento sobre el desarrollo de la memoria inmunológica es actualmente la base para el diseño y desarrollo de vacunas efectivas.¹ A lo largo de la evolución el sistema inmune ha desarrollado la propiedad denominada **memoria inmunológica**, que se ha definido como la capacidad de responder de manera más rápida y eficiente durante una segunda exposición al antígeno. La respuesta de memoria es lo que confiere inmunidad a los organismos, entendiéndose como inmunidad al estado de protección frente a la re-infección y siendo está una de las principales consecuencias del establecimiento de la memoria inmunológica.²

A consecuencia de que el ser humano observó que la exposición a los microorganismos favorecía la protección a la re-infección, éste se ha dado a la tarea de diseñar estrategias de vacunación que le ayuden a protegerse de infecciones letales. Las primeras preparaciones vacúnales que se emplearon fueron elaboradas a base de microorganismos atenuados, como la vacuna contra la viruela y la vacuna contra el cólera. Con el avance en las técnicas experimentales, se llegó a la atenuación de virus, permitiendo generar vacunas en contra de la polio (Sabin), sarampión y varicela.¹³

En la actualidad la generación de vacunas que conduzcan al establecimiento de una respuesta inmune protectora de larga duración es uno de los objetivos principales en el desarrollo de vacunas, las cuales deben cumplir ciertas características entre las que destacan: 1) debe ser segura, ya que las vacunas son distribuidas a grandes poblaciones y es necesario que los individuos que la reciben no desarrollen la enfermedad; 2) debe ser capaz de generar una inmunidad protectora y 3) la administración de la vacuna debe generar memoria inmunológica.¹⁴

Se han reportado estudios que evalúan los lapsos a los cuales aún se mantiene el estado inmune después de la administración de algunas de las vacunas disponibles, observándose de manera importante la participación de los anticuerpos (Tabla 1).

Vacuna	Lapso de persistencia del estado inmune	Tipo de vacuna
Rubeola ⁽¹⁵⁾	Al menos 27 años	Virus vivo atenuado
Influenza ⁽¹⁶⁾	Al menos 10 años	Subunidad
Hepatitis B ^(17,18)	Al menos 15 años	Subunidad
Rabia ⁽¹⁹⁾	Al menos 14 años	Virus vivo atenuado
Varicela ⁽²⁰⁾	Al menos 6 años	Virus vivo atenuado
Tétanos ⁽²¹⁾	Al menos 3 años	Subunidad
Pertussis ⁽²¹⁾	Al menos 3 años	Subunidad
Difteria ⁽²¹⁾	Al menos 3 años	Subunidad
Tuberculosis ⁽²²⁾	50 a 60 años	Microorganismo vivo atenuado
Poliomielitis ⁽²³⁾	Al menos 25 años	Virus inactivado (Salk) Virus activo (Sabin)
Viruela ⁽²⁴⁾	75 años	Virus atenuado

TABLA 1. Comparación de la duración de la respuesta inmune protectora conferida por algunas de las vacunas disponibles.

Así, podemos observar que la capacidad protectora de las vacunas disponibles se basa en su capacidad de inducir la respuesta de anticuerpos de larga duración. La persistencia en la producción de anticuerpos es una de las características de la respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos B. Ésta, junto con la respuesta de linfocitos T son las características más importantes de la respuesta inmune adaptativa.

Vacunas en contra de la Tuberculosis.

En 1921 Albert Calmette y Camilla Guérin describieron la primera vacuna en contra de la tuberculosis que utiliza como plataforma a *Mycobacterium bovis* (BCG). En la actualidad esta vacuna es utilizada a nivel mundial en un programa de vacunación encabezado por la OMS. Esta vacuna proporciona protección en contra de la diseminación, en recién nacidos y niños, sin embargo, no previene el establecimiento de la TB latente o de la reactivación pulmonar en el adulto, por ello hasta hoy su eficacia es bastante variable.²⁵

En el rápido desarrollo de vacunas y el mejoramiento de las ya existentes en contra de la Tb se busca establecer una correlación con la inmunidad protectora, que puede manifestarse por la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno específicas que secreten INF- γ , IL-12 y TNF- α , la expresión de marcadores fenotípicos de células T tales como CD69, MIP1 β , CD45RA, CD27; marcadores de memoria como CD127 (receptor de IL-12) y marcadores citotóxicos como FasL (CD95L), CD107a/b y CD3/4/8

26

Existen dos potenciales estrategias para el desarrollo de vacunas y programas de vacunación en contra de la tuberculosis: 1) la vacunación profiláctica, es decir, antes de la exposición al patógeno, que tiene por objeto estimular la respuesta inmune para que controle la subsecuente infección de manera más eficiente que la respuesta inmune generada durante la infección sin vacunación y 2) la vacunación terapéutica, es decir, después de la exposición al patógeno.²⁷

En este desarrollo se encuentran diversas estrategias, que sugieren utilizar: cepas de BCG recombinantes (rBCG), cepas de *M. tuberculosis* atenuadas, subunidades del patógeno, o bien empleando vectores virales y DNA desnudo. En la actualidad existen vacunas experimentales en contra de la tuberculosis que se resumen en la Tabla 2²⁸.

Tabla 2. Resumen de los trabajos en la generación de nuevas vacunas en contra de la tuberculosis.

Vacuna	Descripción	Etapas de desarrollo
rBCG30	BCG Tice diseñada para sobre expresar Ag85B	Fase 1 de prueba en US, completada en 2004, sin acontecimientos adversos graves.
rBCG-Areas 403.	BCG Danish que escapa del endosoma y sobre expresa varias proteínas incluyendo Ag85A, Ag85B y TB10.4	Estudios pre-clínicos en curso y producción bajo buenas prácticas de manufacturación. (BPM). Fase clínica 1 de prueba.
rBCG\squareUre:CHly⁺	BCG Pasteur que escapa del	Estudios pre-clínicos en curso y

	endosoma.	producción bajo buenas prácticas de manufacturación. (BPM). Fase clínica 1 de prueba.
BCG::RDI	BCG Pasteur con reintroducción del locus RD-1 que contiene antígenos de protección.	Estudios pre-clínicos en curso.
BCG pro-apoptotica.	BCG Tice con la actividad de la enzima superóxido dismutasa disminuida.	Estudios pre-clínicos en curso.

Vacunas con micobacteria viva: Modificando a *Mycobacterium tuberculosis*.

<i>M. tuberculosis</i> PhoP	Depleción del gen de virulencia asociado a phoP de la cepa Mtb MT 103.	Estudios pre-clínicos en curso y producción por buenas prácticas de laboratorio.
<i>M. tuberculosis</i> <i>mc²6030</i>	Cepa Mtb H37Rv con depleción de los locus panCD y Rd-1	Estudios pre-clínicos en curso y producción bajo buenas prácticas de manufacturación. Fase clínica 1 de prueba.
<i>M. tuberculosis</i> <i>mc²6020</i>	Cepa Mtb H37Rv con depleción de los locus lysAy panCD.	Estudios pre-clínicos en curso y producción bajo buenas prácticas de manufacturación. Fase clínica 1 de prueba.

Vacunas de subunidades.

Mtb72F	Proteína de fusión recombinante (Mtb39 y Mtb32) con AS02A y AS01B como adyuvantes.	Fase 1 de prueba completada en US y Europa, sin acontecimientos adversos graves; pruebas adicionales en curso en Europa.
Hybrid-1(85B-ESAT-	Fusión recombinante de	Fase clínica 1 de prueba

6)	Ag85-ESAT-6 con IC31 como adyuvante.	comenzada en 2005.
HyVac-4 (Ag85-TB10.4)	Fusión recombinante de Ag85-TB10.4 en IC31 como adyuvante.	Estudios pre-clínicos en curso y producción bajo buenas prácticas de laboratorio. Fase clínica 1 de prueba
Proteínas de Choque térmico.	Proteínas de BCG asociadas con proteínas de choque térmico purificados.	Estudios pre-clínicos en curso.
DNA desnudo y vacunas con vectores virales.		
Hsp65 (GroEL) DNA	Antígeno conservado de <i>Mycobacterium leprae</i> por inmunoterapia.	.
MVA85A	Cepa atenuada de vacinia (virus vacinia modificado) expresando Ag85.	Fase clínica 1 de prueba completada; sin eventos adversos graves reportados.
Aeras 402(Ad35.TB-S)	No replicando Ad35 y expresando múltiples proteínas de Tb incluyendo Ag85, Ag85B y TB10.4	Estudios pre-clínicos en curso y producción bajo buenas prácticas de manufacturación. Fase clínica 1 de prueba
Capsides dobles de RNA unidos.		
Capsides dobles de RNA unidos.	Capsides dobles de RNA codificando antígenos de TB para su liberación oral.	Estudios pre-clínicos en curso

