



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación de los lipopolisacáridos
modificados estructuralmente de *Salmonella*
Typhimurium sobre la respuesta inmune innata
durante la fase inicial de la infección**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Pablo Augusto Vieyra García



DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Constantino III Roberto López
Macías**

México DF, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado

1. Datos del alumno

Vieyra García Pablo Augusto
56 17 25 62
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302681149

2. Datos del Tutor / Secretario

Dr. Constantino III Roberto López Macías

3. Datos Sinodal 1 / Presidente

Dra. Laura del Carmen Vargas Parada

4. Datos Sinodal 2 / Vocal

Dr. Rodolfo Pastelín Palacios

5. Datos Sinodal 3 / Suplente 1

Cristina del Carmen Gil Cruz

6. Datos Sinodal 4 / Suplente 2

Dra Perla Mariana del Río Estrada

7. Datos del trabajo escrito

Participación de los lipopolisacáridos modificados estructuralmente de *Salmonella* Typhimurium sobre la respuesta inmune innata durante la fase inicial de la infección

42 p

2010

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

El proyecto fue financiado por CONACyT proyectos: CONACyT 45261-M y 43911-M; SALUD-2004-01-132. SALUD-2007-C01-69779, y por el IMSS a través del Fondo de Investigación en Salud: FIS/IMSS/PROT/C2007/049 otorgados al Dr. Constantino López Macías y el proyecto 2005/1/I/039 otorgado al Dr. Rodolfo Pastelín Palacios. El proyecto recibió financiamiento a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México Proyecto: IN224907 e IN214302 otorgado al Dr. Rodolfo Pastelín Palacios y como colaborador al Dr. Constantino López Macías.

Agradecimientos

Al Dr. Armando Isibasi, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus consejos, su paciencia y sus enseñanzas que han contribuido de manera importante a mi formación.

Al Dr. Constantino López, por toda la confianza brindada, por sus consejos, por enseñarme que la disciplina es un factor muy importante en mi formación, por su entereza frente a los nuevos retos y por transmitir su visión emprendedora.

Al Dr. Rodolfo Pastelín, por el apoyo en la realización de este trabajo, por todas las charlas en las que he aprendido tanto, por el entusiasmo cuando se habla de ciencia y por todos sus consejos.

A la Dra. Lourdes Andrea Arriaga, por todo el apoyo tanto en el ámbito laboral como personal, por sus consejos y apoyo técnico en este. Pero sobre todo por la amistad sincera y las palabras de aliento en los momentos más oportunos.

A la Dra. Cristina Gil Cruz, por todo su apoyo en la realización de este trabajo, sus consejos, revisiones, comentarios y por su valiosa amistad dentro y fuera del laboratorio.

Al M. en C. Christian Pérez Shibayama por su apoyo, su ejemplo y el tiempo invertido en mi formación y su gran amistad.

A los compañeros de la UIMIQ Jacqueline, Mireille, Ismael, Marcela, Javier Arturo, Marisol, Emiliano, Adriana, Pablo Nuribán, Esteban y Jose Carlos, por ser un grupo de trabajo muy fuerte, por ser grandes amigos y por los buenos momentos que pasamos juntos.

A la Dra. Ingerborg Becker, al MVZ Daniel Sánchez y al Sr. Ricardo Vargas por su apoyo en los experimentos realizados en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Dedicatorias

A mi madre que es la persona que más ha influido en mi vida, por esforzarse y darnos siempre lo mejor a mi y a mis hermanos, por darme la libertad y la confianza de ser su amigo y elegir cada elemento de mi vida, y por que la amo con todo mi corazón.

A mi padre por lo amo muchísimo, por ser mi padre, por todo lo que hace por mí por estar en mi vida.

A mis hermanos Gero y Tania por que con ellos lo he compartido todo, por su apoyo y respaldo incondicional, por estar conmigo siempre y por que los amo muchísimo.

A mis mejores amigos Abraham Cano y Fernanda Villalvazo, por los años que hemos sido amigos, por que con ellos me he convertido en la persona que soy y por toda la inspiración que me da haberlos conocido.

Índice

Lista de Términos y Abreviaturas.....	1
Resumen	3
Introducción.....	4
Bacterias Gram-negativas	5
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	6
Infección con <i>S. Typhimurium</i>	7
Respuesta Inmune frente a <i>Salmonella Typhimurium</i>.....	8
Inmunidad Innata	8
Inmunidad innata frente a <i>S. Typhimurium</i>	10
Inmunidad adaptativa	12
El LPS un PAMP muy importante	13
Virulencia de <i>S. Typhimurium</i>.....	15
Sistemas reguladores de dos componentes	17
Modificaciones a la estructura del LPS	17
Planteamiento del Problema	23
Hipótesis	24
Objetivo General	25
Objetivos Particulares	25
Materiales y Métodos	26
Ratones	26
Cepas bacterianas	26
Lipopolisacáridos (LPS)	26
Infección	26
Obtención de células de peritoneo.....	27
Obtención de muestras de sangre	27
Obtención de células de bazo y ganglio linfático.....	27
Determinación de carga bacteriana.....	27
Citometría de flujo	28
Análisis Estadístico	29
El LPS modificado de <i>S. Typhimurium</i> disminuye la producción de IL-6 y MCP-1 en sangre y el sitio de inoculación del LPS.....	30
Los LPS modificados reducen la producción de IL-6 y MCP-1 durante las primeras horas de infección con <i>S. Typhimurium</i>	31
El LPS 435 disminuye el porcentaje de CDs de ratones infectados con <i>S. Typhimurium</i> en el sito de inoculación.....	33

El LPS modificado no interviene en la capacidad de replicación de la bacteria durante las primeras 24 horas de infección.	34
Discusión.....	36
Conclusiones	39
Bibliografía.....	40

Lista de Términos y Abreviaturas

430	<i>Salmonella</i> Typhimurium cepa JSG-430
435	<i>Salmonella</i> Typhimurium cepa JSG-435
AP-1	Proteína Adaptadora 1
MDMO	Macrófagos Derivados de Médula Ósea
CpG	Moléculas de DNA desmetilado
CD	Células Dendríticas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
FAD	Fosfolípidos de alta densidad
IFN- γ	Interferón gamma
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
IRF	Factores reguladores de interferón
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun
Kdo	Ácido-3-deoxi- α -D-mano-octo-2-ulopiranosico
L,D-Hep	L-glicero- α -D-mano-heptopiranososa
LB	Luria-Bertani
LBP	Proteína de unión al LPS
LPS	Lipopolisacárido
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAP	Péptido de antígeno múltiple
mCD14	CD14 de membrana
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1

CPH	Complejo mayor de histocompatibilidad
MyD88	Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF- κ B	Factor nuclear kappa de cadena ligera de células B activadas
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
S. Typhi	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi
S. Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
sCD14	CD14 soluble
SPI	Isla de patogenicidad
TIRAP	Proteína adaptadora con dominio toll/IL-1R
TLR	Receptor de tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Adaptador inductor de interferón beta con dominio TIR
TTSS	Sistema de secreción tipo III
UFC	Unidad formadora de colonia
WT	Tipo silvestre

Resumen

Durante la infección *Salmonella Typhimurium* es capaz de detectar las condiciones del microambiente a través de los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB y responder con cambios en la estructura de su LPS. Estos cambios le confieren resistencia a péptidos catiónicos e inducen una menor producción de TNF- α en macrófagos de ratón, además incrementan la susceptibilidad de ratones BALB/c a la infección. Sin embargo el efecto sobre la respuesta inmune durante las primeras horas de infección aún no se ha determinado, en este trabajo se reporta que el LPS de cepas de *S. Typhimurium* que expresan de forma constitutiva los genes regulados por PhoP/PhoQ o PmrA/PmrB producen una menor cantidad de IL-6 y MCP-1 comparada con el LPS de tipo silvestre *in vivo*. Los LPS modificados mostraron una tendencia a disminuir el porcentaje de células dendríticas reclutadas en el sitio de la inoculación y no modifican la carga bacteriana en el bazo durante las primeras 24 horas posteriores a la infección, lo que sugiere que las modificaciones a la estructura del LPS inducen una respuesta inmune deficiente durante la fase inicial de la infección que le da ventaja a la bacteria sobre el sistema inmune, lo cual tiene consecuencias en el establecimiento de la infección.

Introducción

Las enfermedades infecciosas son el producto de la interacción de un microorganismo patógeno con el organismo huésped. Son el resultado de varios elementos tales como; la evolución del huésped, la evolución del patógeno, la interacción entre ambos y una serie de factores que inciden y modulan dicha interacción. Ya Darwin se interesó en la transmisión de las enfermedades infecciosas, como la escarlatina, pero enfocó esta cuestión desde el punto de vista de que las enfermedades infecciosas funcionan como un agente selectivo en la evolución del huésped, y no desde la evolución del propio microorganismo (1). Como ilustraba Haldane “es más fácil para un ratón tener un conjunto de genes para resistir a *Salmonella Typhimurium*, que para resistir a los gatos” (2, 3).

Desde el punto de vista de la evolución del huésped y del patógeno son muy interesantes los trabajos del Prof. Ebert y Cols (4, 5) donde proponen que en los procesos de co-evolución el parásito evoluciona en respuesta al huésped y el huésped en respuesta al patógeno. A través de una serie de experimentos con diferentes clones de *Daphnia magna* la pulga del agua (huésped), algunos clones de protozoos y bacterias parásitos de esta pulga se demostró que la interacción con los parásitos es una clara fuente de selección en las poblaciones del huésped, basándose en factores como la susceptibilidad del huésped o la infectividad y virulencia del parásito.

La patogenicidad es la capacidad que tiene un microorganismo para producir una enfermedad, mientras que el término virulencia se refiere al grado de daño/mortalidad provocado por el patógeno. La virulencia evoluciona con base a los mecanismos de variación genética y selección natural. Recientemente, se han propuesto modelos de selección de la virulencia en base a cambios del huésped o a la asociación de la virulencia con otras características del microorganismo (6). Así, la selección directa de la virulencia postula que ésta no suele ser una función única del patógeno, sino que implica muchas propiedades, tales como; diferentes factores de virulencia, especificidad por tejidos o genotipos del huésped y considera que la evolución de los patógenos no

está, en la mayoría de los casos, basada en la inducción de daño o mortalidad en el huésped, sino basada en la selección de otras propiedades más relacionadas con el *fitness* (expectativas de supervivencia) del patógeno, que pueden estar relacionadas directamente con la virulencia, pero que en muchos casos la relación es indirecta, a través de otras propiedades del microorganismo, como la resistencia a los antibióticos, la infectividad, la capacidad de evadir el sistema inmune y la capacidad de supervivencia fuera del huésped, entre otras.

En el marco de estas interacciones y desde el punto de vista evolutivo, lo que importa son las características que la bacteria adquiere para incrementar su sobrevivencia, asegurar su reproducción y en consecuencia contribuir al conjunto de genes disponibles para las generaciones posteriores. Una bacteria que vive en el intestino de un organismo se ve rodeada de otras bacterias que compiten por el mismo nicho, mientras que en el ambiente el sistema inmune está actuando continuamente para mantener bajo control toda la microbiota presente en el sitio. Estos factores constituyen una serie de presiones de selección, que determinan las características que en su conjunto podrían influir en la virulencia de la bacteria.

