



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“USO DE LA PORINA OmpC de *Salmonella enterica*
serovar Typhi COMO ADYUVANTE PARA LA
MEJORA DE VACUNAS INACTIVADAS CONTRA
LA INFLUENZA PANDÉMICA A (H1N1).”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

EVELIN MORALES NUÑO



MÉXICO, D.F.

2011



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	Rodolfo Pastelin Palacios
Vocal	Constantino III Roberto López Macías
Secretario	Enrique Ortega Soto
1°. Suplente	Julio Cesar Martínez Álvarez
2°. Suplente	Gibran Pérez Montesinos

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

Dr. Constantino III Roberto López Macías

ASESOR

M. en C. Mario Adán Moreno Eutimio

SUPERVISOR TÉCNICO

Evelin Morales Nuño

SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

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

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

Al M en C Mario Adán Moreno por su apoyo en todo momento como asesor de mi proyecto y al realizar experimentos del presente trabajo, por su paciencia y ayuda al revisar el presente trabajo y por haberme compartido parte de sus conocimientos. Mil gracias.

A la M en C. Mireille Gutiérrez Mendoza por sus consejos como amiga y por su apoyo en las técnicas que realicé para este trabajo. Mil gracias madre.

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

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

Al MVZ Juan Francisco Quezada por las facilidades prestadas con el virus de Influenza Pandémica A (H1N1) y por sus consejos para realizar la técnica de inhibición de la hemaglutinación.

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

Al Instituto de Ciencia y Tecnología (ICYT) por el financiamiento del proyecto FIS/IMSS/PROT/713, No. CNIC: R-2009-785-084.

DEDICATORIA

A mi madre: Rosa Elena Nuño Romero por apoyarme siempre en mis estudios, porque estuviste ahí cuando más te necesitaba como madre y como amiga, por tus consejos y ayudarme a seguir adelante, gracias a ti logré terminar la carrera.

MIL GRACIAS mami.

A mi hermana: Jacqueline Morales por siempre darme consejos, además de ayudarme a estudiar. Muchas gracias hermanita.

A mis hermanos por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A ti que has estado a mi lado a lo largo de este trabajo apoyándome, gracias por tus críticas hacía este trabajo y mil gracias por estar siempre ahí cuando te necesitaba. MIL GRACIAS AMOR.

INDICE

1	RESUMEN.....	9
2	INTRODUCCIÓN.....	11
2.1	Virus de Influenza	11
2.2	Influenza pandémica A (H1N1)	15
2.3	Vacunas	15
2.3.1	Vacunas contra la influenza.....	17
2.4	Adyuvantes	17
2.5	Adyuvantes aprobados para uso en humanos.	20
2.6	Porinas de Salmonella typhi.....	21
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4	HIPÓTESIS.....	26
5	OBJETIVO GENERAL.....	27
5.1	Objetivos particulares.....	27
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1	Antígenos	28
6.2	Anticuerpos	28
6.3	Animales de laboratorio.....	29
6.4	Obtención del virus de influenza pandémica A (H1N1)	29
6.4.1	Producción de virus de influenza pandémica A (H1N1) en huevos embrionados de pollo SPF.....	29
6.4.2	Cosecha del virus de influenza pandémica A (H1N1).....	30
6.5	Inactivación del virus:	30
6.6	Titulación del virus:.....	31
6.7	Sueros de ratón:.....	32
6.8	Evaluación del efecto adyuvante inducido por la porina OmpC	32

6.9	Determinación de títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos por la vacuna de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1).	34
6.9.1	Tratamiento de sueros con enzima destructora de receptor.....	34
6.9.2	Titulación del virus.....	35
6.9.3	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación.....	35
6.10	Evaluación de los isotipos de anticuerpos inducidos por la vacuna de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1) mediante Western Blot.....	36
6.10.1	Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
6.10.2	Transferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa. ...	37
6.10.3	Revelado con sustrato cromogénico.....	38
7	RESULTADOS.....	39
7.1	Inactivación y titulación del virus de influenza pandémica A (H1N1).	39
7.2	Efecto adyuvante de la porina OmpC de <i>Salmonella typhi</i> sobre la respuesta de anticuerpos en una vacuna experimental de virus inactivado influenza pandémica A (H1N1).	41
7.3	La porina OmpC de <i>S. typhi</i> como adyuvante en una vacuna experimental de virus inactivado influenza pandémica A (H1N1) induce cambio de isotipo de anticuerpos contra el virus.	46
8	DISCUSIÓN.....	49
9	CONCLUSIONES.....	52
10	BIBLIOGRAFÍA.....	53