A lo largo de la historia se han desarrollado diversas estrategias para poder generar vacunas que establezcan una respuesta de anticuerpos de larga duración, así como aumentar su seguridad para su uso en humanos, es por ello que en un esfuerzo por disminuir los efectos secundarios asociados a algunos componentes de los microorganismos, o bien al riesgo de recuperación de virulencia cuando se emplean

microorganismos atenuados, se ha optado por la detección, purificación y uso de subunidades de microorganismos. Sin embargo, aunque las vacunas a base de subunidades presentan menos efectos adversos, la inmunogenicidad del antígeno disminuye drásticamente perdiendo la capacidad para generar un estado protector de larga duración. Para poder compensar esta desventaja se ha recurrido al empleo de adyuvantes, cuya principal función es incrementar la inmunogenicidad de la preparación vacunal.²⁷

4.2 Adyuvantes.

El término adyuvante se deriva del latín *adyuvare* que significa ayudar, inmunologicamente se consideran como compuestos que son capaces de incrementar y mejorar la respuesta inmune en contra del antígeno con el cual son co-administrados.²⁹ La idea de que algunos compuestos son capaces de mejorar la respuesta inmune, fue reconocida hace ya varios años con el trabajo de William Goley, quien utilizó productos de bacterias para el tratamiento de pacientes con cáncer. Posteriormente Ramon y cols describieron que la inflamación local causada por componentes bacterianos correlacionaba con un incremento en el título de anticuerpos, con lo que acuñó el término de adyuvante para describir a los compuestos que incrementaban la respuesta de anticuerpos en contra del antígeno. En trabajos posteriores Ramon y Goley utilizaron hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) para mejorar la respuesta de caballos y cobayos en contra del toxoide tetánico.³⁰

En el desarrollo de adyuvantes se busca que estos sean seguros e incrementen la inmunogenicidad in vivo de los antígenos con los que son coadministrados, estos compuestos han representado un componente importante de muchas de las vacunas exitosas, particularmente las basadas en subunidades de patógenos purificadas y antígenos recombinantes. Debido a su crucial función inmunoreguladora, la obtención de nuevos compuestos con propiedades adyuvantes, está estrechamente ligado al desarrollo de nuevas vacunas más eficientes y seguras.³¹

Los adyuvantes pueden estar incorporados al antígeno o son administrados

simultáneamente con él. ³²Estos compuestos constituyen una familia muy heterogénea, que pueden ser clasificados tomando en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica y deben cumplir con ciertos requisitos para su empleo en vacunas destinadas a humanos, los cuales raramente se cumplen lo que limita la incorporación de adyuvantes efectivos en la vacunación. [Tabla 3].

Tabla 3. Propiedades requeridas en un adyuvante.
No ser tóxico o tener una toxicidad insignificante a la dosis y rango para establecer su efecto adyuvante.
Estimular una fuerte respuesta inmune humoral y/o de células T.
Proveer una buena memoria inmunológica o inmunidad de larga duración
No inducir autoinmunidad
No ser mutagénico, carcinogénico o teratogénico
No ser pirógeno.
Ser estable bajo un rango amplio de tiempo de almacenamiento, temperatura y pH.

Tabla 3. Características que debe cumplir un adyuvante para poder ser empleado en preparaciones vacúnales para uso en humano.

El mecanismo de acción de los adyuvantes ha sido objeto de numerosos estudios. De acuerdo con evidencia experimental se consideran tres principales mecanismos mediante los cuales un adyuvante puede ejercer su efecto: a) la formación de depósitos de antígeno, a través de los cuales es liberado lentamente para favorecer la producción de anticuerpos, b) efecto sobre células presentadoras de antígeno (APC), induciendo su reclutamiento, activación y subsecuente presentación de antígeno, generando la maduración de células dendríticas, inducción de inflamación y la sobre-expresión de moléculas coestimuladoras; estos eventos mejoran la respuesta de células T y B al antígeno. Algunos adyuvantes pueden afectar directamente la respuesta natural de células T CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos B, promoviendo su proliferación y/o conversión a células de memoria que es esencial para el éxito de vacunas, o bien influyendo en la polarización hacia una respuesta tipo Th1 o Th2. c) la conversión de antígeno soluble en particulado, para que sea fagocitado por las APC's como macrófagos, células dendríticas y células B. ^{33,34}

Diversos receptores sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno, pueden ser blanco de adyuvantes. Es conocido que el inicio de la respuesta por los linfocitos T requiere de tres señales principales. Los adyuvantes pueden ejercer su efecto sobre estas señales de forma directa o indirecta. La señal 1 ocurre de la interacción entre el linfocito T a través de su TCR y la célula presentadora de antígeno al presentar el péptido del antígeno en un contexto de moléculas MHC clase I o clase II, por lo tanto aquellos adyuvantes que favorezcan la captación del antígeno (liposomas, microesferas y algunas emulsiones) por las APC's, pueden actuar sobre esta señal, al incrementar la presentación del antígeno a las células T. La señal 2 se da por medio de moléculas coestimuladoras, mediada por la interacción entre moléculas como B7 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas en las APC's y la molécula CD28 presente en los linfocitos T, algunos adyuvantes incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras, influyendo directamente en la señal 2, que es absolutamente necesaria para la eficiente activación de los linfocitos T. La señal 0 esta mediada por el reconocimiento de PAMP's a través de PRR como los receptores tipo Toll (TLR's). Los receptores tipo Toll son proteínas transmembrana con un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina y un dominio citoplasmático similar al dominio del receptor de IL-1

Los TLR's inducen principalmente la ruta de señalización para la activación del factor nuclear kb (NF-kb), que resulta en la expresión de genes para la producción de diversas citocinas, los adyuvantes que actúen como agonistas de TLR's pueden influir sobre la señal 2 al activar a las célula presentadora de antígeno.

Recientemente los estudios realizados han demostrado que un mecanismos importante mecanismos a través del cual actúan los adyuvantes, es por su capacidad de activar a la respuesta inmune innata, es decir, al estimular a las células del sistema inmune innato estas liberan factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos, lo que tiene como consecuencia una mejor activación de los linfocitos T y B.

Muchos agentes con actividad adyuvante como la endotoxina de bacterias, adyuvante completo e incompleto de Freund, CpG bacteriano, monofosforil lipido A, MF59 α -galactosilceramida, incrementan la inmunogenicidad a través de la inducción de maduración de células dendríticas³⁴.

La adecuada elección de un adyuvante determinara si el efecto producido es benéfico, insuficiente o dañino.⁹ Actualmente son pocos los adyuvante con los que se cuenta para su uso en humanos, en America se encuentra licenciado la alumina (1926), mientras que en Europa se han aprobado tres más: MF59, AS05 y Alumina+ MPL.

En 1916, Le Moignie y Pinoy reportaron que la emulsión de aceite mineral incrementaba la respuesta inmune en contra del antígeno con el cual se coadministraba³⁶, posteriormente con la combinación de este aceite y restos de micobacterias muertas surgió el adyuvante completo de Freud (FCA) que ha sido utilizado durante más de 50 años en la producción de antisueros en animales y es empleado con frecuencia cuando se disponen de cantidades limitadas de antígeno o cuando presenta baja inmunogenicidad en modelos animales, sin embargo su elevada toxicidad es una gran limitante para su uso en humanos; en la actualidad se esta restringiendo su uso en animales de laboratorio dado el creciente interés por garantizar su bienestar.

La preparación de aceite en agua MF59 es un adyuvante permitido en Europa observando que promueve una respuesta de anticuerpos y una predominante respuesta Th2.

QuilA es un extracto soluble del árbol *Quillaja saponina*, que contiene múltiples saponinas, aunque es efectivo, es bastante toxico, causando severas reacciones locales como granulomas y hemolisis. QS21 es menos toxico que QuilA y genera una eficiente respuesta Th1 y de células T CD8+, sin embargo esta respuesta es más exitosa cuando es combinado con el adyuvante AS02, que es una formulación compuesta por la emulsión aceite en agua MF59.

La Alúmina (hidróxido de aluminio [Al (OH)₃]) es el único adyuvante licenciado para su uso en humanos, fue introducido por Glenny en 1926, sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ejerce su efecto adyuvante aun no han sido dilucidados. La alúmina es efectiva en la inducción de una respuesta tipo Th2 y la producción de citocinas como IL-4, IL-5, así como una respuesta inmune humoral caracterizada por la producción de IgE e IgG1. Esta situación puede significar un gran obstáculo en la incorporación de este adyuvante en vacunas en contra de enfermedades como HIV/SIDA, tuberculosis y malaria en donde su control depende de una respuesta inmune tipo Th1.³⁷.

Por lo anterior actualmente el criterio más importante para la elección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad ³⁴ En la actualidad el número de sustancias con propiedades adyuvantes va en aumento, sin embargo, sólo un reducido número cumple con las características necesarias para su aplicación al hombre, este hecho se debe principalmente a la evaluación de la relación eficiencia/seguridad que ofrece cada adyuvante.

Estudios recientes han demostrado que los virus vegetales son herramientas efectivas para la expresión de antígenos de patógenos de interés en vacunación. Tal es el caso del virus del mosaico de la papaya [PapMV].

4.2.2 Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi .

S. typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram-negativo, móvil, de flagelos peritricos, mide de 2-3 tres micras, anaerobio facultativo, intracelular ³⁸. En su membrana externa se encuentra un grupo de proteínas denominadas proteínas de membrana externa (Omps), las cuales forman canales o poros que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas con límite de exclusión de solutos aproximadamente de 600Da. Estas proteínas transmembranales se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas de forma cilíndrica semejante a un barril y cada homotrímero es muy estable a la acción de detergentes y proteasas ³⁹.

Cada subunidad consiste de 16 hojas β -plegadas antiparalelas unidas por asas con algunas α - hélices intercaladas. Cada monómero expone ocho asas cortas hacia el espacio periplásmico y ocho asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. La forma cilíndrica que caracteriza a las porinas se presenta al cerrarse las estructuras β -plegadas de manera pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1 ⁴⁰ La estructura del trímero se forma mediante el entrecruzamiento de regiones hidrofóbicas de las vueltas β -15 y β -16, donde los diez residuos carboxilo de la región β -16, en particular el último (una fenilalanina conservada en las porinas) son esenciales para el ensamblaje correcto y estabilidad de las porinas.

En *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se han identificado las porinas OmpC y OmpF y OmpD solo presente en *S. typhimurium*. En condiciones de laboratorio *S. typhi* sintetiza OmpC y OmpF ⁴¹.

La cantidad de porinas presente en la membrana externa es relativamente constante aproximadamente de 2×10^5 siendo además una de las proteínas más abundantes en términos de masa que pueden llegar a representar hasta un 2% de las proteínas totales en la célula ⁴². Se ha señalado que la cantidad relativa de las porinas, son reguladas por las condiciones del medio como son la osmolaridad, temperatura, concentración de fosfatos y disponibilidad de oxígeno ⁴³.

4

.2.2.1 La porina OmpC como inmunogenos.

Las proteínas de las bacterias Gram-negativas se han utilizado como acarreadores para mejorar la respuesta inmune a diferentes antígenos.^{44,45}. Durante la interacción con el hospedero, las porinas de gran parte de las bacterias Gram-negativas, incluyendo *Salmonella*, activan al sistema inmune tanto innato como adaptativo y tienen actividades biológicas diversas en diferentes células eucarióticas.

Las porinas de *S. typhimurium* inducen aumento de TNF α , interleucina 1 α (IL-1 α) de interleucina 6 (IL-6) en monocitos humanos y de IFN- γ e interleucina 4 (IL-4) en linfocitos humanos. Inducen aumento de NO en macrófagos peritoneales de ratón tratados con IFN- γ ⁴⁶. Utilizando células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y células de sangre periférica humana se encontró que las porinas pueden estimular la migración de leucocitos a través del endotelio y tienen influencia en el aumento de la expresión de B7-2 en los linfocitos B.⁴⁷.

Galdiero *et al* reportaron que las porinas de *S. typhimurium* activan los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en la línea celular U937⁴⁸, a través de la vía de señalización de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK), participando de manera muy importante p38. Esta activación es diferente en tiempo y elementos a la activación generada por el LPS en la misma célula, mediante la utilización de inhibidores⁴⁹. Estudios en ratones demostraron que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. typhi*⁵⁰. También se demostró que estas proteínas son el blanco no sólo de los anticuerpos sino también de linfocitos T en humanos que se recuperan de la enfermedad y en individuos vacunados con la cepa atenuada Ty21a. Resultados obtenidos en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio⁵¹ indican que la vacuna oral de Germanier induce respuesta inmune celular contra porinas probablemente debida a una infección autolimitada producida por la cepa Ty21a capaz de generar protección a través de respuestas celulares y humorales similares a aquellas que se generan en pacientes convalecientes de fiebre tifoidea. Estos resultados también muestran que las porinas son buenos inmunógenos y que funcionan como blanco de la respuesta inmune.

Se ha caracterizado la respuesta inmune humoral inducida por OmpF y OmpC y se observó que ambas inducen la producción de altos títulos de anticuerpos, de larga duración y de todos los isotipos, posteriormente se caracterizó la funcionalidad de los mismos por medio de ensayos de fijación de complemento y neutralización en los cuales se encontró que los anticuerpos anti-OmpC tienen una mayor capacidad bactericida y que esta se conserva a lo largo del tiempo mientras que para OmpF, no se

obtuvo una respuesta bactericida tan marcada ni de larga duración en cuanto a la capacidad neutralizante, se observó que los anticuerpos inducidos por ambas poseen esta capacidad.

Por ello en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, se diseñó una vacuna a base de porinas de *S. typhi* a la que se le denominó Isipor, que además de inducir la protección, por su naturaleza proteica, es capaz de producir memoria y no requiere de cadena fría por ser estable a temperatura ambiente. Para estudiar los mecanismos de protección inducidos por estas proteínas se identificó y clonó el gen *ompC* de *S. typhi* dentro del plásmido pST13. La porina OmpC de *S. typhi* fue expresada en *E. coli* (UH302) carente de sus propias porinas⁵². La OmpC purificada de esta bacteria fue capaz de conferir protección hasta de un 40% contra el reto con 100 DL50 de *S. typhi* en el modelo del ratón⁵³.

Recientemente Cervantes-Barragan y col describieron la participación de TLR-2 y TLR-4 en la generación de una respuesta de anticuerpos de larga duración, así como la importancia de la activación de estos receptores en la eficiente activación de la respuesta inmune adaptativo.

5.0 Proteína P38

En estudios recientes la proteína de 38 KDa de *Mycobacterium tuberculosis* ha sido reconocida como un antígeno inmunodominante y propuesta como candidato para el desarrollo de una vacuna. Hernández-Pando y cols clonaron la proteína P38 en un plásmido, y la sobre-expresaron en BCG Tice, para producir la vacuna recombinante rBCG38 Tice (RBCG38). Empleando el modelo murido de infección progresiva se encontró que la vacunación con RBCG 38 incrementa la supervivencia de ratones retados con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv o bien la cepa Beijing de *M. tuberculosis* en comparación con la vacunación con BCG Tice. Además se observó una disminución en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) al aislar el pulmón de los ratones vacunados con rBCG38, así como la inducción de una fuerte respuesta celular

tipo Th1, caracterizada por altos niveles de IL-12 e IFN- γ . También se detectó un incremento importante en la producción de anticuerpos de clase IgG2 y IgG1.^{7,28}

6.0 Incidencia global de la tuberculosis.

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa que actualmente constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial; es uno de los tres principales padecimientos infecciosos y el principal del sistema respiratorio. Esta enfermedad es la primera en ser declarada emergencia global por la OMS y de acuerdo con reportes de esta organización es la principal causa de muerte en el mundo provocada por un único agente infeccioso, ocasionando la muerte de 2 millones de personas anualmente, además se estima que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada y que 1,6 millones de personas murieron por Tb en 2005. Sin embargo, la infección permanece latente sin la presencia de síntomas clínicos en el 90% de los individuos y sólo el 10% desarrolla la enfermedad en forma activa dentro de los primeros dos años, sugiriendo que esta población no tiene la capacidad para desarrollar una respuesta inmune protectora que le permita controlar la infección inicial y prevenir el desarrollo de la enfermedad.³ A nivel mundial la región de Asia Sudoriental registró el mayor número de nuevos casos de tuberculosis, correspondiéndole el 34% de la incidencia mundial, sin embargo, la incidencia estimada en el África es casi el doble. En el continente Americano también se aprecia un aumento en el número de casos de alrededor del 13%, presentando los mayores problemas México (49%), la región andina (30%) y Brasil (23%).⁵⁴

La tuberculosis ha sido a lo largo de la historia una enfermedad ligada a la emigración, la desnutrición severa y la pobreza, sin embargo en la actualidad países desarrollados han mostrado un resurgimiento de la enfermedad que se encuentra estrechamente asociado a la epidemia causada por el HIV/SIDA, el cambio radical en el estilo de vida de la población actual y la aparición de cepas multi-farmacorresistentes.⁵⁵

6.1 *Mycobacterium tuberculosis*.

El genero *Mycobacterium* comprende mayoritariamente agentes saprofitos que habitan en el suelo y en su mayoría no son patógenos para el hombre. Los patógenos más importantes del género se agrupan en el complejo ***Mycobacterium. tuberculosis***, integrado por: *M. africanum*, que causa tuberculosis en regiones de África; *M. bovis*, agente causal de tuberculosis en bovinos y cabras; *M. microti* que infecta al ratón, *M. canetti* cuya infección es rara y finalmente *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis en humanos.⁵⁶

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvos, con un diámetro de aproximadamente 0,2-0,7 μm y una longitud de 1-10 μm . La elevada concentración de lípidos en su pared las hace altamente hidrofóbicas y muy resistentes a la acción de agentes químicos. Son microorganismos inmóviles, aerobios o microaerófilos, que no esporulan. Su desarrollo en medios de cultivo es lento y los más empleados son el Lowenstein-Jensen, a base de huevo coagulado, semisintéticos como el Middlebrook 7H9 y medios que son enriquecidos con glicerol al 5%.⁵⁷

6.2 Composición estructural de la envoltura de la micobacteria.

La envoltura de la micobacteria es una estructura compleja que le permite establecer una interacción con su principal célula huésped: el macrófago. Esta interacción es determinante para establecer su destino final en organismo. Además, la protege y le proporciona los mecanismos necesarios para establecer comunicación con el microambiente que la rodea.^{28,56} Los componentes mayoritarios de su envoltura son lípidos asociados a carbohidratos (glicolípidos), fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos sustituidos con ácido micólico y/o péptidos. Las porciones glicosiladas son los componentes más importantes en la interacción con receptores del sistema inmune innato.⁵⁸ Los principales componentes estructurales de la micobacteria son: a) una membrana plasmática unida covalentemente con ácidos micólicos, b) la pared celular y c) una cápsula rica en polisacáridos.