Bacterias Gram-negativas

Las bacterias Gram-negativas son un grupo de microorganismos presentes en ambientes muy diversos, representan un campo muy amplio de investigación por los metabolitos que son capaces de sintetizar, su amplia distribución y las enfermedades que pueden desencadenar. A este grupo pertenecen los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Wolbachia*, *Salmonella*, etc (7).

Se caracterizan por tener una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio que separa estas dos estructuras llamado espacio periplásmico. Su capacidad patogénica se debe entre otras cosas a las moléculas que forman parte de su pared celular, tales como el LPS (7).

En todas las bacterias Gram-negativas, la membrana externa está constituida por una bicapa lipídica asimétrica con lipopolisacárido (LPS) embebido, ésta molécula interactúa

con el ambiente externo y le confiere características muy especiales a este grupo de bacterias.

***Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Salmonella enterica serovar Typhimurium es una bacteria Gram-negativa intracelular facultativa. Pertenece al grupo de los serotipos no tifoideos, sin embargo, es la causa más frecuente de gastroenteritis en el mundo (8). En el ratón causa una enfermedad similar a la fiebre tifoidea (causada por *S. Typhi* en humanos) (9) por lo que se ha usado como modelo para estudiar esta patología.

En ratones *S. Typhimurium* se disemina sistémicamente vía circulación, la infección está caracterizada por cambios patológicos severos y alta carga bacteriana en tejidos como placas de Peyer, ganglios mesentéricos, bazo e hígado. Una distribución similar de bacteria en tejidos está reportada por pacientes con fiebre tifoidea (10).

El surgimiento de la virulencia y patogenicidad del género *Salmonella* aún no se ha descrito por completo, sin embargo, el Dr. Baquero propone que el surgimiento de la patogenicidad durante la evolución de las bacterias es el resultado de la incorporación de genes que le permitan incrementar virulencia y/o resistencia mediante procesos de ingeniería evolutiva donde los elementos genéticos se someten a procesos adaptativos (11).

La virulencia es un complejo fenotipo que se manifiesta en su totalidad durante la interacción huésped-patógeno in vivo. El estudio de una infección natural en un animal que desarrolla síntomas de la enfermedad similares a aquellos que se observan en humanos es fundamental para entender la patogénesis de *Salmonella* (12).

En ratón, la infección con *S. Typhimurium* tiene una distribución en los tejidos similar a la de los pacientes infectados con *S. Typhi* que padecen fiebre tifoidea (12). En estos animales, la infección provoca elevación de la temperatura entre 4 y 8 días post-infección, trombosis, hemorragia, ulceración, agrandamiento de las placas de Peyer y adelgazamiento de la mucosa del íleon, lo cual es muy semejante a lo que se observa en pacientes con fiebre tifoidea (13).

El modelo de ratón ha sido muy útil para estudiar muchos mecanismos de virulencia de *Salmonella*; tales como el sistema de secreción tipo III y el operón *spv* (14, 15), de hecho, este modelo se ha convertido en el *gold standard* para estudiar la inmunidad frente a una infección sistémica con *Salmonella* como un medio de entendimiento de la respuesta inmune que se requiere para proteger a los humanos contra *S. Typhi* (16).

Sin embargo, es necesario conocer las limitantes del modelo; *S. Typhimurium* causa una infección local en los humanos mientras que el ratón desarrolla una infección sistémica, además de que los genes de virulencia de *S. Typhi* están ausentes o funcionalmente alterados en *S. Typhimurium* (14) por lo que la información obtenida del modelo de ratón no puede ser aplicada directamente en *S. Typhi*.

Infección con *S. Typhimurium*

Salmonella es un patógeno que se transmite por la ingesta de agua o comida contaminados con la bacteria, las pobres condiciones sanitarias y la poca higiene en la preparación de los alimentos contribuyen a la alta incidencia de infecciones en los países más afectados. La enfermedad se puede tratar con antibióticos pero la ineficiencia de los sistemas de salud y la adquisición de resistencia a antibióticos dificulta el combate a este patógeno (17).

El primer paso para el desarrollo de la patogénesis de *Salmonella* no-tifoidea es la habilidad de penetrar el epitelio del intestino, esto le da la capacidad de infectar a nivel sistémico o intestinal. El cruce de la bacteria a través del epitelio intestinal hacia los tejidos del huésped, ocurre a través de dos puntos principalmente en la parte distal del íleon (18); el área adyacente a las placas de Peyer y el epitelio que cubre las microvellosidades. *Salmonella* usa a las células M para lograr este cruce, ya que los enterocitos que las rodean son menos permeables a la entrada de bacterias.

Están descritas rutas alternativas de salida hacia la lamina propia, que por ejemplo: involucran a las células dendríticas (CD) localizadas por debajo del epitelio que a través de sus dendritas pueden tomar a la bacteria y al retraerlas transportan a la bacteria (19).

Una vez fuera del lumen del intestino, la bacteria se encuentra con las poblaciones celulares que residen en las placas de Peyer, que consiste en: células dendríticas de la región subepitelial, células B en la región folicular y células T en el área adyacente (20). La bacteria llega al nódulo linfático que drena el sitio preferentemente transportada por una CD a través de linfa o vasos sanguíneos. De esta manera inicia la infección y se pone en contacto con las diversas poblaciones celulares del sistema inmune.

Respuesta Inmune frente a *Salmonella Typhimurium*

La respuesta inmune del huésped contra cualquier microorganismo patógeno tal como *S. Typhimurium*, se basa en dos componentes bien diferenciados que trabajan en sinergia: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

La inmunidad adaptativa se caracteriza por la selección clonal de linfocitos antígeno-específicos que a largo plazo originan una protección duradera y específica (21). La inmunidad innata por su parte tiene la característica de responder de manera inmediata pero carece de la capacidad de la generación de memoria (22).

Inmunidad Innata

La inmunidad innata tiene como función principal responder rápidamente contra el patógeno sin la necesidad de inducir o madurar linfocitos, por lo que se considera la primera línea de defensa contra las enfermedades infecciosas. Desde un punto de vista filogenético la inmunidad innata tiene una aparición más temprana que la adaptativa, ya que se han encontrado marcadores moleculares y poblaciones celulares que pertenecen a la inmunidad innata en todos los metazoarios (23), mientras que la inmunidad adaptativa se ha visto restringida solo a vertebrados, un grupo de animales cuyo surgimiento en la escala evolutiva es más reciente.

Las células que forman parte de la inmunidad innata son: células fagocíticas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas, este conjunto de células se encargan de fagocitar y/o destruir al patógeno mientras que producen mediadores inflamatorios tales como citocinas y quimiocinas (23). Las células presentadoras de antígeno tales como los macrófagos, las células dendríticas y los basófilos recientemente descritos

(24), llevan fragmentos del microorganismo al linfocito T en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) para iniciar la activación de la inmunidad adaptativa y el establecimiento de la inmunidad protectora a largo plazo, es en este punto donde se enlazan ambos sistemas de inmunidad (25).

La capacidad del sistema inmune innato de responder ante patógenos depende fundamentalmente del reconocimiento de los productos microbianos, este sistema de reconocimiento es tan fino que le permite a las células de la inmunidad innata discriminar entre lo propio y lo extraño (23), sin embargo, los modelos más actuales que pretenden explicar las señales que activan a la inmunidad innata proponen que los receptores han evolucionado adquiriendo la capacidad de detectar señales de alarma tales como la pérdida de la integridad de los tejidos identificando moléculas propias o la presencia de agentes patógenos identificando moléculas extrañas (26).

Entre otras características, la inmunidad innata posee un mecanismo de detección de microorganismos muy eficiente mediado por receptores. Por un lado las bacterias han desarrollado mecanismos para promover su adhesión a las células del huésped y por el otro las células del huésped han desarrollado mecanismos para detectar componentes de la superficie bacteriana, promover la fagocitosis y la eliminación del microorganismo. Este es el resultado de miles de años de evolución de ambas entidades, donde las mejores estrategias de sobrevivencia han sido seleccionadas a favor estableciendo la relación huésped-parásito (27).

Los inductores microbianos de la respuesta inmune se clasifican en dos grupos: en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y factores de virulencia. Los PAMPs son un conjunto de patrones moleculares conservados por microorganismos (patógenos y comensales) reconocidos por un grupo de receptores en las células del huésped codificados desde línea germinal, conocidos como receptores de reconocimiento de patrón (PRRs). Los factores de virulencia se restringen solo a organismos patógenos (28).

Los PAMPS incluyen componentes de la pared celular de bacterias como el LPS, los peptidoglicanos, ácidos teicoicos, flagelina, componentes de hongos, levaduras, protozoos y virus (29). Las primeras investigaciones acerca de los receptores de la inmunidad innata se realizaron en la mosca *Drosophila* donde los receptores tipo toll (TLRs) fueron descritos. Hasta el día de hoy se han descrito 11 TLRs diferentes en mamíferos (29).

Gran parte del conocimiento generado acerca de PAMPs provienen de experimentos donde se estudia la respuesta del huésped al LPS (30).

Inmunidad innata frente a *S. Typhimurium*

Los principales agentes antibacteriales son los intermediarios de oxígeno y nitrógeno reactivo. Al parecer la fase nitrosativa prolongada es la responsable de la inhibición del crecimiento de la bacteria por el producto de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (31, 32). La bacteria en respuesta produce enzimas antioxidantes y sistemas de reparación (33) que le permite sobrevivir dentro del fagosoma e incluso multiplicarse dentro de él. No se conocen los mecanismos que determinan la muerte o supervivencia de la bacteria dentro del fagosoma, sin embargo, la activación de los macrófagos por interferón γ (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) parecen ser importantes para la destrucción de la bacteria (34). Aquellas bacterias que logran sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos provocan una segunda bacteremia que en casos fatales puede provocar un choque endotóxico y muerte (35, 36). Se ha descrito la importancia de los componentes celulares de la respuesta inmune para el control de la bacteria, entre los cuales se distinguen: a los macrófagos, CDs, neutrófilos y las células NK.

Los neutrófilos son células muy importantes en esta infección ya que en etapas tempranas se encargan de impedir la colonización de la bacteria (37). Se sabe que *S. Typhimurium* provoca una respuesta proinflamatoria muy intensa que se caracteriza por el movimiento de neutrófilos polimorfonucleares a través de la barrera epitelial hacia el lumen del intestino por dos proteínas liberadas mediante el sistema de secreción tipo III

que activan la cascada de señalización de la proteína cinasa C que inicia el movimiento transepitelial (38).

Durante la infección sistémica, *S. Typhimurium* penetra la barrera intestinal y llega a los nódulos mesentéricos. En este sitio la bacteria es fagocitada por células como los macrófagos y es compartimentalizada en fagosomas modificados llamados vacuolas contenedoras de *Salmonella*, esta vacuola previene la fisión lisosomal y la exposición a agentes anti-microbianos del huésped (39). Sin embargo el macrófago al reconocer a la bacteria a través de PRRs se activa y muestra funciones efectoras como incremento en la capacidad fagocítica, producción de especies reactivas de oxígeno, producción de citocinas y quimiocinas.