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
APC	Células presentadoras de antígeno
CLR	Receptores tipo lectina tipo C
DCs	Células dendríticas
DTH	Respuesta de hipersensibilidad tardía
H1N1	Virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009
HA	Hemaglutinina
HEL	Lisozima de huevo de gallina
IFN γ	Interferon γ
Ig	Inmunoglobulina
IH	Inhibición de la hemaglutinación
IL	Interleucina
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MDP	Muramildipéptido
MPL-A	Monofosforil lípido A
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptores tipo NOD
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
Omp	Proteína de membrana externa
PA	Polimerasa ácida
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno

PB	Polimerasa básica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón
TDM	Dimicolatos de trehalosa
Th1	Linfocitos T cooperadores de tipo 1
TLR	Receptores tipo toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
RLR	Receptores tipo RIG
RNP	Ribonucleoproteína
RNA	Ácido ribonucleico
RNAv	Ácido ribonucleico viral
SR	Receptores Scavenger
SSI	Solución salina isotónica
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi
vRNApol	RNA polimerasa viral dependiente de RNA.

1 RESUMEN

La vacunación ha sido la mejor estrategia para el control de enfermedades infecciosas. Su objetivo principal es el establecimiento de la memoria inmunológica para conferir protección de larga duración frente a la infección y/o re-infección. Sin embargo, el bajo grado de inmunogenicidad y capacidad protectora de la mayoría de las vacunas ha creado la necesidad de buscar adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados. La porina OmpC de *Salmonella typhi* es una proteína de membrana externa que permite el paso de solutos neutros o catiónicos, tanto al interior como al exterior de la célula, la cual tiene capacidad adyuvante intrínseca cuando se co-administra con antígenos modelo, además, es reconocida por células de la respuesta inmune innata a través de receptores tipo Toll (TLR), por lo que podría ser buen candidato para la mejora de formulaciones vacunales.

Durante el año 2009, el virus de influenza humana A (H1N1) generó una pandemia que tuvo como epicentro a México. Se ha descrito que en pandemias por el virus de la influenza se presentan incrementos importantes de mortalidad y morbilidad que duran unas semanas y luego ceden para reaparecer meses después, este comportamiento se presenta a lo largo de uno a tres años. Debido a esto, es importante mejorar las vacunas de influenza ya existentes, permitiendo disminuir la dosis de antígeno vacunal, permitiendo así tener un mayor número de dosis, para lograr una mayor cobertura en la población y así interrumpir la transmisión de este tipo de virus en su hospedero. Por lo que en el presente estudio se utilizó

la porina OmpC de *Salmonella typhi* como adyuvante de una vacuna experimental de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1). Para lo cual se inmunizaron ratones BALB/c con la vacuna experimental de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1) más porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante, se tomaron muestras de sangre a ratones a diferentes días posteriores a la inmunización y se determino el título de anticuerpos contra el virus, mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación. Los resultados sugieren que la porina OmpC de *S. typhi* permite disminuir la dosis de antígeno en la vacuna experimental de virus de influenza pandémica A (H1N1) e inducir altos títulos de anticuerpos en contra del virus.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Virus de Influenza

La influenza es una infección altamente contagiosa, afecta primordialmente el tracto respiratorio, es causada por los virus de influenza. El virus de la influenza pertenece a la familia de los *Orthomyxoviridae*. Se clasifica en cinco tipos, los más importantes son el virus de influenza tipo A, virus de influenza tipo B y virus de influenza tipo C, conocidos también como tipo A, B Y C respectivamente. Su clasificación se basa en las diferencias que hay en la matriz interna y las nucleoproteínas[1].

El virus de influenza es un virus de RNA mono catenario de polaridad negativa, compuesto por ocho segmentos (tipos A y B) asociados a proteínas, contenidos dentro de una matriz protéica. Todo lo anterior se encuentra dentro de una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera[2]. En su bicapa lipídica tiene dos glicoproteínas ancladas: la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA), en proporción aproximada de cuatro a uno respectivamente, además de que se encuentra la proteína de matriz 2 (M2), cuya relación con respecto a la HA es de uno a diez. También cuenta con la proteína de matriz 1 (M1), que es una proteína estructural del virión, asociada íntimamente con la bicapa lipídica de la envoltura del virus, de manera que está muy próxima a los complejos ribonucleoprotéicos (RNP), conformados por los segmentos de RNA virales (RNA_v) asociados tanto a la nucleoproteína (NP) como a la RNA polimerasa heterotrimérica dependiente de RNA (vRNA_{pol}), así como pequeñas cantidades de proteína de exporte nuclear o

proteína no estructural 2 (NS2). La composición de la vRNAPol incluye tres subunidades: dos polimerasas básicas (PB1 y PB2) y una polimerasa ácida (PA)[3].