La membrana plasmática tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana (protección osmótica y transporte de iones y moléculas). La bícapa lipídica está asociada a proteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos como fosfatidilinositolmanósidos (PIM), fosfatidilgliceroles, cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas (PE). Sus fosfolípidos están altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana (LAM) y lipomanano (LM).

LAM es un importante lipopolisacárido de la envoltura que se encuentra presente en todas las micobacterias, está formado por un grupo fosfatidilinositol (PI) anclado a la membrana plasmática y unido de forma covalente con arabinomanano (AM). En las cepas patógenas y de crecimiento lento se ha observado que los extremos de LAM terminan en residuos de manosa (ManLAM), a diferencia de los residuos de las especies de crecimiento rápido que terminan en PI (AraLAM).⁵⁹

En la membrana de *M. tuberculosis* se localiza una proteína de 38 KDa, cuya función es transportar fosfatos a través de la membrana y la pared celular de la bacteria. Esta proteína se ha identificado como un antígeno inmunodominante y propuesta como blanco para el desarrollo de una vacuna en contra de la tuberculosis.⁷

La pared celular de la micobacteria se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido de lípidos (50-60%) que le confiere un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. Está formada por una estructura conocida como el esqueleto de la pared celular (mAGP), compuesto por la unión covalente entre peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos.

La cápsula es la capa más externa de la envoltura y constituye la interfase entre la bacteria y la célula huésped. La cápsula controla los componentes que pueden llegar hasta el interior de la micobacteria, la protege del ataque de agentes antimicrobianos y participa de manera importante en la modulación de la respuesta inmune del huésped.

Se compone de ácidos micólicos, glucano, polisacáridos y glicolípidos. Algunos lípidos como PIM y PI que se encuentran mayoritariamente en la membrana también se pueden encontrar en la cápsula.⁶⁰

6.3 Formas clínicas de la Tuberculosis.

Debido a que *M. tuberculosis* ingresa al organismo principalmente por la vía respiratoria, la infección se localiza generalmente en el pulmón; sin embargo, puede producirse una diseminación hematogena. De acuerdo con lo anterior la Tb se clasifica en pulmonar y extrapulmonar. Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son en los ganglios linfáticos, pleura, sistema genitourinario, sistema osteoarticular, meninges y peritoneo. Durante las primeras fases de la enfermedad, los signos y síntomas suelen ser inespecíficos y consisten principalmente en fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, anorexia y debilidad, posteriormente se presenta tos y expectoración purulenta.⁶¹

6.4 Diagnóstico.

El diagnóstico de la tuberculosis está basado fundamentalmente en la identificación bacteriológica del bacilo tuberculoso, el análisis radiológico y la aplicación de la prueba de la tuberculina (PPD).

La baciloscopia consiste en la detección de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, esta ha sido una herramienta importante para la detección del bacilo y por lo tanto para el diagnóstico de la Tb en el laboratorio clínico, sin embargo, debido a que todas las especies de micobacterias son ácido alcohol resistente, una prueba positiva no es evidencia suficiente para establecer la identidad de *M. tuberculosis*. Es por esto que, después de la detección de bacilos BAAR, es necesario realizar el aislamiento del bacilo en un medio de cultivo.

La realización de pruebas bioquímicas como: acumulación de niacina, reducción de nitratos, actividad piraziamidasa, resistencia a la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (THC) y actividad catalasa son útiles para establecer el diagnóstico de la enfermedad. El PPD no se describe como positivo en todos los pacientes infectados, los resultados de la prueba dependen del tamaño de la reacción en la piel y del paciente que está siendo examinado. Lamentablemente, ésta no es una prueba perfecta y es posible que hasta el 20% de las personas infectadas con tuberculosis no desarrollen una reacción en la prueba cutánea de PPD. Además, algunas condiciones médicas que afectan el sistema inmunitario, como cáncer, quimioterapia reciente, SIDA en etapa terminal, pueden provocar un resultado falso negativo en la prueba o bien la presencia de un estado de anergia en el paciente. La radiografía de tórax es un método más sensible para detectarla tuberculosis pulmonar pero, por su inespecificidad debe complementarse siempre con el examen bacteriológico del esputo.⁶²

Las pruebas bioquímicas tradicionales han sido reemplazadas por técnicas moleculares de identificación como la hibridación ADN-RNA, las sondas de DNA y la amplificación de secuencias específicas (PCR). Las técnicas de amplificación pueden detectar un número de bacilos inferiores a los niveles mínimos detectados por cultivo a partir de una muestra bacteriológica, mediante estas técnicas se ha logrado una identificación rápida, sensible y específica de *M. tuberculosis*.

6.5 Tratamiento de la tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis se caracteriza por ser un microorganismo de crecimiento lento y establecer periodos de la latencia con actividad metabólica limitada en el huésped lo que dificulta la acción de los fármacos para su tratamiento. La micobacteria da origen a poblaciones heterogéneas y mutantes naturales. Se debe utilizar por lo tanto, una terapia combinada para evitar la selección de estos mutantes resistentes. La tuberculosis tiene un tratamiento eficaz que asegura, en casos no complicados, una tasa de curación del 95%, sin embargo el régimen terapéutico es muy estricto, prolongado y costoso. Un problema importante se produce cuando varios fármacos administrados durante un período prolongado de tiempo ocasionan un elevado grado de

incumplimiento teniendo como principal consecuencia la generación de micobacterias multifarmacorresistentes. (MRS). La decisión de iniciar la quimioterapia antituberculosa se debe basar en datos epidemiológicos, clínicos, radiológicos y microbiológicos.⁶³

Los fármacos para el tratamiento de la Tb se clasifican en 2 grupos (primera y segunda línea) en función de su eficacia, potencia, toxicidad y tolerancia. Actualmente los fármacos de primera línea son: isoniacida (H), rifampicina (R), piracinamida (Z), etambutol (E) y estreptomina (S)

El tratamiento de cepas de *M. tuberculosis* resistente a múltiples fármacos es un problema clínico de distribución mundial, y supone una dificultad añadida para el control sanitario de la enfermedad. Esta situación se debe principalmente a que la población que se encuentra más afectada con la enfermedad no cuenta con una infraestructura de salud adecuada y los recursos económicos para costear un tratamiento tan prolongado y costoso. La Tb-MR se refiere a la enfermedad producida por cepas resistentes a dos o más fármacos de primera línea, habitualmente isoniacida y rifampicina.

El tratamiento de la tuberculosis va más allá de la prescripción correcta de fármacos. El cumplimiento adecuado del mismo es la piedra angular del control de la enfermedad. El cumplimiento de un programa de tratamiento de la tuberculosis requiere de una asistencia sanitaria accesible y apropiada.

6.6 Respuesta inmune innata y adaptativa del huésped contra la infección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular que persiste en los macrófagos alveolares ubicados en el pulmón. La principal vía de infección es aérea, resultado de la inhalación de micro-gotas de secreciones respiratorias de individuos infectados que contienen al bacilo, considerado altamente patógeno pues se ha estimado que 3-10 bacterias son suficientes para iniciar la infección en un individuo sano.⁶⁴

Uno de los eventos más importantes en desarrollo de la infección es la capacidad del microorganismo de infectar, diseminarse y persistir en un estado latente.⁶⁵ La mayor parte de los componentes estructurales de la micobacteria son reconocidos por receptores presentes en la superficie del macrófago, algunas de estas estructuras son las responsables de los mecanismos de evasión del patógeno. La defensa efectiva del huésped depende de una coordinada respuesta de células del sistema inmune innato y adaptativo.^{59,66.}

El control de la infección requiere principalmente del desarrollo de una respuesta inmune celular tipo Th1. Este tipo de respuesta incluye la participación de los macrófagos alveolares, linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18 y TNF- α . Aunado a esto las quimiocinas RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8, juegan un papel importante en la migración de diferentes poblaciones celulares al sitio de infección. En la infección crónica se ha observado que pacientes con deficiencias en la secreción de IFN- γ y TNF- α , presentan mayor susceptibilidad a sucumbir por la infección.⁶⁷⁻⁶⁹

6.7 Respuesta inmune innata.

En el espacio alveolar los mecanismos de defensa de la inmunidad innata involucran diferentes células: macrófagos alveolares (MA), células dendríticas (DC), neutrófilos, células epiteliales, así como factores solubles: mucina, lisosima, lactoferrina, proteínas surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A, y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren en contacto con el tracto respiratorio.