Las CDs están localizadas en todo el cuerpo del huésped, en los sitios de entrada de los microorganismos esperan a estar en contacto con este e inician la migración a través de los tejidos hacia órganos linfoides, capturan, procesan y presentan antígenos en el contexto del CPH a linfocitos T (40). Una respuesta inmune eficiente contra *S. Typhimurium* depende fuertemente de estas células. Las CDs son parte de las primeras células en contacto con *S. Typhimurium* por lo que son de gran importancia en el reconocimiento y destrucción de la bacteria.

Una vez que la CD reconoce a un microorganismo a través de sus PRRs, ocurren varios eventos como son: Fagocitosis y posterior presentación de antígeno, además de la maduración de la célula, la cual consiste entre otras cosas en un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40, moléculas de CPH para la presentación del antígeno, pérdida de su capacidad fagocítica y un aumento en la secreción de citocinas cuyo impacto final es una eficiente activación de linfocitos T. El proceso de maduración además incluye un cambio en la expresión de receptores para quimiocinas (41) y moléculas de adhesión (42) permitiendo de esta manera que la CD pueda viajar del sitio de infección al órgano linfoide secundario más cercano donde se lleva a cabo la presentación de antígeno.

Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa se compone por 2 tipos de células; los linfocitos T y los linfocitos B.

Los linfocitos T son responsables de dos funciones principales; la primera esta a cargo de los linfocitos T CD4 y consiste en ayudar a otras células del sistema inmune a cumplir su función mediante la expresión de moléculas de superficie de membrana y la producción de citocinas. La segunda es realizada por los linfocitos T CD8 que realizan funciones citotóxicas para matar células infectadas o senescentes. El receptor de estas células se denomina TCR cuya especificidad se logra a través de recombinación V(D)J y un proceso de selección en órganos linfoides (25). El linfocitos T son capaces de reconocer péptidos que les son presentados en el contexto del CPH (25), al T CD4 el péptido le es presentado en el CPH de clase II, mientras que al TCD8 el péptido le es presentado en el CPH de clase I. La interacción CPH -TCR, además de las señales co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86, entre otros activa al linfocito T, prolifera y adquiere fenotipo efector. Se han descrito varias subclases de linfocitos T como los T reguladores, los T foliculares, los T_{H1} , T_{H2} y T_{H17} cuyas funciones son muy diversas (25).

Los linfocitos B son los responsables de la producción de anticuerpos, estas células pueden reconocer a su antígeno en forma nativa., la naturaleza este puede ser muy diversa ya que carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, etc... pueden ser reconocidos. Al receptor de estas células se le denomina BCR y su especificidad es producto de recombinación V(D)J e hipermutación somática en el centro germinal (43).

Hay evidencia experimental acerca de la importancia de la inmunidad adaptativa para la protección durante la infección con *Salmonella Typhimurium*. Está reportado que ratones deficientes de linfocitos B maduros son susceptibles a la infección con *S. Typhimurium* comparados con los ratones tipo silvestre (44), estos ratones no solo carecen de Ig's sino también de células B capaces de presentar antígenos y producir citocinas.

El LPS un PAMP muy importante

El LPS es uno de los factores de virulencia más importantes de las bacterias Gram-negativas, ya que su forma purificada o sintetizada químicamente reproduce algunas de las manifestaciones que se presentan con la bacteria completa en animales y en el hombre. Sin embargo, ésta condición no descarta la posibilidad de que otras moléculas diferentes al LPS compartan su capacidad de inducir inflamación.

Además del LPS hay otras moléculas presentes en bacterias Gram-negativas como el peptidoglicano, la flagelina y las porinas, que también son capaces de inducir inflamación. Por lo tanto, el fenómeno inflamatorio durante la infección, es en realidad el resultado de una respuesta integral a muchos estímulos.

El LPS es una molécula anfipática compuesta por tres elementos principales: el antígeno O, el núcleo de oligosacáridos y el lípido A. En su parte más externa se haya la región del antígeno O compuesta de unidades repetitivas de monosacáridos u oligosacáridos de estructura variable entre géneros y especies. Cada unidad de repetición puede estar compuesta de entre 1 a 8 monosacáridos diferentes. Además las sustituciones como acetilaciones, fosforilaciones o adición de aminoácidos incrementan la variabilidad de sus elementos teniendo como resultado una gran variedad de posibles estructuras del antígeno O.

La región del núcleo está dividida en el núcleo externo y el núcleo interno. El núcleo externo está compuesto principalmente por hexosas con un arreglo muy variable. En *E. coli*, por ejemplo, están descritos cinco tipos de *core* diferentes, para *S. enterica* están descritos dos tipos de núcleo distintos. El núcleo interno está compuesto por al menos una molécula de ácido-3-deoxi- α -D-mano-octo-2-ulopiranosóico (Kdo) y dos o más residuos de L-glicero- α -D-mano-heptopiranososa (L,D-Hep), el arreglo de los constituyentes del núcleo interno varía según la especie de bacteria (45).

En la parte más próxima a la membrana externa de la bacteria se encuentra el lípido A, el cual es el responsable de la actividad endotóxica del LPS. Esta parte de la molécula también es la estructura más conservada, sin embargo, se conocen múltiples variaciones

en su composición. El lípido A de *E. coli* tiene las características más comunes conocidas: esta compuesto por un disacárido β -1-6-2-amino-2-desoxiglucopiranososa con 2 grupos fosfato en las posiciones 1 y 4', cuatro residuos de ácido 3-hidroxi miristato con enlaces éster o amino en las posiciones 2, 2', 3 y 3'. El carbono 3 de los grupos acilo de los carbonos 2' y 3' están sustituidos a su vez por ácido láurico o mirístico respectivamente, lo que conforma un lípido A hexacilado (45). El LPS a través de estos grupos acilo se puede integrar a la membrana de la bacteria. Cuando las bacterias mueren o se replican, el LPS es liberado en forma pura o como un complejo de LPS y proteínas de superficie de membrana, es entonces cuando las células del sistema inmune pueden entrar en contacto con éste (46).

El contacto con el LPS en el contexto de la infección, desencadena la producción de una gran diversidad de mediadores tales como citocinas y quimiocinas. De esta manera se desarrolla una serie de eventos entre los que se incluye; el incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, la secreción de exudado y la migración de leucocitos al sitio de la infección que finalmente resulta en la fagocitosis y la muerte del microorganismo (28).

Dado que el LPS es una molécula cuya estructura está relativamente conservada en las bacterias Gram-negativas y todas las bacterias de este grupo la presentan, es posible que exista un sistema único de reconocimiento. El grupo de Walev y Schumann (47) hace 13 años, describieron el mecanismo mediante el cual los agregados de LPS son disociados por la proteína de unión del LPS (LBP) para formar complejos LPS/LBP que pueden tener dos destinos; el LPS/LBP puede ser transferido a CD14 de membrana (mCD14) presente en monocitos e inducir su activación o ser transferido a CD14 soluble (sCD14) circulante en fluidos. Esta interacción es muy importante, ya que esta molécula tiende a formar agregados por sus características anfipáticas, los cuales suelen tener poca interacción con CD14. La conversión a monómeros gracias a la LBP mejora la interacción con mCD14, sCD14 o fosfolípidos de alta densidad (FAD), resultando en la activación de células del sistema inmune a través de CD14 o la neutralización del LPS a través de los FADs (48). Se ha descrito que el complejo LPS/LBP se une a CD14 antes de

interactuar con HDL, lo cual sugiere que la sobre-activación del sistema inmune se regula a través de la neutralización del LPS.

Se ha propuesto que es necesaria una proteína transmembranal en la vía de señalización actuando en conjunto con CD14. Esta proteína es un TLR, en específico TLR 4. Esta asociación fue determinada por el grupo de Beutler trabajando con ratones C3H/HeJ resistentes a LPS. Ellos determinaron que una mutación puntual en el gen *tlr4* en estos ratones y la delección total del gen *tlr4* en ratones C57BL/10ScCr eran las responsables de que estos ratones no respondieran al LPS (49).

MD-2 es otra proteína que tiene importancia en la señalización inducida por LPS. Es una proteína de secreción que carece de dominio transmembranal que se detecta en forma dimerica en circulación y es capaz de unirse al LPS sin que la LBP este involucrada.

La interacción del TLR con su agonista conlleva al reclutamiento de proteínas adaptadoras con dominio TIR (29) como: MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. Ambas establecen una interacción tipo TIR-TIR, lo cual resulta en el reclutamiento de proteínas de la familia IRAK: IRAK1, IRAK2, IRAK4 e IRAK-M, y el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6). El reclutamiento de este complejo produce la activación de las MAP cinasas (ERK, JNK y p38) y factores de transcripción tales como NF- κ B y AP-1 lo que induce la producción de varias citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

La activación de los TLRs induce el aumento de marcadores de maduración, tales como: CD80, CD83, CD86 y el receptor de CCR7 (29).

TLR 4 al reconocer LPS puede señalar a través de MyD88 o TRIF. Señalizando por MyD88 puede activar MAP cinasas (ERK, p38 y JNK) y NF- κ B, mientras que la señalización a través de TRIF produce la activación de IRF3 y la inducción de genes de IFN tipo 1 (29).

Virulencia de *S. Typhimurium*

El proceso invasivo requiere la expresión de varios genes regulados a nivel transcripcional y post-transcripcional por diversos sistemas que responden a las

condiciones del microambiente (8), de esta manera *Salmonella* Typhimurium enfrenta la reacción del sistema inmune.

Muchos de los genes de virulencia de *S. Typhimurium* están agrupados dentro de las islas de patogenicidad-1 (SPI-1) y 2 (SPI-2), que codifican componentes del sistema de secreción tipo III (TTSS). El TTSS tiene una estructura parecida a una aguja localizada a largo de la membrana interna y membrana externa de la bacteria. *S. Typhimurium* inyecta proteínas efectoras a la célula del huésped a través de esta aguja, lo cual interfiere con una gran variedad de procesos celulares (50).

Los TTSS actúan en diferentes etapas de la infección durante la fase extracelular e intracelular. La bacteria usa el TTSS codificado en SPI-1 en la fase intestinal o extracelular (10) cuando el patógeno es ingerido por vía oral en alimentos contaminados.

S. Typhimurium también ha desarrollado mecanismos de manipulación codificados en SPI-1 que le permiten inducir apoptosis (51) para escapar de células fagocíticas y silenciar la respuesta inmune, entre otras proteínas esta descrita la proteína SipB, que interactúa con la caspasa-1 (51). La SPI-2 activada durante la etapa intracelular actúa (52) junto con el sistema PhoP/PhoQ para mejorar su capacidad de sobrevivir y crecer dentro de las células del hospedero, lo cual es esencial para su posterior diseminación sistémica (53-56).

Está descrito que las CD pueden actuar como vehículos de diseminación de *S. Typhimurium* (57, 58). Una vez dentro de vacuolas, la bacteria secreta proteínas efectoras codificadas en SPI-2 (52). En esta etapa hay descritos 16 factores de virulencia que afectan el destino de las vacuolas que contienen *Salmonella*. En cepas con mutaciones en SPI-2 se ha descrito que los lisosomas que las contienen presentan una mayor cantidad de marcadores lisosomales y endosomas tardíos, es decir, de maduración del lisosoma, comparados con los que presentan los lisosomas que contienen a la cepa silvestre (59). Se ha determinado que *S. Typhimurium* puede modificar las propiedades migratorias de fagocitos gastrointestinales promoviendo de

esta manera su rápida diseminación, como la producción de la proteína efectora srfH, secretada a través del TTSS. Esta proteína tiene la capacidad de interactuar con la proteína TRIP6 involucrada en la regulación de la movilidad de la célula y su activación contribuye a la diseminación de la bacteria.