El genoma segmentado del virus de influenza permite el cambio antigénico (*antigenic shift*), en el cual una cepa de virus de influenza A adquiere el segmento de HA, y probablemente el de NA, proveniente de otro virus de influenza de diferente subtipo. Cuando varias cepas de virus (de origen animal y/o humano) se encuentran en una misma célula, se favorece este fenómeno de recombinación. El resultado puede ser un virus que codifica proteínas antigénicas completamente nuevas contra las cuales no existe inmunidad previa. Estos cambios pueden además aumentar la virulencia de las nuevas cepas. La deriva antigénica (*antigenic drift*), consiste en mutaciones puntuales en la estructura del virus y es responsable del surgimiento de las cepas estacionales anualmente[3].

Las proteínas de membrana HA y NA son proteínas necesarias para el virus, ya que mediante la HA el virus puede unirse a los receptores de las células para posteriormente ser endocitado, la acidez del compartimiento endosomal provoca un cambio conformacional en la HA, exponiendo así un péptido de fusión que interviene en la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal, lo que abre un poro a través del cual el RNP viral es liberado en el citoplasma de la célula huésped[3], además de que hemaglutina a los eritrocitos, por otro lado la NA ayuda a que el virus se libere de las células hospederas mediante la eliminación del ácido siálico, también se le ha atribuido actividad en el proceso de infección, debido a que ayuda a romper las mucinas en el tracto respiratorio, permitiendo así la penetración del virus a través del epitelio respiratorio. Además favorece la

liberación de pequeñas cantidades de proteínas M2 que sirven como canal iónico, permitiendo la entrada de iones de hidrogeno al interior del virus, generando una acidez interna, rompiendo así las interacciones proteína-proteína de la cápside lo que permite la liberación de los RNPs virales al citoplasma de la célula hospedera[3, 4].

Los virus de influenza tipo A puede infectar tanto animales como a humanos y es el causante de brotes estacionales y pandémicos, debido a sus continuas mutaciones.

Los virus de tipo A se subclasifican de acuerdo a las diferencias antigénicas de las glicoproteínas de su superficie, la HA y la NA. Hasta la fecha se conocen 16 subtipos antigénicos de HA y 9 de NA aislados de aves acuáticas [1, 3], de las cuales únicamente tres HA (H1, H2 y H3) y dos NA (NA1 y NA2) han establecido linajes estables dentro de la población humana y han causado brotes epidémicos importantes, caracterizados por transmisión sostenida, amplia y de persona en persona[5].

La influenza es una enfermedad altamente contagiosa y ha afectado a los humanos desde la antigüedad[6].

Una de las primeras epidemias fue reportada por Hipócrates (412 a.c) y otras más fueron reportadas en la edad media. Datos de 1500 a 1800 d.c. indican que han ocurrido epidemias relativamente frecuentes pero irregulares, ya que la enfermedad aparentemente desaparece por periodos de tiempo [3,6]. En 1933 los investigadores Wilson Smith, Sir Christopher Andrewes y Sir Patrick Laidlaw en Reino Unido aislaron el virus de influenza tipo A en hurones y en 1940 Thomas

Francis aisló el virus de influenza tipo B. En el año de 1950 Walter Shafer en Alemania mostró que la peste aviar era causada por el virus de influenza y que éste podía propagarse en la cavidad alantoide del embrión de pollo[6, 7].

A lo largo del siglo pasado se registraron tres pandemias que cobraron alrededor de 50 millones de vidas:

La primera pandemia del siglo pasado fue “La pandemia Española” en el año de 1918 a 1919 causada por el virus de influenza A (H1N1) de origen aviar primario, fue particularmente severa, causando alrededor de 20 a 40 millones de muertes alrededor del mundo[6, 7].

La segunda pandemia fue en febrero de 1957 conocida como la “Gripe Asiática” la cual se originó en el sur de China fue causada por un recombinante de humano-aviar, que introdujo los genes del virus aviar H2HA y N2NA en las poblaciones humanas, además de que el virus también poseía un gen PB1 originario del virus aviar, esta pandemia causó más de 70 000 muertes en Estados Unidos[6, 7].

La tercer pandemia del siglo pasado aconteció en Hong Kong en 1968, donde los virus de subtipo H2N2 fueron reemplazados por un recombinante humano-aviar que posee un gen H3HA de origen aviar, y una vez más el gen PB1 se deriva de un virus aviar, se estima que en los Estados Unidos, murieron 33.800 personas a causa de la “gripe de Hong Kong” [3,6].

En 1997 se reportaron 18 personas infectadas con el virus de influenza aviar altamente patógena del subtipo H5N1 en Hong Kong ocasionando seis muertes. Éste fue el primer reporte de infecciones fatales en humanos con virus de la gripe aviar [6, 7].