La fagocitosis de *M. tuberculosis* es llevada a cabo por los MA a través de diversos mecanismos. La compleja superficie de la micobacteria y el micro-ambiente generado durante la infección le permiten interactuar con receptores expresados en los macrófagos tales como: receptores del complemento (CRs), el receptor de manosa, receptores scavenger y receptores de Fc, dando como resultado una eficiente internalización de la micobacteria.

La inflamación es un evento crítico que se produce durante la infección, es mediada por citocinas, que son secretadas por el macrófago para reclutar a las células del sistema inmune en el sitio de la infección. Se ha considerado que ciertas citocinas son cruciales para controlar la infección, entre las más importantes se encuentran: ⁷⁰

La interleucina-12 (IL-12) es una citocina producida en la etapa temprana de la infección y su principal fuente son: monocitos, macrófagos y células dendríticas. Constituye un potente inductor de la producción de IFN- γ por linfocitos T y células NK., además de incrementar la proliferación de linfocitos T CD 4⁺ y favorecer la expansión clonal de linfocitos Th1. Incrementa la citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ y células NK. ^{57,71}

El interferón-gama (INF- γ) es muy importante en el control de la infección por *M. tuberculosis*, su principal fuente son: los linfocitos T, células NK, y macrófagos. El IFN- γ induce la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, acidificación del fagosoma, fusión fagosoma-lisosoma, aumento en la expresión de moléculas MHC clase II involucradas en la presentación de antígeno, aumento de la fagocitosis, induce la producción de IL-12 y la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). La interacción de IFN- γ con su receptor (IFNR) activa los mecanismos bactericidas del macrófago y la sobre expresión de moléculas co-estimuladoras. En la Tb pulmonar humana existe una correlación entre la producción de IFN- γ y las manifestaciones clínicas de la enfermedad; mientras más severa es la enfermedad, las células mononucleares de sangre periférica producen niveles más bajos de IFN- γ . ⁷²

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) es producido principalmente por los monocitos, MA y linfocitos T activados, actúa en forma sinérgica con el IFN- γ para inducir la expresión de la enzima iNOS. Una de las funciones más importantes del TNF- α es la de inducir la formación del granuloma, que constituye un mecanismo para evitar la diseminación de la infección. ⁷³ Ratones knock out para TNF α son incapaces de controlar la infección con cepas virulentas de *M. tuberculosis*, y sucumben rápidamente

por diseminación de la micobacteria, sin embargo los pacientes tuberculosos padecen de caquexia debido a los altos niveles de TNF α .^{59,73}

6.8 Receptores tipo Toll (TLRs) en el reconocimiento de *M. tuberculosis*.

Las células del sistema inmune innato son capaces de identificar microorganismos invasores a través de receptores de reconocimiento de patrón codificados en línea germinal (PRRs), que reconocen elementos estructurales conservados sobre la superficie de microorganismos conocidos como Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).⁷⁴

Los receptores tipo Toll, son un tipo de PRR que han sido conservados a lo largo de la evolución en células como: macrófagos, células dendríticas y linfocitos B.^{75,75} El lipoarabinomano, las lipoproteínas de 19kDa y 33 kDa, glicoproteínas y manosilfosfatidilinositol son reconocidos por estos receptores, resultando en la activación de las células del sistema inmune que conducen al establecimiento de mecanismos efectoros para combatir a la micobacteria. En la infección con *M.tuberculosis* la señalización se da principalmente a través de TLR2 en asociación con TLR1/TLR6, y por TLR4; actualmente no existe evidencia de la señalización a través de otro TLR.³⁰

6.9 Respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa es específica y su eficiente establecimiento y evolución durante la infección depende en gran medida de la correcta activación de la inmunidad innata. La inmunidad celular en la Tb es generada cuando los linfocitos T CD4⁺ (TcR $\alpha\beta$) reconocen antígenos proteicos de *M. tuberculosis* presentados por los macrófagos alveolares o por células dendríticas en contexto de moléculas MHC clase II. Estos antígenos provienen del fagosoma, el cual constituye el hábitat preferido de la micobacteria. Los linfocitos T CD4⁺ son activados y producen IFN- γ que a su vez activa a los MA induciendo mecanismos bactericidas para eliminar a la micobacteria.⁷⁶

La IL-1 producida por MA, promueve la secreción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2, con la subsecuente expansión clonal de linfocitos T CD4⁺. La reacción inmunitaria mediada por las células T CD4⁺ controla la diseminación y mantienen un estado de latencia.⁷⁷ Polipéptidos de bajo peso molecular de *M. tuberculosis* son liberados del proteasoma, y presentados en contexto de moléculas MHC clase I, que son blanco dominante del reconocimiento de linfocitos T CD 8⁺, que mediante mecanismos efectores citotóxicos actúan sobre las células infectadas. Otra población de linfocitos que tiene una función importante en la Tb son los linfocitos T $\gamma\delta$. La subpoblación V γ 9+V δ 2+ de linfocitos T $\gamma\delta$ ha sido implicada en la respuesta inmunitaria protectora contra *M. tuberculosis* por producir citocinas que tienen la capacidad de matar a MA infectados, mediante mecanismos de citotoxicidad.⁷⁸

6.10 Granuloma

En un intento por contener la infección, células T y macrófagos se organizan dentro de una estructura clásica de la tuberculosis denominada granuloma. Esta estructura es mantenida y estabilizada por el huésped y la bacteria. El granuloma maduro ha sido caracterizado morfológicamente y consiste en un núcleo central de necrosis rodeado por capas concéntricas de macrófagos, linfocitos T y macrófagos que se fusionan para dar origen células multinucleadas denominadas células gigantes. En este sentido el granuloma representa un claro ejemplo de un delicado balance que mantiene la infección en latencia, en donde el huésped no presenta síntomas y la bacteria puede vivir.⁵⁶

6.11 Mecanismos de evasión.

La micobacteria ha desarrollado mecanismos para: 1) asegurar su entrada dentro de los macrófagos, 2) evadir la respuesta celular y los mecanismos microbicidas después de su entrada en el macrófago y 3) modular la función efectora en la respuesta inmune celular.

La cápsula de las micobacterias patógenas influye notablemente en la resistencia a los mecanismos de defensa del huésped. Se presume que el contenido lipídico de la cápsula impide, la degradación de la bacteria por las enzimas del huésped y debido a su impermeabilidad, impide el contacto de las enzimas con las estructuras bacterianas para poder ser degradadas.

El LAM de cepas virulentas interfiere con la producción de IL-12 por células dendríticas y macrófagos. También se sabe que la entrada de la micobacteria a través del receptor de manosa inhibe la acción de la NADPH-oxidasa y como consecuencia anula el estallido respiratorio, uno de los mecanismos microbicidas más importantes del macrófago.⁷⁹

In vitro el receptor 3 del complemento (CR3) está involucrado en la fagocitosis de la micobacteria. La captación a través de este receptor ocurre de forma dependiente de colesterol, permitiendo introducir a la micobacteria sin activar al macrófago. Otra función importante del colesterol es su participación en la asociación con la proteína Coronin1 (P57 o TACO Tryptophan Aspartate Containing Coat) del hospedero que está involucrada en la prevención de la maduración del fagosoma.⁵⁶ El proceso de maduración del fagosoma se refiere a los eventos fisiológicos a través de los cuales el material fagocitado, es transportado al lisosoma, en donde es degradado. Sin embargo, en el caso de la tuberculosis la micobacteria inhibe la fusión fagosoma-lisosoma, evitando entrar en contacto con las proteasas ácidas y los mecanismos bactericidas que conducirán a su degradación y posterior presentación de antígenos a células T.⁵⁶

PI3P es un lípido regulador del tráfico en la membrana. Esta molécula es ligando de proteínas que contienen dominios FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p y EEA1) o PX que han demostrado tener un papel importante en la fusión fagolisosomal, además, regula la maduración del fagosoma a través de la elevación de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, esto estimula a la PI3P-cinasa, que a su vez regula la concentración de PI3P en la membrana del fagosoma.

M. tuberculosis puede inhibir la generación de PI3P, a través de LAM, o bien al producir la fosfatasa ácida (SapM) que lo degrada ⁵⁶

Actualmente se han identificado 11 proteínas cinasas (PkC) en el genoma de la micobacteria, dos de las cuales presentan gran homología con proteínas cinasas de eucariontes, que corresponden a PknG y Proteíncinasa. PknG es secretada al citosol del macrófago inhibiendo la fusión del lisosoma con el fagosoma; la depleción del gen *PknG*, reveló que las micobacterias son totalmente susceptibles a ser transportadas y entregadas al lisosoma.

Componentes del complejo antigénico85, específicamente las proteínas de 30-31 kDa inducen la secreción de TNF- α por los monocitos, que puede explicar parte de las manifestaciones de la patología como la formación de granulomas, fiebre y caquexia. El Factor Cordón o Trehalosa 6,6´dimicolato, que forma parte de la cápsula actúa sobre las mitocondrias inhibiendo la respiración y la fosforilación oxidativa e inhibe la migración de leucocitos polimorfonucleares.