Existe una gran variedad de mecanismos de control de expresión de genes de virulencia tales como los sistemas reguladores de dos componentes que son capaces de detectar cambios muy sutiles en el medio donde se encuentra la bacteria y activar de forma rápida genes que le permitan a la bacteria enfrentar de mejor manera estos cambios (8).

Sistemas reguladores de dos componentes

El sistema regulador de dos componentes, es el principal sistema en las bacterias para detectar ambientes hostiles o dañinos para ella y en consecuencia transduce señales dentro de la célula para activar cambios le confiere una mejor adaptación al ambiente. Esto fue descrito por Hall y Silhavy en *Escherichia coli*, ellos reportaron que los genes para proteínas de membrana externa (ompF y ompC) son regulados por dos proteínas: una proteína citoplasmática (OmpR) y una proteína de membrana (EnvZ) en respuesta a cambios en la osmolaridad (60). Este estudio sugirió que la información del ambiente que rodea a la bacteria, puede ser detectado a través de proteínas de membrana, y producir una transducción de señales. Desde entonces muchos sistemas similares han sido descritos gracias a análisis de genómica bacteriana (61). En el caso de *S. Typhimurium* los sistemas reguladores de dos componentes le permiten entre otras cosas llevar a cabo modificaciones estructurales a su LPS.

Modificaciones a la estructura del LPS

S. Typhimurium, posee entre sus sistemas de dos componentes el PhoP/PhoQ, que actúa como censor-cinasa y activador transcripcional respectivamente (62, 63), este sistema regula la activación y supresión de diversos genes. En *S. Typhimurium* el sistema PhoP/PhoQ regula genes necesarios para sobrevivir extra- e intracelularmente y le permitirle llevar a cabo modificaciones estructurales al lípido A de su LPS que entre otras propiedades, le confiere resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos (64).

PhoQ es una proteína integral de membrana con actividad histidina-cinasa, la cual es capaz de monitorear las condiciones del medio. Al activarse se autofosforila y le transfiere el grupo fosfato a un residuo conservado en la parte amino terminal de PhoP. El PhoP fosforilado se une a un promotor específico e induce o suprime la expresión de más de 40 genes llamados *phoP* activados (*pags*) o *phoP* reprimidos (*prgs*) respectivamente (65).

El análisis por espectroscopia de masas reveló que las modificaciones estructurales al lípido A reguladas por el sistema PhoP-PhoQ de *S. Typhimurium* involucran la adición de grupos aminoarabinosa y ácido 2-hidroximirístico al lípido A del LPS (65).

Hay evidencia de que el lípido A modificado estructuralmente, altera la expresión de la molécula de adhesión E-selectina en células endoteliales y la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en monocitos humanos (65).

Estudios con cepas de *S. Typhimurium* resistentes a polimixina mostraron que el lípido A presenta modificaciones dependientes de un segundo sistema regulador: PmrA/PmrB. La activación de PhoP-PhoQ estimula la actividad de PmrA-PmrB que a su vez regula la expresión de *pmrE*, el cual codifica para una UDP glucosa deshidrogenasa (UGD). UGD y enzimas codificadas en el operón *pmrHFIJKLMN* que están involucradas en la producción de amino-arabinosa y que al unirse al lípido A le confieren a la bacteria resistencia a péptidos catiónicos y polimixina (66-69).

Ambos sistemas reguladores se asocian para realizar funciones en conjunto. En recientes estudios con *S. Typhimurium* se describió la proteína PmrD que al parecer es el conector entre los sistemas reguladores ya mencionados, esta proteína es regulada por la activación del sistema PhoP-PhoQ, que tras su síntesis, se une a PmrA fosforilada estabilizando esta unión y permitiendo la transcripción de los genes relacionados con PmrA (61).

Hay evidencia de que mutaciones en genes relacionados con la biosíntesis del LPS provocan cambios en su estructura que impactan en su actividad biológica. Una

mutación en *lpxM* en *S. Typhimurium* produce un LPS con lípido A pentacilado, el LPS pentacilado indujo una disminución en la producción de TNF- α , IL-1 β y NOi (70) en ensayos de estimulación con CDs.

Diferentes grados de acilación en *E. coli* y *P. gingivalis* mostraron diferentes respuestas en células T antígeno específicas, así como producción diferencial de citocinas, esto también visto en distintas subpoblaciones de CDs (71).

La activación de PhoP-PhoQ por su parte, induce la expresión de PagL y PagP; los cuales son una 3-O deacilasa y una palmitoil transferasa respectivamente, lo que en conjunto da como resultado un LPS modificado en su lípido A, en específico una sustitución de un ácido 3-hidroximirístico por ácido palmítico. Este cambio disminuye la activación de NF- κ B del orden de unas 200 veces en células de ratón y células humanas transfectadas con TLR-4, lo cual sugiere que el reconocimiento por TLR-4 se relaciona íntimamente con los grados de acilación del LPS (72).

Hay evidencia de que el lípido A de la cepa *S. Typhimurium* de tipo silvestre ATCC 14028s, cambia cuando se inducen mutaciones en los operones *phoP-phoQ* o *pmrA-pmrB* (73).

John Gunn obtuvo cepas mutantes de *S. Typhimurium* que expresan constitutivamente los regulones PhoP o PmrA. La JSG-430 es una cepa *phoP^c pmrA⁻* que tiene la característica de presentar un lípido A principalmente heptacilado formado por un disacárido de D-glucosamina bifosforilado en 1 y 4', unidos entre sí por un enlace glucosídico β 1-6 (GlcN II-GlcNI). Las dos glucosaminas están sustituidas por ácido 3-hidroximirístico en las posiciones 2,3,2',3' y con sustituciones de grupos acilo secundarios en el hidroxilo del ácido 3-hidroximirístico en posición 3' por ácido hidroximirístico y en 2' por ácido láurico de la GlcP N II, además de una sustitución en el grupo acilo secundario con ácido palmítico en la posición 2 (66), teniendo como resultado un LPS heptacilado principalmente (**fig. 1**).

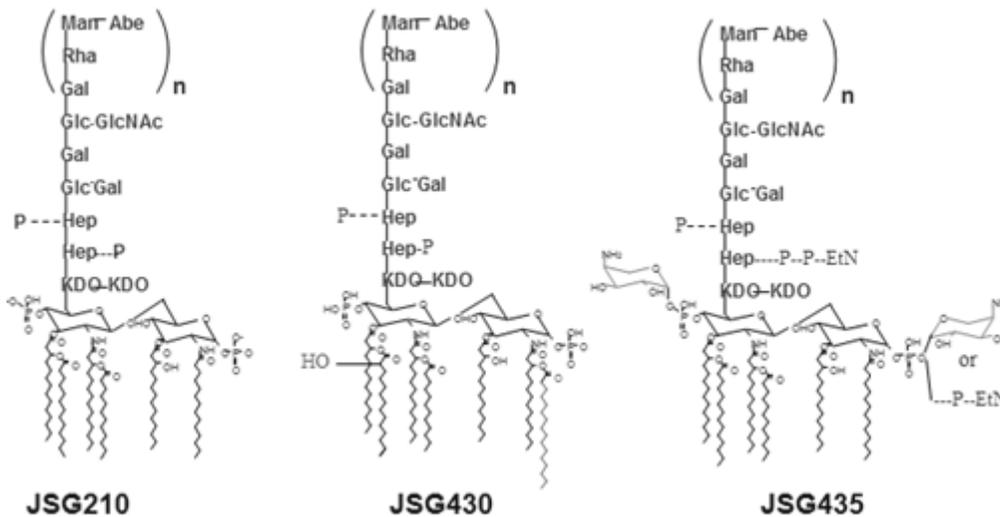


Figura 1: Estructura del LPS expresado por las distintas cepas de *S. Typhimurium* obtenidas por el Dr. Gunn y su grupo. Tomado de L. Guo et al, *Science* 276, 250 (abril 11, 1997)

La cepa JSG-435 es una cepa *pmrA505 zid::Tn10d-cam*, cuya diferencia respecto a la JSG-430 es que la JSG-435 adiciona en la posición 4' un grupo aminoarabinosa unido por un enlace fosfoéster (**fig. 1**) (66, 74, 75).

Como ya se mencionó *S. Typhimurium* es capaz de detectar cambios en el microambiente a través de sistemas de dos componentes. El sistema PhoP/PhoQ y el PmrA/PmrB activan o suprimen una variedad de genes que entre otros efectos son capaces de intervenir en la biosíntesis del LPS y modificar su estructura. En modelos *in vitro* se ha determinado que concentraciones milimolares de Mg^{2+} y algunos cationes divalentes inactivan a PhoQ (76-78) mientras que altas concentraciones de hierro y pH ácido activan PmrB (79), sin embargo, fue demostrado que *in vivo* las señales de pH, Mg^{2+} y hierro no son las responsables de la expresión de genes bajo el control de ambos regulones, que este grupo de genes se expresa desde que la bacteria se encuentra en el lumen del intestino y se plantea la posibilidad de que las modificaciones a la estructura del LPS responden a la necesidad de evadir la respuesta inmune innata en la fase temprana de la infección (80).

En ensayos *in vitro* las modificaciones al lípido A por medio de estos sistemas reguladores tienen un fuerte impacto en la respuesta inmune. Se ha observado que

macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) estimulados con el LPS purificado de las cepas JSG-430 (430) o la JSG-435 (435) tienen una menor producción de TNF- α , IL-6, IFN- γ y MCP-1 comparados con los MDMO estimulados con el LPS de la cepa tipo silvestre. Se ha observado que los MDMO estimulados con el LPS purificado de la cepa JSG-435 tienen una menor producción de óxido nítrico, estallido respiratorio e índice de quimiotaxis (Pastelín, et al, artículo en revisión para publicación).

Experimentos *in vivo* en los que se evaluó la capacidad de los LPS modificados de las cepas tipo silvestre, JSG-430 y JSG-435 de inducir la maduración de células presentadoras de antígeno en bazo mediante la medición de los marcadores CD80, CD86, CD40, CD69 y CPH II, se observó que los LPS 430 y 435 inducen una menor maduración de estas células (Pastelín, et al, artículo en revisión para publicación).

El reconocimiento del LPS tiene un papel fundamental en la inducción de una respuesta inmune durante las primeras horas de la infección (81). Para determinar el efecto de los LPS modificados estructuralmente en un modelo de infección *in vivo*, grupos de 5 ratones fueron infectados con una dosis sub-letal (10^4 UFC) de *Salmonella* Typhimurium cepa PhoP- co-administrada con el LPS purificado de las cepas JSG-430 o JSG-435 (**fig. 2**) (Pastelín, et al, artículo en revisión para publicación).