En Abril del 2009 México fue sede de la primera pandemia de influenza del siglo XXI causada por el virus de influenza pandémica A (H1N1) propagándose de humano a humano con gran rapidez.

2.2 Influenza pandémica A (H1N1)

El virus de influenza pandémica A (H1N1) de 2009 se identificó en abril de ese año, este virus causó la primera pandemia de influenza del siglo XXI. El virus A (H1N1) lleva en los genes tres linajes: porcino clásico de Norteamérica y porcino euroasiático, aviar norteamericano y humano, como resultado, estos virus poseen genes PB2 y PA de Norte América (de origen aviar), un gen PB1 de origen humano del virus H3N2, los genes HA (H1), NP, NS de origen clásico del virus porcino, y los genes NA (N1) y M de origen euroasiático porcino. Sin embargo, el gen PB1 similar a la humana y la aviar PB2 han estado circulando en los cerdos desde 1997/1998 y probablemente han sido objeto de adaptación a los cerdos. Estos virus no poseen marcadores asociados con virus de alta patogenicidad. Sin embargo el virus sigue sufriendo mutaciones puntuales generando cambios en sus determinantes antigénicas[7].

2.3 Vacunas

La vacunación ha sido la mejor estrategia para el control de enfermedades infecciosas. Su objetivo principal es el establecimiento de la memoria inmunológica para conferir protección de larga duración frente a la infección y/o re-infección[8].

Los primeros prototipos de vacunas eran a base de microorganismos atenuados, como son la vacuna contra viruela y la vacuna contra el cólera de las aves [9, 10].

El procedimiento de atenuación fue utilizado por Pasteur, también para el desarrollo de la vacuna contra la rabia y el ántrax, posteriormente, Calmette - Guérin y Theiler retomaron esta práctica para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis y la fiebre amarilla, respectivamente[11-13].

Con el avance de las técnicas experimentales, se llegó a la atenuación de otros virus, haciéndose factible el desarrollo de vacunas contra la polio (Sabin), sarampión y varicela[14-16]. De manera casi paralela se tomó como estrategia el empleo de microorganismos inactivados en el desarrollo de vacunas, siendo de los primeros ejemplos la vacuna contra la tifoidea, el cólera y la vacuna inactivada contra la polio la cual se empleó junto con la Sabin en la campaña de vacunación para el control de la polio paralítico[17-19].

Con el transcurso del tiempo, en un intento 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, para el desarrollo de vacunas se ha preferido la purificación y uso de subunidades de microorganismos[20]. Sin embargo estos presentan baja inmunogenicidad y capacidad de inducir una respuesta protectora, por lo que es necesario el uso de moléculas que puedan potencializar la respuesta inmune conocidas como adyuvantes [21].

En el desarrollo de vacunas, la elección del adyuvante es tan importante como la selección del antígeno. Los mecanismos por los cuales funcionan los adyuvantes

aun no están del todo esclarecidos, sin embargo algunos estudios demuestran que los adyuvantes pueden ser reconocidos por TLRs u otros PRRs lo que les confiere su capacidad adyuvante[23].

2.3.1 Vacunas contra la influenza

La rápida propagación de nuevas cepas de virus de influenza con potencial pandémico, han promovido la búsqueda de vacunas más seguras y efectivas contra la enfermedad. Varias metodologías se han empleado, entre las que se incluyen:

Vacunas de virus inactivados o atenuados: Se basan en la utilización de embriones de pollo para producir virus que posteriormente son inactivados o atenuados. Son ampliamente utilizadas para la generación de las vacunas que previenen la influenza estacional. Su constitución incluye a cepas del virus A (H1N1), A (H3N2) y la cepa tipo B.

Vacunas con subunidades: emplean proteínas virales purificadas de los virus producidos en embrión de pollo u obtenidas de forma recombinante en cultivos de líneas celulares de mamífero o de insecto. La HA es la proteína más usual y se propone a M2 (ectodominio M2e) presente en todos los virus de influenza A para la “universalización” de la vacuna[22]. Sin embargo este tipo de vacunas necesita el uso de adyuvantes para potenciar la respuesta.

2.4 Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados. Los adyuvantes representan

un componente importante de muchas de las vacunas exitosas, particularmente las basadas en subunidades de patógenos, incluyendo subunidades purificadas de los patógenos y antígenos recombinantes[24]. El término adyuvante se deriva del latín *adjuvare* que significa ayudar. Su desarrollo está enfocado en la activación de la respuesta inmune innata para así regular una fuerte respuesta inmune adaptativa y la memoria de larga duración[25].

Se espera que la administración de adyuvantes promueva el establecimiento de inmunidad de larga duración. Recientemente, se ha considerado dentro de los mecanismos a través de los cuales funcionan los adyuvantes su capacidad de activar la respuesta inmune innata, lo que tiene como consecuencia una mejor activación de los linfocitos T y linfocitos B [24].