La micobacteria tiene un requerimiento obligado de Fe para sobrevivir, mientras que los MA requieren de hierro (Fe^{3+}) como cofactor en la inducción de mecanismos bactericidas, lo cual establece una competencia entre la célula huésped y *M. tuberculosis* por la adquisición de Fe.

o

Planteamiento del problema.

En la actualidad más de un tercio de la población mundial es afectada por la TB. Actualmente no se cuenta con una vacuna eficiente profiláctica o terapéutica que permita controlar la enfermedad. La proteína p38 se ha propuesto como un candidato a vacuna contra esta enfermedad, sin embargo, el uso de sub unidades como estrategia de vacunación requiere generalmente el uso de adyuvantes en estas preparaciones, por lo que en este estudio se plantea el uso de la porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante de esta vacuna experimental.

Justificación.

Aunado al desafío de generar una vacuna eficiente en contra de la Tb, persiste la necesidad de mejorar la seguridad y capacidad protectora de las experimentales y las ya existentes. En nuestro laboratorio hemos caracterizado las propiedades adyuvantes de la porina OmpC sobre antígenos modelo y su eficiente contribución en la activación de la respuesta inmune. Con base en lo anterior consideramos que al coadministrar la proteína P38 reconocida como un antígeno inmunodominante de *M. tuberculosis* y la porina OmpC se promoverá un ambiente de citocinas adecuado que permita inducir y potenciar la respuesta en contra de P38.

Hipótesis.

La porina OmpC generará un efecto adyuvante sobre la vacuna experimental en contra de Tb elaborada con la proteína P38.

Objetivo general:

1. Estudiar la capacidad adyuvante de la porina OmpC sobre la vacuna experimental contra de la tuberculosis hecha con la proteína P38 de *M. tuberculosis*.

Objetivos particulares:

1. Evaluar en ratones si la porina OmpC incrementa la respuesta de anticuerpos específicos contra la P38 de *M. tuberculosis*.
2. Caracterizar la sobreexpresión de moléculas de coestimulación y marcadores de activación generado por la inmunización con la P38 de *M. tuberculosis* y la inmunización de ésta con la porina OmpC.

MATERIALES Y METODOS.

- **Biológicos.**

Salmonella typhi STYF302

- **Obtención de la Porina OmpC a partir de la cepa STYF302 de *S. typhi*, a través del método de Nikaido modificado.**

Se cultivó *S. typhi* STYF302 en 10 L de medio mínimo A (70g K₂HPO₄, 30g KH₂PO₄, 10g (NH₄)₂SO₄, 5g citrato de sodio, 10g extracto de levadura, 50g glucosa, 0.1% MgSO₄) hasta obtener una densidad óptica de 1.0 a 540 nm que corresponde a la fase logarítmica tardía del crecimiento de la bacteria. Se cosechó centrifugando a 7,000 rpm 15 minutos a 4°C, y se lavó 2 veces con una solución de Tris-HCl 0.05M (pH 7.7). La pastilla bacteriana se pesó y se resuspendió en solución de Tris-Cl 0.05M (pH 7.7) hasta obtener 50 mL de suspensión bacteriana. Se rompió la bacteria en un molino Dyno-mill y la suspensión se centrifugó a 7,000 rpm 30 minutos a 4°C .

El sobrenadante se retiró y se trató con 25µL de DNAsa 10000 U/mL y 25µL de RNAsa 10000 U/mL y 2.77 mL de solución de MgCl₂ 1M por cada 10g de biomasa húmeda obtenida de la cosecha, por 30 minutos a 37°C 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 100ml 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 primer pico obtenido en el cromatograma y se dializó en PBS pH 7.2 durante 4 días para eliminar el SDS.

La porina de *Salmonella typhi* (OmpC) se purificó de acuerdo al **método de Nikaido modificado**. La cepa de *Salmonella typhi* STYF302 (OmpF-) se empleó como fuente de la porina OmpC.

- **Proteína P38 de *Mycobacterium tuberculosis*.**

La proteína P38 fue proporcionada por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

- **Animales de experimentación.**

Ratones BALB/c (Harlan, Mexico) de 6–8 semanas de edad, se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SFP) en las instalaciones del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Los estudios fueron aprobados por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (Project No. 2005-785-016).

- **Inmunizaciones.**

Grupos de ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas fueron inmunizados vía intraperitoneal o subcutánea con 10µg de proteína P38 o co-administración de P38 + OmpC (10µg). Los ratones control recibieron solución salina isotónica (SSI) Muestras de sangre se colectaron en los días 0, 4, 12, 20, 30 obteniendo el suero. Las muestras individuales de suero se congelaron a -20 °C hasta su análisis. El título de anticuerpos específicos anti-P38 de clase IgG total e IgM se determinó por el método de ELISA.

- **Determinación del título de anticuerpo por el método de ELISA.**

Se fijaron placas de 96 pozos con 100µL de solución de antígeno (1µg/pozo) en solución amortiguadora de carbonatos pH 9,5, incubando 1 hora a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Se realizaron 4 lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1%. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con solución PBS pH 7.4-BSA 2%, incubando 1 hora a 37°C, seguido de 4 lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1%. Se adicionaron diluciones seriadas en factor de 2, iniciando con dilución 1/40 de los sueros inmunes (100µl/pozo), incubando 1 hora a 37°C. Después de 4 lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1% se adicionó a cada pozo 100µL de una dilución 1:100 en solución de bloqueo del anticuerpo secundario (HRP anti-IgM, HRP anti-IgG), incubando 1 hora a 37°C se realizó una última serie de lavados con solución H₂O destilada-Tween20 0.1%. Para la detección se agregó a cada pozo 100µL de solución de revelado (TMB peroxidase substrate, Fitzgerald, USA) incubando 10 minutos a 37°C, la reacción se detuvo agregando 100µL H₂SO₄ 2.5N. Se determinó la absorbancia a 450nm en un lector automático de ELISA. El título de anticuerpos se interpreta como 3 veces el promedio de la absorbancia de los controles negativos

- **Activación in vivo de DC, MØ y linfocitos B**

Ratones BALB/c de 6-8 semanas fueron inmunizados ip con 10µg P38 o 10µg de OmpC o 10µg/10µg OmpC/ P38 o 10µg/10µg OmpC/ P38 tratada con proteinasa K o 50µg Poly I:C en un volumen final de 500µL de solución amortiguadora de fosfatos. Al tiempo 3, 6, 12, y 24 horas posteriores a la inmunización, el bazo y los ganglios se disectaron y se preparó la suspensión celular para su análisis por citometría de flujo empleando los siguientes anticuerpos: PE-CD11c, APC-CD11b, B220-PerCP, FITC-CD80, FITC-CD86, FITC-CD40, FITC-CD69 y FITC-MHCII (Todos los anticuerpos fueron obtenidos de BD Pharmingen).

• Resultados.