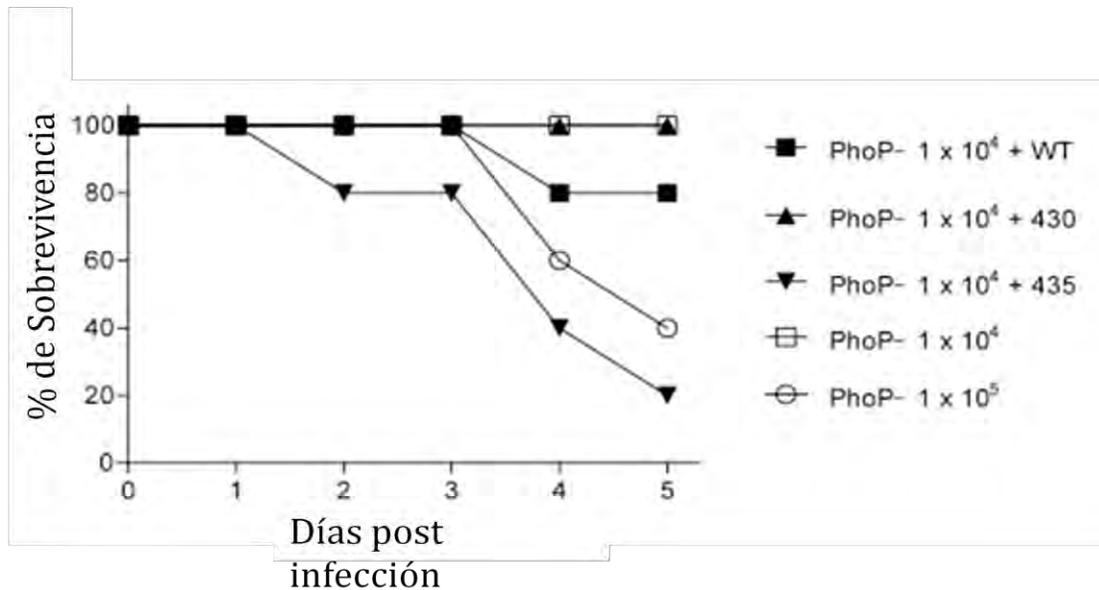


Figure 2 El LPS 435 aumenta la mortalidad de ratones infectados con *S. Typhimurium*. Grupos de 5 ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 10^4 UFC de *S. Typhimurium* cepa phoP- (dosis sub-letal). La bacteria fue co-administrada con $5\mu\text{g}$ del LPS de tipo silvestre (WT), el 430, 435, un grupo que fue inoculado con la bacteria sola (PhoP-) y un grupo control de mortalidad fue infectado con una dosis letal de 10^5 UFC para analizar mortalidad.

Los resultados muestran que los ratones que recibieron a la bacteria junto con el LPS 435 no controlan la infección y la mortalidad aumenta en comparación al grupo del LPS de tipo silvestre. Se utilizó una dosis letal de 10^5 UFC como control, al comparar este grupo con los ratones que recibieron a la bacteria junto con el LPS 435, estos últimos presentaron una mortalidad similar a la dosis letal mientras que el grupo del LPS de tipo silvestre y el 430 mantienen una mortalidad semejante a la dosis sub-letal, lo cual sugiere que las modificaciones del LPS 435 son las responsables de incrementar la susceptibilidad de estos ratones y que es durante la fase inicial de la infección; las primeras 24 horas, donde se podrían estar presentando alteraciones en la respuesta inmune del huésped que favorecen la infección.

Planteamiento del Problema

La evidencia acumulada sugiere que las modificaciones estructurales del LPS de *Salmonella Typhimurium* disminuyen la respuesta inmune durante la fase inicial de la infección, lo que le permite a la bacteria infectar de manera más eficiente, comprometiendo seriamente la sobrevivencia del huésped. Sin embargo, no se conocen los procesos moleculares como la producción de citocinas ni los procesos celulares como el reclutamiento celular durante el inicio de la infección que están involucrados en este fenómeno.

Hipótesis

El LPS modificado a través de los sistemas PhoP/PhoQ PmrA/PmrB de *Salmonella Typhimurium* disminuye la eficiencia del sistema inmune *in vivo*; interfiriendo en la producción de citocinas pro-inflamatorias, el reclutamiento de células del sistema inmune en el sitio de inoculación, permitiendo que la bacteria se disemine más eficientemente durante la fase inicial de la infección.

Objetivo General

Evaluar el efecto del LPS modificado de *Salmonella* Typhimurium en la producción de citocinas proinflamatorias, reclutamiento celular e invasividad de la bacteria durante la fase inicial de la infección *in vivo*.

Objetivos Particulares

- Determinar la producción de IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-6, MCP-1 e IL-2 de ratones infectados por vía intraperitoneal con una dosis sub-letal de *Salmonella* Typhimurium PhoP-, co-administrada con el LPS purificado de las cepas JSG-210, JSG-430 o JSG- 6, 12 y 24 horas posteriores a la infección.
- Determinar el reclutamiento al sitio de inoculación de diversas poblaciones celulares del sistema inmune; células NK, células dendríticas, macrófagos, linfocitos B1a y linfocitos B1b de ratones infectados co-administrados con los LPS modificados en las horas posteriores a la infección.
- Determinar la carga bacteriana en bazo de ratones infectados co-administrados con los LPS modificados en las horas posteriores a la infección.

Materiales y Métodos

Ratones

Se usaron ratones hembras de la cepa BALB/C de 6 a 8 semanas con peso entre 18 y 20 gramos. Los ratones fueron criados y mantenidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de bacteria atenuada *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP⁻ del fondo ATCC 14028s. La bacteria fue crecida en un tubo estéril con 5ml de medio LB durante 12 horas a 37°C con agitación continua de 120 rpm. Se transfirió una alícuota de 200µl a un tubo estéril con 5ml de medio Luria-Bertani (LB) para incubar durante 4 horas aproximadamente en las mismas condiciones de temperatura y agitación. El cultivo se detuvo cuando se alcanzó una densidad óptica de 1 a una longitud de onda de $\lambda=540$ nm lo cual equivale a 1×10^9 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro. De esta concentración se realizaron diluciones seriadas para alcanzar el inóculo necesario para cada experimento. Todo el proceso se realizó en hielo hasta el momento de la infección.

Lipopolisacáridos (LPS)

Se utilizó el LPS purificado por el método descrito por Darveau (82) de las cepas JSG-210 denominada tipo silvestre (WT), JSG-430 y JSG-435 cuya estructura molecular fue descrita por Gunn (74) y Guo (65). Los LPS modificados fueron donados amablemente por el doctor John S. Gunn de la Universidad del estado de Ohio.

Infección

Se realizaron dos diluciones seriales 1:10 del tubo con la bacteria 10^9 UFC/ml transfiriendo 1 ml del tubo de cultivo a un tubo estéril con 9 ml de PBS para llegar a una concentración de 10^7 UFC/ml, de esta concentración se realizaron los cálculos para obtener 10^4 UFC en 500 µl. La bacteria se co-administró con 5 µg de LPS tipo silvestre o

mutantes según el grupo experimental. La inoculación se realizó mediante una inyección intraperitoneal

Obtención de células de peritoneo

Se sacrificaron grupos de ratones a diferentes tiempos post-infección. Se introdujeron 5 ml de PBS estéril a 4°C en la cavidad peritoneal y se realizó un lavado. El líquido del lavado peritoneal fue colectado y centrifugado a 1 800 rpm durante 5 min. Las células fueron fijadas con 1 ml de solución fijadora (PBS + Formaldehído 4%), después de 20 minutos se agregaron 9 ml de PBS. Las células fijadas fueron centrifugadas y resuspendidas en 500 µl de PBS.

Obtención de muestras de sangre

Se realizó una punción en la vena maxilofacial para colectar una muestra de sangre. Se colectaron 400µl de sangre en tubos con gel separador de suero BD Microtiner™, posteriormente las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10 000 rpm a 4°C para obtener el suero y se guardaron a -70°C.

Obtención de células de bazo y ganglio linfático

Se extrajeron el bazo y los ganglios poplíteos de los ratones previamente infectados con equipo de disección estéril. Posteriormente, los órganos fueron disgregados mecánicamente en 5 ml de medio DMEM GIBCO®. El material disgregado fue filtrado a través de una malla de nylon (organza) y centrifugado a 1 800 rpm durante 5 minutos, los eritrocitos de las muestras de bazo, fueron lisados con 1 ml de buffer de lisis, después de 4 minutos se agregaron 9 ml de PBS y se volvió a centrifugar estas muestras. Las células fueron fijadas con 1 ml de solución fijadora, después de 20 minutos se agregaron 9 ml de PBS. Las células fijadas fueron centrifugadas y resuspendidas en 500 µl de PBS.

Determinación de carga bacteriana

El bazo fue extraído y posteriormente pesado en una caja petri. Se cortó un segmento de aproximadamente 0.04 g y fue disgregado mecánicamente en 1 ml de medio RPMI estéril. Se realizaron 3 diluciones seriales 1:10 y se realizó un estriado por duplicado con

100 µl de cada dilución en cajas con agar LB. Las cajas fueron incubadas durante 18 horas a 37°C y se contó el número de UFC.

Citometría de flujo

Se realizaron tinciones de células de ganglios linfáticos poplíteos, lavado peritoneal y bazo con anticuerpos monoclonales acoplados a flourocromos. Los anticuerpos fueron los siguientes: mAb anti-CD11c conjugado a PercP-Cy5, mAb anti-CD11c conjugado a APC, mAb anti-F4/80 conjugado a PE, mAb anti-GR 1 conjugado a APC, mAb anti-NK 1.1 conjugado a PE-Cy7, mAb anti-B220 conjugado a APC, mAb anti-CD5 conjugado a PE-Cy7, mAb anti-CD21 conjugado a FITC, mAb anti-CD23 conjugado a PE, mAb anti-CD86 conjugado a FITC, mAb anti-CD4 PE-Cy7 y mAb anti- CPH II conjugado a PE. Las tinciones se realizaron en placas de 96 pozos. Se agregaron las células en 100µl por pozo. La placa fue centrifugada a 2 000 rpm por 5 minutos. Se agregó el conjunto de anticuerpos en un volumen final de 100 µl, se incubaron durante 30 minutos a 4°C y la placa fue centrifugada, se retiro el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200µl de PBS.

Se determinó la producción de citocinas por citometría de flujo con el kit de inflamación para ratón de eBioscience™ de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El fundamento de este kit se basa en la utilización de perlas cubiertas con anticuerpos monoclonales que capturan citocinas, la intensidad media de flourescencia de las perlas es diferente para cada citocina. Las perlas se incuban con el suero durante 2 horas, se centrifugan los tubos y se agrega un conjunto de anticuerpos monoclonales acoplados a un flourocromo. El kit incluye los reactivos para realizar una curva estándar y así determinar la concentración de la citocina en cuestión en relación a la intensidad media de fluorescencia en el canal de lectura del flourocromo acoplado al anticuerpo.

La lectura de las muestras se realizó en el citómetro de flujo CyAn™ de Dako y los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo 7.5 de Tree Star.

Análisis Estadístico

Los análisis de citometría de flujo y carga bacteriana fueron graficados con el software Prism 5 de GraphPad™ y los análisis estadísticos se realizaron con SPSS ver. 17, aplicando las pruebas de Tukey y Scheffe.