Las estrategias de defensa innata inician por el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Estos PAMPs que son reconocidos, son compuestos estructural y químicamente diversos, pero comparten en común la característica de estar altamente conservados en los patógenos y ausentes en los organismos multicelulares. Esta estrategia está mediada por diversas familias de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se han conservado a través de la evolución. Se han descrito una gran variedad de familias de PRRs, como son los receptores scavenger (SR), receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG (RLR) y receptores tipo lectina (CLR), todos estos receptores tiene la función de reconocer PAMPs. [26, 27]. El uso de ligandos de TLRs es una estrategia prometedora en la búsqueda de nuevos adyuvantes [26, 27].

Es importante tomar en cuenta que los agentes infecciosos y la mayoría de las vacunas disponibles, contienen todos los componentes necesarios para la activación de una respuesta inmune integral. Esto es porque los patógenos empleados en las vacunas poseen todos los antígenos relevantes en forma particulada y además contienen PAMPs. Sin embargo, el objetivo del diseño de vacunas es remover productos tóxicos para lo cual se han purificado los antígenos y/o producido de manera recombinante, sin afectar la inmunogenicidad del antígeno de interés[24], pero generalmente al ser purificados los antígenos pierden inmunogenicidad, por lo que se requiere reintroducir selectivamente las señales de activación de la respuesta inmune y esto se consigue mediante adyuvantes.

La activación a través de TLR es probablemente un importante mecanismo a través del cual las vacunas vivas atenuadas confieren inmunidad protectora. Por lo anterior la disponibilidad de adyuvantes adecuados, seguros y efectivos es decisiva en el desarrollo de las nuevas vacunas. Los adyuvantes deben potenciar la inmunogenicidad de antígenos con un grado de pureza elevado o recombinantes, deben permitir reducir la cantidad de antígeno, deben disminuir el número de re-inmunizaciones requeridas para proveer una inmunidad protectora, deben aumentar la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunocomprometidas, deben ser materiales baratos, no tóxicos, estables, biodegradables y deben promover inmunidad de larga duración tanto humoral como mediada por células [28-31].

Sin embargo, el marcado efecto inmunopotenciador de la mayoría de los adyuvantes está relacionado directamente con su toxicidad. Uno de los objetivos del desarrollo actual en materia de adyuvantes, consiste en disminuir al máximo su toxicidad y los efectos indeseables (dolor, inflamación local, necrosis en el sitio de la inyección o en zonas adyacentes, linfadenopatías regionales, etc), sin afectar el efecto inmunopotenciador [32-34].

2.5 Adyuvantes aprobados para uso en humanos.

A pesar de la constante investigación en el campo de los adyuvantes, actualmente solo se cuentan con dos adyuvantes aprobados por la FDA para el uso en humanos, las sales de aluminio que se utilizan en diferentes preparaciones vacunales de uso en humano y el Monofosforil Lípido A (MPL A) recientemente aprobado[35].

Actualmente se sabe que la alúmina además de formar depósitos de antígeno, es capaz de activar la molécula Nalp3 o criopirina que se asocia con Asc y la procaspasa1 para formar un complejo llamado inflamasoma, resultando en el procesamiento de la procaspasa-1 para generar su forma activa. La caspasa-1 activa es necesaria para generar las citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-18 y IL-33); interesantemente este proceso es dependiente de la fagocitosis de la alúmina. Por otra parte otro grupo de investigadores muestran evidencia de que la inducción de necrosis resulta en la producción de ácido úrico, que es capaz de activar Nalp3 en las células presentadoras de antígeno (APC)[36].

Todos estos datos sugieren que la alúmina por un lado promueve la entrada de antígeno y por otro genera un ambiente inmunoestimulador local en el sitio de inyección. Sin embargo entre las limitaciones del uso de la alúmina como adyuvante se encuentran: la generación de reacciones locales, la producción de anticuerpos de tipo IgE y la ineffectividad para algunos antígenos. También hay reportes de la neurotoxicidad del aluminio. Además se conoce que la alúmina no es biodegradable y se detecta en el sitio de la inoculación al año de haber sido inyectada[37, 38].

Por lo que resulta necesario la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades adyuvantes que permitan el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales y/o mejoramiento de las ya existentes.

2.6 Porinas de *Salmonella typhi*

La superficie de bacterias tienen un gran número de moléculas con potencial adyuvante debido a que son potentes estimuladores de la respuesta inmune[39]. Uno de los componentes principales y altamente inmunogénicos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas lo constituyen las proteínas denominadas porinas[40].