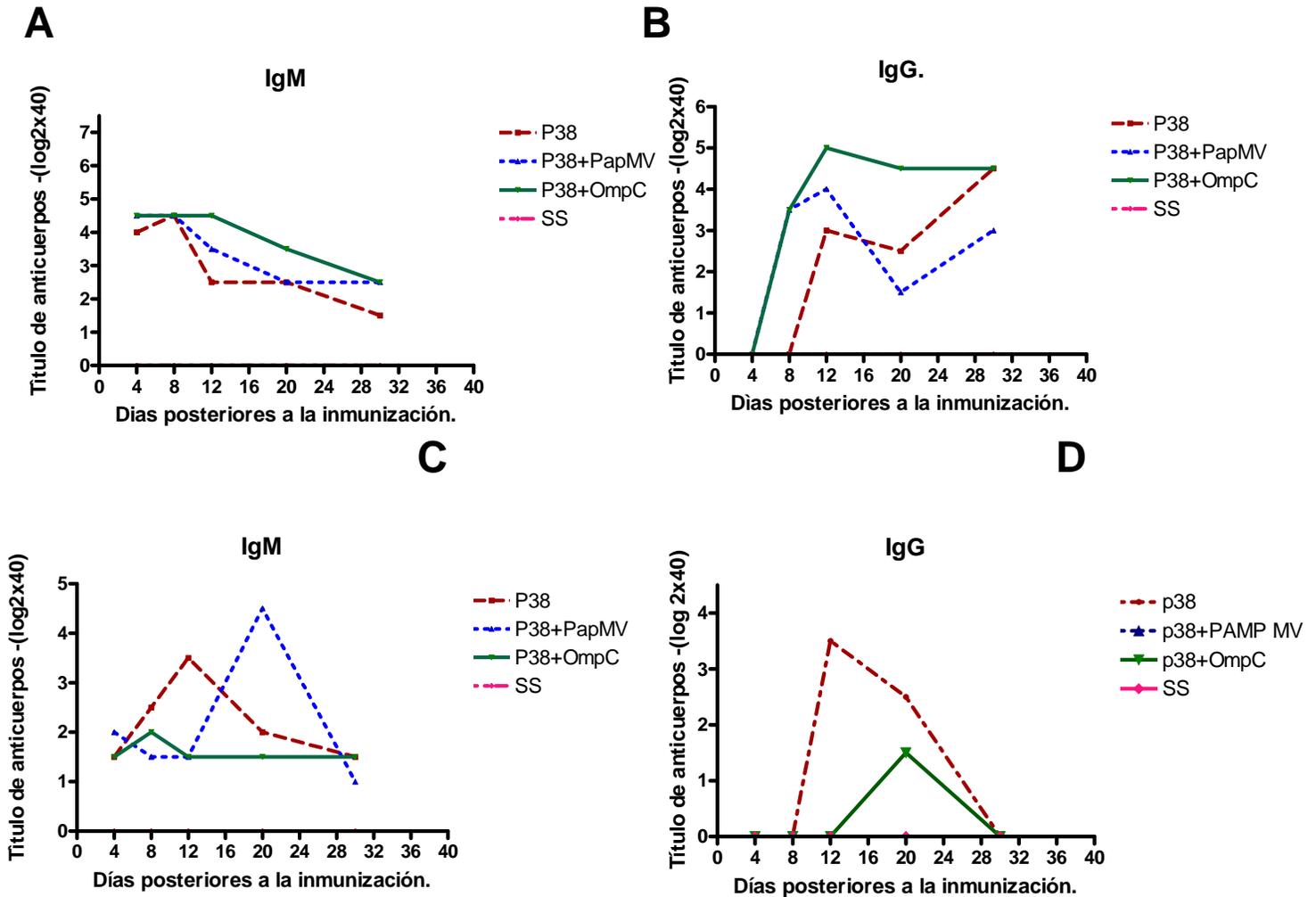
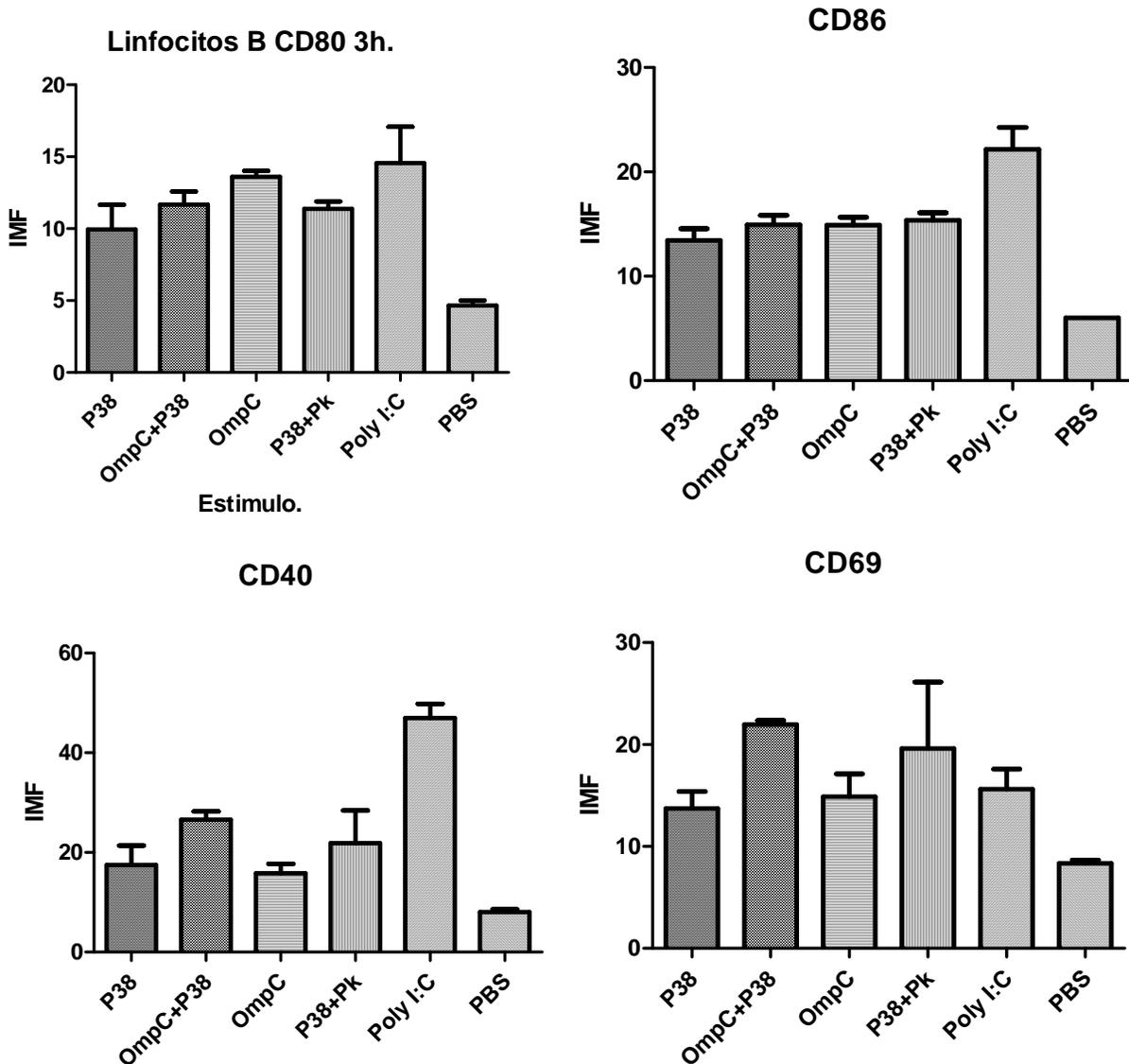


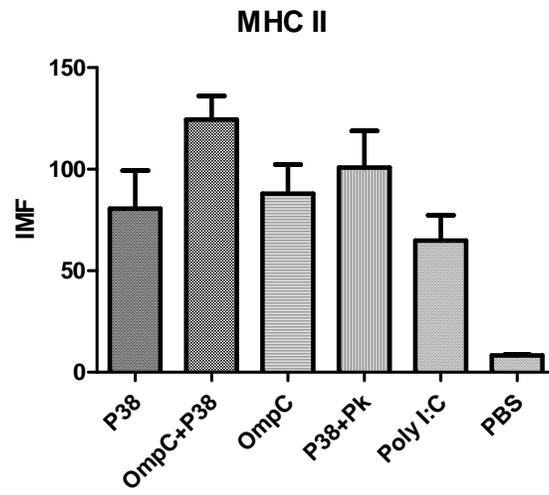
Fig.1 La porina OmpC genera un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos en contra de la proteína P38 de *M. tuberculosis*. Grupos de ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas se inmunizaron vía intraperitoneal o subcutánea con 10 μ g de proteína P38 o co-administración de P38 + OmpC (10 μ g) o P38 + PapMV (30 μ g) y SSI como control. Se sangraron en los días 0, 4, 12, 20, 30 obteniendo el suero. Se determinó el título de anticuerpos específicos anti-P38 de clase IgG total e IgM por el método de ELISA. **[A-C]** Título de anticuerpos específicos clase IgM anti-

P38. (Vía intraperitoneal y subcutánea respectivamente). [B-D] Título de anticuerpos específicos de clase IgG anti-P38 (vía intraperitoneal y subcutánea respectivamente)

Resultados de Maduraciones.

Linfocitos B 3h.





DISCUSIÓN

La porina OmpC genera un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos en contra de la proteína P38 de *M. tuberculosis*. Grupos de ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas se inmunizaron vía intraperitoneal o subcutánea con 10 μ g de proteína P38 o co-administración de P38 + OmpC (10 μ g) o P38 + PapMV (30 μ g) y SSI como control. Se sangraron en los días 0, 4, 12, 20, 30 obteniendo el suero. Se determinó el título de anticuerpos específicos anti-P38 de clase IgG total e IgM por el método de ELISA. [A-C] Título de anticuerpos específicos clase IgM anti-P38. (Vía intraperitoneal y subcutánea respectivamente.). [B-D] Título de anticuerpos específicos de clase IgG anti-P38 (vía intraperitoneal y subcutánea respectivamente)

CONCLUSIONES.

La porina OmpC de *Salmonella* entérica serovar thypi genero un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos en contra de la proteína P38.

La coadministración de la porina OmpC y la proteína P38 genero un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD80, CD86, CD40, CD69 y MHC II. El incremento en la expresión de estas moléculas esta relacionado con una eficiente activación de la respuesta inmune innata, lo que puede llevar una eficiente activación de la respuesta inmune adaptativa que nos puede permitir el establecimiento de una respuesta inmune protectora, estableciendo la memoria inmunológica.

Referencias.