Resultados

El LPS modificado de *S. Typhimurium* disminuye la producción de IL-6 y MCP-1 en sangre y el sitio de inoculación del LPS

Las citocinas son moléculas con un papel central en la respuesta inmune frente a microorganismos, su producción en la etapa temprana puede determinar el curso de la infección (83). En experimentos *in vitro* se observó que MDMO estimulados con los LPS 430 y 435 durante seis horas, presentan una reducción en la producción de citocinas pro-inflamatorias comparados con el LPS de tipo silvestre. Para determinar si este fenómeno se presenta también *in vivo*, grupos de 4 ratones BALB/c fueron inoculados por vía intraperitoneal con 5 µg de los LPS tipo silvestre, 430 o 435 (**fig. 3**). Seis horas posteriores a la inoculación se tomaron muestras de sangre y se realizó un lavado peritoneal para medir la producción de citocinas. Los resultados obtenidos concuerdan con las observaciones previas en los experimentos *in vitro*: comparando el LPS de tipo silvestre con los LPS modificados, la producción de IL-6 en suero, disminuye un 90% en el grupo 430 y cae a niveles por debajo del límite de detección en el grupo 435, mientras que en el lavado peritoneal la disminución es casi del 100% en el grupo 430 y del 75% en el grupo 435 respectivamente. De forma similar, la producción de MCP-1 disminuyó un 75% en el grupo 430 y un 85% en el grupo 435 en suero, y un 90% y 80% en los grupos 430 y 435 respectivamente en lavado peritoneal. Al parecer, el efecto sobre la producción de citocinas que se observa a nivel local también se presenta a nivel sistémico y en términos generales la respuesta frente al LPS modificado estructuralmente se encuentra alterada.

El sistema de medición de producción de citocinas que se usó, también permite hacer determinaciones de IL-12, IL-10, TNF- α e IFN- γ , al analizar estas citocinas no se observaron diferencias entre los grupos (datos no mostrados).

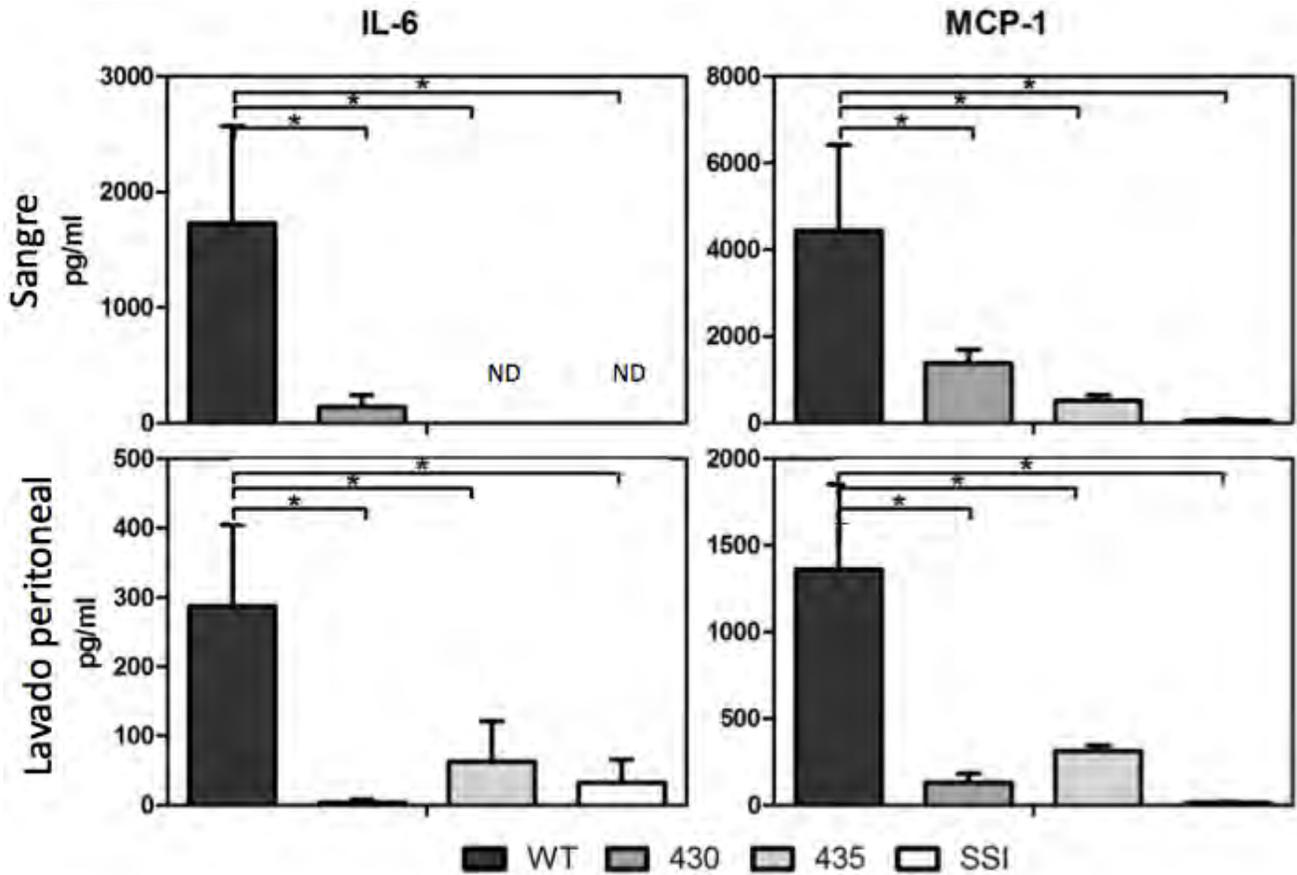


Figura 3: Los LPSs modificados estructuralmente por *S. Typhimurium* inducen una disminución en la producción de IL-6 y MCP-1 *in vivo*. Grupos de 4 ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal con 5µg de los LPS purificados de las cepas tipo silvestre (WT), JSG-430 o JSG-435. 6 horas después de la inoculación se tomaron muestras de sangre periférica y lavado peritoneal para determinar la producción de citocinas con el Kit de inflamación para ratón de BD™. Los resultados se analizaron con FlowJo™, se graficaron con Prisma 5™. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v.17™ (*=p<0.05).

Los LPS modificados reducen la producción de IL-6 y MCP-1 durante las primeras horas de infección con *S. Typhimurium*

En los experimentos *in vivo* se observó que la administración de los LPS 430 y 435 disminuyen la producción de citocinas pro-inflamatorias con respecto al LPS tipo silvestre, la siguiente pregunta que nos formulamos fue saber el efecto de los LPS modificados sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias en nuestro modelo de

infección. Para evaluar el efecto de los LPS modificados en nuestro modelo, grupos de 3 ratones fueron infectados con la dosis sub-letal de *S. Typhimurium* de la cepa *PhoP*⁻ con el LPS co-administrado de las cepas JSG-210, JSG-430 y JSG-435. Se decidió utilizar este sistema por que la cepa *phoP* es una bacteria atenuada incapaz de modificar su LPS a través de los sistemas PhoP/PhoQ y PmrA/PmrB y no libera vesículas de LPS (80). Al co-administrar los LPS se simula el proceso de liberación de vesículas y permite discriminar el efecto de las diferentes cepas de bacteria dadas sus características de virulencia e invasividad. A determinados tiempos post-infección, se tomaron muestras de sangre periférica para medir citocinas en el suero de los ratones infectados (**fig. 4**).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento anterior (**fig. 3**) seis horas post-infección, el grupo 430 presentó una disminución del 90% y 70% de IL-6 y MCP-1 respectivamente, mientras que el grupo 435 disminuyó un 80% y 60% de IL-6 y MCP-1 respectivamente, comparados con el grupo del LPS silvestre (**fig. 4**). Se realizaron mediciones 12 y 24 horas post-infección pero no se observaron diferencias entre los grupos (datos no mostrados).

El grupo con bacteria sin LPS co-administrado tuvo una producción casi nula de IL-6 y una producción del 30% de MCP-1 comparado con el grupo del LPS de tipo silvestre, en ambos casos la producción es similar a los grupos 430 y 435, lo cual parece indicar que el estímulo que reciben los ratones por parte de los LPS modificados no es suficiente para encender la vía de señalización responsable de la producción de estas citocinas. También se midió TNF- α , IL-10, IL-12 e IFN- γ con esta metodología y no se observaron diferencias entre los grupos (datos no mostrados).

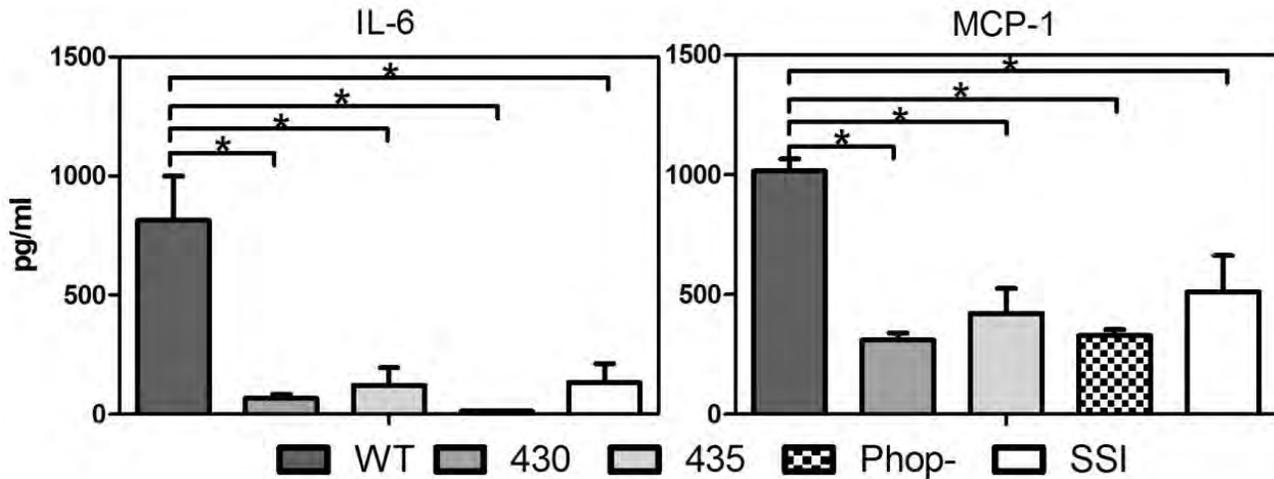


Figura 4: Los LPS modificados por *S. Typhimurium* disminuyen la producción de IL-6 y MCP-1 durante la fase inicial de la infección. Grupos de 3 ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 10^4 UFC de *S. Typhimurium* cepa phoP- (dosis sub-lethal). La bacteria fue co-administrada con $5\mu\text{g}$ del LPS de tipo silvestre (WT), el 430, 435 y un grupo que fue inoculado con la bacteria sola (Phop-). Se tomaron muestras de sangre periférica 6 horas post-infección para determinar la producción de citocinas con el kit de inflamación para ratón de de BD™. Los resultados se analizaron con FlowJo™, se graficaron con Prisma 5™. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v.17™ (*= $p < 0.05$).

El LPS 435 disminuye el porcentaje de CD de ratones infectados con *S. Typhimurium* en el sitio de inoculación

Los ligandos de TLR inducen la producción de citocinas que forman parte de un proceso inflamatorio lo cual involucra el reclutamiento celular al sitio de inoculación. El reclutamiento celular se relaciona con la eficiencia de la respuesta inmune que se genera. Se realizó una cinética de células dendríticas en el sitio de inoculación por la importancia que tiene esta población celular en la respuesta protectora contra la bacteria (58). Se observó que el porcentaje de células dendríticas en el sitio de inoculación tiende a la disminución en el grupo 430 y 435 comparados con el grupo del LPS de tipo silvestre durante las primeras veinticuatro horas post-infección (fig. 5). También se evaluó el porcentaje de CD en el bazo y se observó un menor porcentaje en los grupos 430 y 435 durante las primeras doce horas post-infección.