Las porinas son las proteínas más abundantes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Cada bacteria expresa alrededor de 10^5 moléculas en su superficie [41]. El término porina fue utilizado por primera vez para clasificar a las proteínas que formaban poros en la membrana externa de *Escherichia coli*. Su función principal es la de permitir el paso selectivo de moléculas protegiendo así a

las bacterias de los efectos de los antibióticos, sales biliares, defensinas, etc [42, 43].

Estas proteínas se ensamblan en trímeros compuestos de subunidades idénticas, cada subunidad consiste en 16 hojas β -plegadas anti-paralelas unidas por asas con algunas α -hélice 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 forma al cerrarse las estructuras β -plegadas de forma pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo amino de la hoja β -1. (figura1)

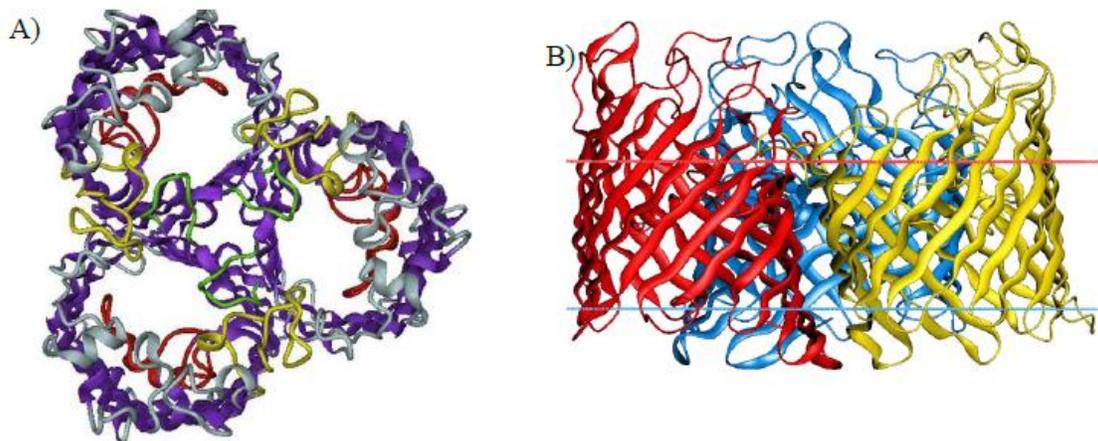


Figura 1. Modelo tridimensional de la porina OmpC de E. coli. A) En color morado se observan las estructuras β plegadas éstas son unidas por asas externas observadas en color amarillo y asas internas de color rojo. Vista por arriba. B) Trímero de la porina OmpC de E. coli vista de lado (Tomado de Besle et al., 2006).

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

β. El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre las diferentes porinas se localiza en las 8 asas externas, y por lo tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros[44]

Salmonella typhi (*S. typhi*) expresa en su superficie a las porinas OmpC y OmpF principalmente, éstas porinas tienen un peso molecular de aproximadamente 36 y 38kDa respectivamente, también puede expresar a las porinas OmpS1 y OmpS2 las cuales se producen en bajas concentraciones y la porina OmpA, la cual, es termosensible[45].

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica se identificó que las porinas de *S. typhi* (*OmpC* y *OmpF*), son blanco de la respuesta inmune contra *S. typhi* en pacientes con fiebre tifoidea, éstas se purificaron y los estudios de protección en ratones demostraron que inducen el 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. typhi*. También se demostró que estas proteínas son el blanco no sólo de los anticuerpos, sino también de linfocitos T[46].

Por lo anterior la unidad diseñó una vacuna a base de porinas de *S. typhi* a la que se le denominó Isipor, que además de inducir la protección, es capaz de inducir una respuesta inmune de memoria y no requiere de cadena fría para su transporte y almacenamiento, por ser estable a temperatura ambiente[47]. Esta vacuna se encuentra actualmente en estudio clínico fase I en el cual se demostró que es segura para su aplicación en humanos [47].

Las porinas de *S. typhi* (*OmpC* y *OmpF*) tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune de anticuerpos de larga duración, además de que estos anticuerpos de larga duración tienen capacidad bactericida [48]. En estudios

recientes se demostró que las porinas de *S. typhi* son capaces de señalar a través de TLR-2 y TLR-4/MD2/CD14, los cuales han sido descritos como receptores implicados en la adyuvancia, además de que inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 en macrófagos derivados de médula ósea[49].