Reference List

1. Acosta-Ramirez,E. *et al.* Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* **124**, 186-197 (2008).
2. Pulendran,B. & Ahmed,R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-863 (2006).
3. Andersen,P. Tuberculosis vaccines - an update. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 484-487 (2007).
4. Kaufmann,S.H. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 699-704 (2006).
5. Gagliardi,M.C. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin shares with virulent Mycobacterium tuberculosis the capacity to subvert monocyte differentiation into dendritic cell: implication for its efficacy as a vaccine preventing tuberculosis. *Vaccine* **22**, 3848-3857 (2004).
6. Nasser,E.A. & Kaufmann,S.H. Improved protection by recombinant BCG. *Microbes. Infect.* **7**, 939-946 (2005).
7. Castanon-Arreola,M., Lopez-Vidal,Y., Espitia-Pinzon,C. & Hernandez-Pando,R. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis. (Edinb.)* **85**, 115-126 (2005).
8. Hernandez-Pando,R., Castanon,M., Espitia,C. & Lopez-Vidal,Y. Recombinant BCG vaccine candidates. *Curr. Mol. Med.* **7**, 365-372 (2007).
9. Secundino,I. *et al.* Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* **117**, 59-70 (2006).
10. Isibasi,A. *et al.* Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* **10**, 811-813 (1992).
11. Isibasi,A. *et al.* Role of porins from Salmonella typhi in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **730**, 350-352 (1994).
12. Cervantes-Barragan,L. *et al.* TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens. *Eur. J. Immunol.* **39**, 126-135 (2009).
13. Hammarlund,E. *et al.* Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* **9**, 1131-1137 (2003).

14. Alving,C.R., Glass,M. & Detrick,B. Summary: Adjuvants/Clinical Trials Working Group. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 1427-1430 (1992).
15. McCready G *et al.* Measles vaccine effectiveness and duration of vaccine-induced immunity in the absence of boosting from exposure to measles virus. *Pediatr. Infect. Dis.* **15**, 1082-1086 (1996).
16. Mäkela PH *et al.* Long-persistence of immunity after immunisation with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *Vaccine* **22**, 287-292 (2003).
17. McMahan BJ *et al.* Antibody levels and protection after Hepatitis B vaccination: results of a 15-year follow-up. *Ann. Intern. Med.* **142**, 333-341 (2005).
18. Banatvala J, Van Damme P & Oehen S. Life long protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory. *Vaccine* **19**, 877-885 (2001).
19. Thraenhart O *et al.* Long-term humoral and cellular immunity after vaccination with cell culture rabies vaccine in man. *Clinical Immunology and Immunopathology* **71**, 287-292 (1994).
20. Shinefield HR *et al.* Vaccination with measles, mumps and rubella vaccine and varicella vaccine: safety, tolerability, immunogenicity, persistence of antibody and duration of protection against varicella in healthy children. *Pediatr. Infect. Dis.* **21**, 555-561 (2002).
21. McIntyre PB *et al.* High levels of antibody in adults three years after vaccination with a reduced antigen content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **23**, 380-385 (2004).
22. Aronson NE *et al.* Long-term efficacy of BCG vaccine. *JAMA* **291**, 2086-2091 (2004).
23. Bottiger M. A study of the sero-immunity that has protected the Swedish population against poliomyelitis for 25 years. *Scand J Infect Dis* **19**, 595-601 (1987).
24. Hammarlund,E. *et al.* Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* **9**, 1131-1137 (2003).
25. Igari,H. *et al.* [Koch's phenomenon after BCG vaccination and the two-step tuberculin test in elementary school children]. *Kekkaku* **73**, 395-401 (1998).
26. Guy,B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 505-517 (2007).
27. Reed,S. & Lobet,Y. Tuberculosis vaccine development; from mouse to man. *Microbes. Infect.* **7**, 922-931 (2005).

28. Skeiky, Y.A. & Sadoff, J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 469-476 (2006).
 29. Lycke, N. From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cell Microbiol.* **6**, 23-32 (2004).
 30. McKee, A.S., Munks, M.W. & Marrack, P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity.* **27**, 687-690 (2007).
 31. Marciani, D.J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov. Today* **8**, 934-943 (2003).
 32. Takx-Kohlen, B.C. Immunomodulators. Future prospects. *Pharm. Weekbl. Sci.* **14**, 245-252 (1992).
 33. Marciani, D.J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov. Today* **8**, 934-943 (2003).
 34. Kool, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869-882 (2008).
 35. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
 36. Marciani, D.J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov. Today* **8**, 934-943 (2003).
 37. Kool, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869-882 (2008).
 38. Levine MM. Typhoid fever vaccines. Plotkin SA, Orenstein WA Vaccines. 3rd, 781-814. 1999. USA, Saunders Company.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)
39. Nikaido, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905-3908 (1994).
 40. Bing K. Jap and Peter J. Walian. Structure and Functional Mechanism of Porins. *Physiol Rev.* **76**, 1073-1088 (1996).
 41. Puente, J.L., Verdugo-Rodriguez, A. & Calva, E. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol* **5**, 1205-1210 (1991).
 42. Neidhardt, F.C.E. **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. second(1). 1996. ASM Press.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)

43. Martinez-Flores,I., Cano,R., Bustamante,V.H., Calva,E. & Puente,J.L. The ompB operon partially determines differential expression of OmpC in Salmonella typhi and Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **181**, 556-562 (1999).
44. Gilleland,H.E., Jr., Gilleland,L.B. & Matthews-Greer,J.M. Outer membrane protein F preparation of Pseudomonas aeruginosa as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* **56**, 1017-1022 (1988).
45. Rauly,I. *et al.* Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of Klebsiella pneumoniae. *Infect. Immun.* **67**, 5547-5551 (1999).
46. Galdiero,M., Vitiello,M. & Galdiero,S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 57-64 (2003).
47. Galdiero,M., Vitiello,M. & Galdiero,S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 57-64 (2003).
48. Galdiero,M., Vitiello,M. & Galdiero,S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 57-64 (2003).
49. Galdiero,M., Vitiello,M. & Galdiero,S. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* **226**, 57-64 (2003).
50. Isibasi,A. *et al.* Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* **10**, 811-813 (1992).
51. Blanco,F. *et al.* Human cell mediated immunity to porins from Salmonella typhi. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**, 73-80 (1993).
52. Isibasi,A. *et al.* Role of porins from Salmonella typhi in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **730**, 350-352 (1994).
53. Isibasi,A. *et al.* Role of porins from Salmonella typhi in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **730**, 350-352 (1994).
54. Villarroel,J. *et al.* [Tuberculosis and AIDS in Pediatrics: on account of five cases]. *Rev. Chilena. Infectol.* **24**, 472-476 (2007).
55. (SAEI) Control global de la Tuberculosis WHO Reporte . 2005.
Ref Type: Report
56. Houben,E.N., Nguyen,L. & Pieters,J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 76-85 (2006).
57. Jawets. Microbiología Médica. (2002).
58. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Mecanismos Moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar. 2005.

Ref Type: Report

59. Mueller,P. & Pieters,J. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. *Immunobiology* **211**, 549-556 (2006).
60. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Mecanismos Moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar. 2005.

Ref Type: Report

61. Pispati,P. The paradox of infection and inflammation: friends or foes? The dilemma of biological usage in high endemic tuberculous areas. *Joint Bone Spine* **75**, 108-111 (2008).
62. Rafael Laniado-Laborín & Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Tratamiento de la tuberculosis multifarmacorresistente, ¿esquema estandarizado o individualizado? 2005.

Ref Type: Report

63. Domínguez C.Ángel, Alfonso del Arco & Jesús Canueto-Quintero. Guía de Práctica Practica Clínica de La Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI) sobre el tratamiento de la tuberculosis. *Tuberculosis. (Edinb.)* **88**, 134-136 (6 A.D.).
64. Rook,G.A., Dheda,K. & Zumla,A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 661-667 (2005).
65. Nguyen,L. & Pieters,J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* **15**, 269-276 (2005).
66. Rook,G.A., Dheda,K. & Zumla,A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 661-667 (2005).
67. Mueller,H. *et al.* Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF. *Cytokine* **43**, 143-148 (2008).
68. Medzhitov,R. & Janeway,C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
69. Pulendran,B. & Ahmed,R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-863 (2006).
70. Mueller,H. *et al.* Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF. *Cytokine* **43**, 143-148 (2008).
71. Rook,G.A., Dheda,K. & Zumla,A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 661-667 (2005).

72. Rajashree,P. & Das,S.D. Infection with prevalent clinical strains of Mycobacterium tuberculosis leads to differential maturation of monocyte derived dendritic cells. *Immunol. Lett.* **117**, 174-180 (2008).
73. Hernandez-Pando,R., Aguilar,D., Hernandez,M.L., Orozco,H. & Rook,G. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *Eur. J. Immunol.* **34**, 174-183 (2004).
74. Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P. & Janeway,C.A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
75. Ryffel,B. *et al.* Innate immunity to mycobacterial infection in mice: critical role for toll-like receptors. *Tuberculosis. (Edinb.)* **85**, 395-405 (2005).
76. Rios-Barrera,V.A. *et al.* Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. *Eur. J. Immunol.* **36**, 345-353 (2006).
77. Pulendran,B. & Ahmed,R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-863 (2006).
78. Pulendran,B. & Ahmed,R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-863 (2006).
79. Pulendran,B. & Ahmed,R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**, 849-863 (2006).