Nos interesó evaluar otras poblaciones celulares reclutadas en el sitio de inoculación, bazo y ganglios linfáticos poplíteos, tales como: macrófagos, células NK, monocitos pro-inflamatorios, linfocitos B1a y B1b (datos no mostrados).

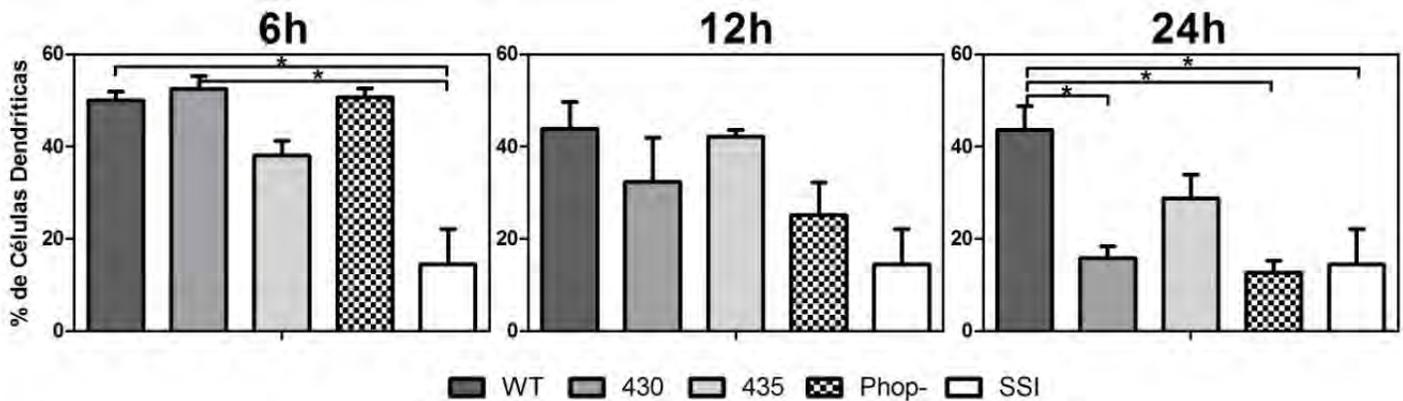


Figura 5: Los LPSs modificados estructuralmente por *S. Typhimurium* inducen un menor reclutamiento de CDs en el sitio de inoculación durante la fase inicial de la infección. Grupos de 3 ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 10^4 UFC de *S. Typhimurium* cepa phoP- (dosis sub-letal). La bacteria fue co-administrada con 5µg del LPS de tipo silvestre (WT), el 430, 435 y un grupo que fue inoculado con la bacteria sola (Phop-), se realizó un lavado peritoneal y se determinó el porcentaje de CDs reclutadas en el sitio de la inoculación. Se realizó una tinción en de las células del liquido del lavado peritoneal con los mAb anti-CD11c y mAb anti-F4/80. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo CyAn (Dako™) y los datos obtenidos fueron analizados subsecuentemente con FlowJo (TreeStar). Las células con fenotipo $CD11c^+ F4/80^-$ se consideraron como CDs.

El LPS modificado no interviene en la capacidad de replicación de la bacteria durante las primeras 24 horas de infección.

Durante el tiempo de infección donde se estudio la producción de citocinas y el reclutamiento celular, era importante determinar la carga bacteriana en los diferentes grupos, ya que los antecedentes mostraron que el grupo 435 presentó una infección tan agresiva como la dosis letal y que la carga bacteriana es mayor dos días después de su inoculación en comparación con el grupo del LPS de tipo silvestre (Pastelín, et al, artículo en revisión para publicación). Se determinó que durante las primeras 24 horas

de la infección no se presentan diferencias entre los grupos en la carga bacteriana del bazo (fig. 6).

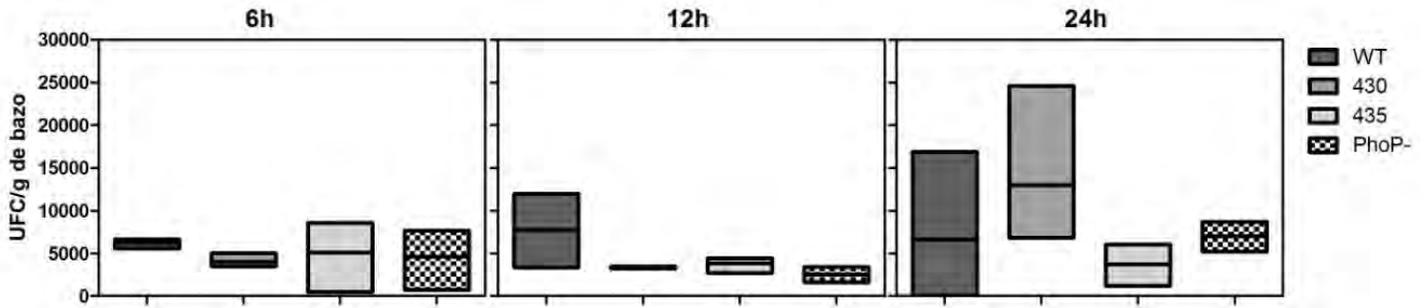


Figura 6: Los LPS modificados no alteran la carga bacteriana en bazo de ratones infectados con *S. Typhimurium*. Grupos de 3 ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 104 UFC de *S. Typhimurium* *phoP*- co-administrada con 5µg del LPS purificado del tipo silvestre, 430 o 435 y el grupo control de la bacteria sola. Se sacrificaron grupos de ratones 6, 12 y 24 horas post-infección, se extrajo el bazo y una fracción fue macerada en 1ml de medio DMEM, se realizó un estriado con una dilución 1:100 en cajas petri con medio TSA para contar UFCs.

Discusión

El desarrollo de patologías y el grado de virulencia de las bacterias como *Salmonella Typhimurium* son un ejemplo de los múltiples resultados posibles producto de la interacción huésped-parásito, en el fenómeno que estudiamos pudimos observar el efecto sobre la respuesta inmune de los LPS modificados por 2 regulones cuyo origen está relacionado evolutivamente con la incorporación más eficiente de iones de magnesio (84) pero que a través de la evolución se vio involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos y ahora en este trabajo se le relaciona con una respuesta inmune deficiente durante la fase inicial de la infección.

El modelo implementado para este trabajo posee una desventaja al no implementar la vía de infección natural, sin embargo, permite ver la interacción del sistema inmune del animal con la bacteria y los LPS modificados en un sitio donde se puede estudiar la reacción como producción de citocinas y reclutamiento celular.

El LPS 435 indujo una menor producción de IL-6 comparado con el LPS de tipo silvestre, este fenómeno es consistente tanto en la administración del LPS solo (**fig. 3**) como en el modelo de infección (**fig. 4**). Está descrito por varios grupos, que la IL-6 es una citocina que se produce en respuesta a la estimulación con LPS en un amplia gama de poblaciones celulares (85-87) y que ratones C3H/HeJ susceptibles a bacterias Gram-negativas no logran producirla (87), esto refleja la importancia de esta citocina para la respuesta inmune protectora. Es posible que las modificaciones en la estructura del LPS comprometan el reconocimiento de esta molécula y en consecuencia la producción de IL-6. Se sabe que la producción de IL-6 en respuesta al LPS está influenciada al menos en parte a TNF- α (85), esto es importante ya que 2 y 4 horas posteriores a la administración de los LPS 430 y 435 observamos una disminución de la producción de TNF- α comparada con el LPS de tipo silvestre (datos no mostrados).

Está reportado que IL-10 es capaz de disminuir la producción de IL-6 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 a través de BCL-3 inhibiendo la translocación de NF- κ B (86),

consideramos que es importante medir heterodímeros p50-p65 en núcleos de macrófagos estimulados con los diferentes LPS para identificar si este mecanismo se ve involucrado en la disminución de IL-6.

MCP-1 es otra quimiocina cuya producción se vio afectada al administrar los LPSs modificados, está reportado que la administración de MCP-1 previa al reto con bacterias Gram-negativas disminuye la tasa de mortalidad en un modelo de ratón (88) y más recientemente que MCP-1 protege a ratones de endotoxemia modulando la inflamación inhibiendo IL-12 y TNF- α a través de la producción de IL-10 e IL-4 (89). Es posible que la producción de MCP-1 esté relacionada con el incremento en la mortalidad observado.

El sistema utilizado para la cuantificación de citocinas permite detectar IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10, sin embargo, para IL-10 e IL-12 no se detectaron diferencias en la producción mientras que la producción de IFN- γ y TNF- α cayó por debajo del límite de detección (datos no mostrados).

Las células dendríticas tienen un papel fundamental en la iniciación y amplificación de la respuesta inmune innata y adaptativa, está descrito que cuando los monocitos se diferencian en células dendríticas modifican su capacidad de responder a bacterias Gram-negativas incrementando la producción de IL-12p70, TNF- α , IL-6 e IL-10 (90). Las células dendríticas estimuladas con LPS completan su proceso de maduración lo cual, involucra una reducción de la capacidad de tomar antígenos, aumento en la migración a órganos linfoides y la sobre expresión de CPH clase II y moléculas co-estimuladoras como CD80 o CD86 por lo que son muy eficientes para estimular linfocitos T (91). Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de células dendríticas disminuye en el sitio de la inoculación en los ratones que recibieron la bacteria junto con el LPS 435 (**fig. 5**), lo cual sugiere que el LPS modificado interviene con el reclutamiento y las funciones que desempeñan estas células durante la infección.

La capacidad de las CDs de estimular al linfocito T, es un aspecto importante en la respuesta inmune contra *S. Typhimurium*, se esperaba encontrar diferencias en las

moléculas CPH clase II y CD86, sin embargo, la expresión de estas moléculas en los grupos infectados no presento diferencias significativas (datos no mostrados).

La evaluación de carga bacteriana en bazo no mostró diferencias entre los grupos, es posible que durante la ventana de tiempo que elegimos para estos experimentos no se establezca una ventaja significativa para la replicación de la bacteria (**fig. 6**), sin embargo, en momentos posteriores a la infección (2 días post-infección) se establece una diferencia en carga bacteriana entre el grupo de LPS de tipo silvestre y el 435 (datos no mostrados).

Está descrito que ligandos de TLR tales como LPS, Poly (I-C) o CpG incrementan la capacidad fagocítica de macrófagos (92), tenemos antecedentes en nuestro laboratorio que muestran que al estimular macrófagos derivados de médula ósea de ratón con los LPS modificados donde no mostraron diferencias en su capacidad fagocítica sobre *S. Typhimurium*, sin embargo, se necesitan nuevos experimentos para corroborar estos datos y para identificar los macrófagos involucrados en este fenómeno.

Los resultados que se presentan muestran que los LPS modificados inducen una respuesta inmune menor comparados con el LPS de tipo silvestre durante la fase inicial de la infección. Es posible que un mecanismo de virulencia de la bacteria sea la modificación estructural de su LPS para evadir la respuesta inmune y así incrementar su capacidad de colonizar al huésped durante esta fase. Esta hipótesis que involucra la modificación a la estructura del LPS de la bacteria, ya ha sido planteada previamente por otros grupos de investigación (93).