Estudios donde evalúan la capacidad adyuvante de las porinas de *S. typhi* al administrarlos con antígenos modelo, poco inmunogénicos como es la lisozima de huevo de gallina (HEL), se encontró que las porinas de *S. typhi* tienen efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos específicos contra HEL que se mantiene hasta 400 días post inmunización, mientras que la respuesta contra HEL cae a títulos basales a partir del día 30[50]. Estos datos muestran que las porinas presentan capacidad adyuvante intrínseca de larga duración contra antígenos modelo lo que sugiere que las porinas podrían utilizarse como adyuvantes para la generación de inmunidad de larga duración al aplicarla con vacunas ya establecidas, como puede ser la vacuna de virus de influenza pandémica A(H1N1) inactivado.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es necesario contar con moléculas que permitan mejorar la respuesta inmunitaria de antígenos vacunales o mejorar las vacunas ya existentes, la porina mayoritaria de *Salmonella entérica serovar Typhi* (OmpC) es una molécula altamente inmunogénica, capaz de inducir una respuesta de anticuerpos de larga duración sin embargo se desconoce si la porina OmpC puede mejorar la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna experimental del virus de influenza pandémica A (H1N1) inactivado.

4 HIPÓTESIS

La porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi es capaz de aumentar la respuesta inmune humoral contra el virus de influenza pandémica A (H1N1).

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad adyuvante de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi en la vacuna experimental de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1).

5.1 Objetivos particulares

- Inactivar el virus de influenza pandémica A (H1N1) mediante el método de formalina.
- Evaluar el efecto adyuvante de la porina OmpC de *S. typhi* en la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos por la vacuna de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1).
- Evaluar las subclases de anticuerpos inducidos por la vacuna de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Antígenos

- OmpC purificada por el método de Nikaido a partir de *S. typhi* STYC302. Producidas en la UIMIQ, lote: 1012-1.
- Lipopolisacarido (LPS) de *E. coli* 011B4; (Sigma, CA,USA)
- Virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 producido en AVIMEX, lote: 03-12-2010.

6.2 Anticuerpos

- Anti IgM de ratón con peroxidasa (HRP): lote: 650062^a. No: 61-6020. Marca: Invitrogen, Camarillo, CA, USA.
- Anti IgG de ratón con peroxidasa (HRP): lote: 650062^a. No: 61-6020. Marca: Invitrogen, Camarillo, CA, USA.
- Anti IgG1 de ratón con peroxidasa (HRP): lote: 60203476. No: 61-0120. Marca: Zymed, S. San Francisco, CA, USA.
- Anti IgG2a de ratón con peroxidasa (HRP): lote: 268021^a. No: 61-0220. Marca: Zymed, S. San Francisco, CA, USA.
- Anti IgG2b de ratón con peroxidasa(HRP): lote: 60303899. No: 61-0320. Marca: Zymed, S. San Francisco, CA, USA.
- Anti IgG3 de ratón con peroxidasa (HRP): lote: 650062^a. No: 61-6020. Marca: Invitrogen, Camarillo, CA, USA.

6.3 Animales de laboratorio.

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 5 a 6 semanas de edad de peso que oscila entre 17-22 g. adquiridos en Harlan México, mantenidos en micro-aisladores en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM y conservados en condiciones convencionales en el mismo sitio. Los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos institucionales y las regulaciones nacionales sobre las buenas prácticas del manejo de animales.

6.4 Obtención del virus de influenza pandémica A (H1N1)

Para poder realizar la inmunización de los ratones con el virus de influenza pandémica A (H1N1) inactivado, fue necesario obtener el virus mediante la inoculación de virus de influenza *A/Mexico/4482/2009* en huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos (SPF) y posteriormente inactivarlo con el método de formalina.

6.4.1 Producción de virus de influenza pandémica A (H1N1) en huevos embrionados de pollo SPF.

Para la producción del virus de influenza pandémica A (H1N1) se inocularon 30 huevos embrionados de pollo a los que previamente se les realizó una ovoscopia y se marcó con una línea el lugar en donde empieza el líquido alantoideo.

Posteriormente se desinfectó el cascarón en el lugar de inoculación con yodo, justo sobre el marcaje que se realizó en la ovoscopia, que indica en donde empieza el líquido alantoideo. Con el grabador se perforó el cascarón en medio de la línea.

Se inocularon los huevos embrionados de pollo con 1000 $\text{DIEP}_{50\%}$ en un volumen total de 200 μL de PBS inyectando en el orificio previamente realizado y con un ángulo de 90° con respecto al cascarón. Una vez que se inocularon los huevos

embrionados de pollo el orificio se selló con una gota de resistol. Posteriormente los embriones se incubaron durante 72 horas a 37°C. Transcurrido dicho tiempo se sacrificaron los embriones mediante refrigeración a 4°C por dos horas.

6.4.2 Cosecha del virus de influenza pandémica A (H1N1)

Una vez sacrificados los embriones se removió la tapa de los cascarones. Se tomó de cada embrión 100µL de líquido alantoideo y se colocaron en una placa de aglutinación. Se les agregó una gota de suspensión de eritrocitos de pollo al 2% y se agitó suavemente.