Conclusiones

- Los LPS modificados estructuralmente de *S. Typhimurium* inducen una disminución en la producción de IL-6 y MCP-1 durante las primeras horas de infección.
- Los LPS modificados estructuralmente presentan una tendencia a disminuir el reclutamiento de células dendríticas durante las primeras horas de infección.
- Los LPS modificados estructuralmente de *S. Typhimurium* no intervienen en la capacidad de replicación de la bacteria durante las primeras horas de infección.

Bibliografía

1. B. R. Levin, M. Lipsitch, S. Bonhoeffer, *Science* **283**, 806 (February 5, 1999, 1999).
2. J. Lederberg, *Genetics* **153**, 1 (September 1, 1999, 1999).
3. A. Navas *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13728 (Aug 21, 2007).
4. M. Capaul, D. Ebert, *Evolution* **57**, 249 (Feb, 2003).
5. E. Decaestecker, A. Vergote, D. Ebert, L. De Meester, *Evolution* **57**, 784 (Apr, 2003).
6. D. Ebert, J. J. Bull, *Trends Microbiol* **11**, 15 (Jan, 2003).
7. J. Hacker, G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, H. Tschape, *Mol Microbiol* **23**, 1089 (Mar, 1997).
8. C. Altier, *J Microbiol* **43 Spec No**, 85 (Feb, 2005).
9. M. McClelland *et al.*, *Nature* **413**, 852 (Oct 25, 2001).
10. S. Zhang *et al.*, *Infect Immun* **71**, 1 (Jan, 2003).
11. F. Baquero, *Nat Rev Microbiol* **2**, 510 (Jun, 2004).
12. R. L. Santos *et al.*, *Microbes Infect* **3**, 1335 (Nov-Dec, 2001).
13. M. D. Kraus, B. Amaty, Y. Kimula, *Mod Pathol* **12**, 949 (Oct, 1999).
14. P. A. Gulig, R. Curtiss, 3rd, *Infect Immun* **56**, 3262 (Dec, 1988).
15. M. Hensel *et al.*, *Science* **269**, 400 (Jul 21, 1995).
16. M. K. Bhan, R. Bahl, S. Bhatnagar, *Lancet* **366**, 749 (Aug 27-Sep 2, 2005).
17. C. M. Parry, T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, J. J. Farrar, *N Engl J Med* **347**, 1770 (Nov 28, 2002).
18. B. D. Jones, N. Ghori, S. Falkow, *J Exp Med* **180**, 15 (Jul 1, 1994).
19. J. H. Niess, H. C. Reinecker, *Cell Microbiol* **8**, 558 (Apr, 2006).
20. H. Hamada *et al.*, *J Immunol* **168**, 57 (Jan 1, 2002).
21. R. L. Modlin, M. B. Brenner, *Curr Opin Immunol* **21**, 365 (Aug, 2009).
22. S. Akira, *Immunol Rev* **227**, 5 (Jan, 2009).
23. S. Akira, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 143 (2009).
24. C. L. Sokol *et al.*, *Nat Immunol* **10**, 713 (Jul, 2009).
25. J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky, M. S. Jordan, *Annu Rev Immunol* **27**, 591 (2009).
26. M. E. Bianchi, *J Leukoc Biol* **81**, 1 (Jan, 2007).
27. I. E. Brodsky, R. Medzhitov, *Nat Cell Biol* **11**, 521 (May, 2009).
28. R. Medzhitov, *Nature* **454**, 428 (Jul 24, 2008).
29. S. Manicassamy, B. Pulendran, *Semin Immunol* **21**, 185 (Aug, 2009).
30. D. Heumann, T. Roger, *Clin Chim Acta* **323**, 59 (Sep, 2002).
31. S. A. Linehan, D. W. Holden, *Immunol Lett* **85**, 183 (Jan 22, 2003).
32. P. Mastroeni, N. Menager, *J Med Microbiol* **52**, 453 (Jun, 2003).
33. B. Raupach, S. H. Kaufmann, *Curr Opin Immunol* **13**, 417 (Aug, 2001).
34. P. Mastroeni, B. Villarreal-Ramos, C. E. Hormaeche, *Microb Pathog* **13**, 477 (Dec, 1992).
35. M. A. Dobrovolskaia, S. N. Vogel, *Microbes Infect* **4**, 903 (Jul, 2002).
36. H. W. Mittrucker, S. H. Kaufmann, *J Leukoc Biol* **67**, 457 (Apr, 2000).
37. J. W. Conlan, *Infect Immun* **64**, 1043 (Mar, 1996).
38. M. Silva, C. Song, W. J. Nadeau, J. B. Matthews, B. A. McCormick, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G1024 (Jun, 2004).
39. G. L. Abrahams, M. Hensel, *Cell Microbiol* **8**, 728 (May, 2006).
40. M. Cella, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, *Curr Opin Immunol* **9**, 10 (Feb, 1997).
41. L. Ohl *et al.*, *Immunity* **21**, 279 (Aug, 2004).
42. B. A. Imhof, M. Aurrand-Lions, *Nat Rev Immunol* **4**, 432 (Jun, 2004).

43. H. von Boehmer, F. Melchers, *Nat Immunol* **11**, 14 (Jan).
44. H. W. Mittrucker, B. Raupach, A. Kohler, S. H. Kaufmann, *J Immunol* **164**, 1648 (Feb 15, 2000).
45. H. Nikaido, *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 593 (Dec, 2003).
46. R. S. Munford, *Infect Immun* **76**, 454 (Feb, 2008).
47. I. Walev, P. Vollmer, M. Palmer, S. Bhakdi, S. Rose-John, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7882 (Jul 23, 1996).
48. P. S. Tobias, R. I. Tapping, J. A. Gegner, *Clin Infect Dis* **28**, 476 (Mar, 1999).
49. O. Takeuchi *et al.*, *Immunity* **11**, 443 (Oct, 1999).
50. E. A. Groisman, H. Ochman, *Trends Microbiol* **5**, 343 (Sep, 1997).
51. D. Hersh *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2396 (Mar 2, 1999).
52. J. Jantsch *et al.*, *Cell Microbiol* **5**, 933 (Dec, 2003).
53. M. Hensel, *Mol Microbiol* **36**, 1015 (Jun, 2000).
54. S. I. Miller, *Mol Microbiol* **5**, 2073 (Sep, 1991).
55. J. E. Shea, C. R. Beuzon, C. Gleeson, R. Mundy, D. W. Holden, *Infect Immun* **67**, 213 (Jan, 1999).
56. S. R. Waterman, D. W. Holden, *Cell Microbiol* **5**, 501 (Aug, 2003).
57. M. Rescigno *et al.*, *Nat Immunol* **2**, 361 (Apr, 2001).
58. J. H. Niess *et al.*, *Science* **307**, 254 (Jan 14, 2005).
59. R. E. Harrison *et al.*, *Mol Biol Cell* **15**, 3146 (Jul, 2004).
60. M. N. Hall, T. J. Silhavy, *Annu Rev Genet* **15**, 91 (1981).
61. Y. Eguchi, R. Utsumi, *Trends Biochem Sci* **30**, 70 (Feb, 2005).
62. D. R. Dixon, R. P. Darveau, *J Dent Res* **84**, 584 (Jul, 2005).
63. E. A. Groisman, *J Bacteriol* **183**, 1835 (Mar, 2001).
64. T. J. Bourret, M. Song, A. Vazquez-Torres, *Infect Immun* **77**, 5107 (Nov, 2009).
65. L. Guo *et al.*, *Science* **276**, 250 (Apr 11, 1997).
66. J. S. Gunn, W. J. Belden, S. I. Miller, *Microb Pathog* **25**, 77 (Aug, 1998).
67. J. S. Gunn, S. I. Miller, *J Bacteriol* **178**, 6857 (Dec, 1996).
68. B. W. Noland *et al.*, *Structure* **10**, 1569 (Nov, 2002).
69. R. Tamayo, S. S. Ryan, A. J. McCoy, J. S. Gunn, *Infect Immun* **70**, 6770 (Dec, 2002).
70. R. Kalupahana, A. R. Emilianus, D. Maskell, B. Blacklaws, *Infect Immun* **71**, 6132 (Nov, 2003).
71. B. Pulendran *et al.*, *J Immunol* **167**, 5067 (Nov 1, 2001).
72. K. Kawasaki, R. K. Ernst, S. I. Miller, *J Biol Chem* **279**, 20044 (May 7, 2004).
73. J. S. Gunn, R. K. Ernst, A. J. McCoy, S. I. Miller, *Infect Immun* **68**, 3758 (Jun, 2000).
74. J. S. Gunn *et al.*, *Mol Microbiol* **27**, 1171 (Mar, 1998).
75. J. S. Gunn, S. S. Ryan, J. C. Van Velkinburgh, R. K. Ernst, S. I. Miller, *Infect Immun* **68**, 6139 (Nov, 2000).
76. S. Chamnongpol, W. Dodson, M. J. Cromie, Z. L. Harris, E. A. Groisman, *Mol Microbiol* **45**, 711 (Aug, 2002).
77. E. Garcia Vescovi, F. C. Soncini, E. A. Groisman, *Cell* **84**, 165 (Jan 12, 1996).
78. E. G. Vescovi, Y. M. Ayala, E. Di Cera, E. A. Groisman, *J Biol Chem* **272**, 1440 (Jan 17, 1997).
79. M. M. Wosten, L. F. Kox, S. Chamnongpol, F. C. Soncini, E. A. Groisman, *Cell* **103**, 113 (Sep 29, 2000).
80. M. Merighi, C. D. Ellermeier, J. M. Slauch, J. S. Gunn, *J Bacteriol* **187**, 7407 (Nov, 2005).
81. H. J. Ko *et al.*, *J Immunol* **182**, 2305 (Feb 15, 2009).
82. R. P. Darveau, R. E. Hancock, *J Bacteriol* **155**, 831 (Aug, 1983).

83. M. Svensson, C. Johansson, M. J. Wick, *Microb Pathog* **31**, 91 (Aug, 2001).
84. D. Beier, R. Gross, *Curr Opin Microbiol* **9**, 143 (Apr, 2006).
85. M. R. Shalaby, A. Waage, L. Aarden, T. Espevik, *Clin Immunol Immunopathol* **53**, 488 (Dec, 1989).
86. J. Dagvadorj *et al.*, *Innate Immun* **15**, 217 (Aug, 2009).
87. P. de Man *et al.*, *Infect Immun* **57**, 3383 (Nov, 1989).
88. Y. Nakano *et al.*, *Infect Immun* **62**, 377 (Feb, 1994).
89. D. A. Zisman *et al.*, *J Clin Invest* **99**, 2832 (Jun 15, 1997).
90. H. Karlsson, P. Larsson, A. E. Wold, A. Rudin, *Infect Immun* **72**, 2671 (May, 2004).
91. F. Granucci *et al.*, *Microbes Infect* **1**, 1079 (Nov, 1999).
92. C. E. Wong, S. Sad, B. K. Coombes, *Infect Immun* **77**, 4750 (Nov, 2009).
93. A. L. St John, S. N. Abraham, *Nat Med* **15**, 1259 (Nov, 2009).