Los embriones que aglutinaron se consideraron como positivos. Solo se cosecharon los embriones cuyo resultado fue positivo.

Con una jeringa inclinada se cosechó el líquido alantoideo, sin tocar el embrión. El líquido debe ser claro y no verse sanguinolento. El líquido se colectó en un tubo estéril de polipropileno. Posteriormente se congeló el líquido alantoideo a -70°C hasta su uso. Para inactivarlo con formalina se descongeló y centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en tubos cónicos de 50 mL.

6.5 Inactivación del virus:

El virus de influenza pandémica A (H1N1) se inactivo mediante el método de formalina, esto se realizó en condiciones de esterilidad. Antes de inactivar el virus A(H1N1), se título mediante la técnica de hemaglutinación, una vez que se tuvo el título de Unidades Hemaglutinantes (UHA); el virus se colocó en agitación constante y se agregó por goteo 0.67mL de formalina¹, se dejó agitar por 3 minutos, esto se repite por cuatro ocasiones, posteriormente se agregó por goteo

¹ La concentración de formalina es un secreto industrial de la empresa AVIMEX S.A. de C.V.

1.33 mL de formalina y se agitó durante 2 minutos, durante 8 ocasiones, una vez que se agregó al virus de influenza A(H1N1) un volumen total de 13.32mL de formalina se agitó por 7 minutos y se vertió en un frasco de plástico, se incubó por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez que transcurrieron las 24 horas se tituló el virus H1N1 mediante la técnica de hemaglutinación para obtener el título de UHA final; se inoculó 100µL del virus inactivado en seis embriones de pollo para confirmar la inactivación del virus.

6.6 Titulación del virus:

El virus se tituló mediante la técnica de hemaglutinación. Se etiquetó una placa de 96 pozos con fondo en U. Se agregó 50µL de PBS a los pozos del 2 al 12 en tres carriles consecutivos. En los primeros pozos que quedaron vacíos se agregó 100µL del virus de influenza A (H1N1) inactivado y se realizaron las diluciones seriadas 1:2 del virus, transfiriendo 50µL del primer pozo al siguiente y homogeneizando 4 veces, se diluyó de esta manera los 12 pozos y se desechó los 50µL restantes. Para el control de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% (ckRBCs), se colocó 50 µL de PBS en los pozos del 1 al 12 en un cuarto carril. Una vez que se realizaron las diluciones del virus se agregó 50µL de la suspensión de ckRBC a todos los pozos de los cuatro carriles. Se mezcló manualmente agitando las placas y se incubó a temperatura ambiente hasta que los ckRBC de los pozos control (cuarto carril) sedimentaron, se registraron los resultados tomando como título de UHA el pozo donde se presentó la última hemaglutinación.

Para la inoculación del virus en embriones de pollo, se tomaron seis embriones de pollo y se marcaron donde empieza la capsula de aire, cada embrión de pollo se perforó en la marca, se tomó 1mL del virus H1N1 inactivado con una jeringa de 1 mL y se inoculó 100µL del virus en cada embrión, se sello cada embrión de pollo y se incubaron a una temperatura de 37°C con una atmosfera de 70% de humedad durante tres días.

6.7 Sueros de ratón:

Los ratones fueron sangrados por la vena facial, colectando 200µL de sangre en tubos microtainer con gel separador (Becton Dickison, CA, USA). La sangre se centrifugó a 2500rpm durante 5 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero fue almacenado a -70°C hasta el momento de su utilización.

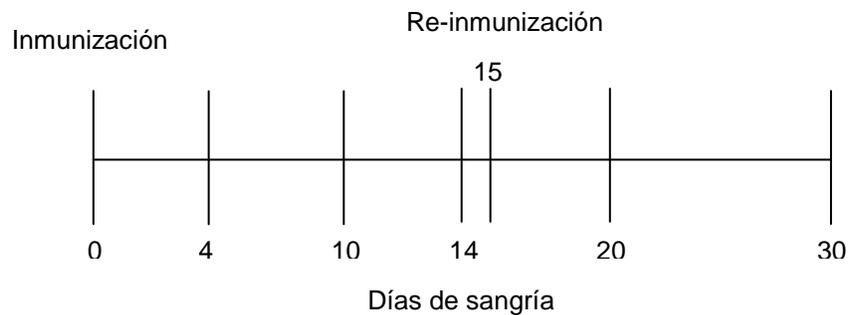
6.8 Evaluación del efecto adyuvante inducido por la porina OmpC

Grupos de cuatro ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal, con 4, 8 ò 16 UHA de virus H1N1 sin adyuvante, con 4, 8 ò 16 UHA de virus H1N1 más 10 µg de la porina OmpC como adyuvante en un volumen total de 500 µL, utilizando como vehículo solución salina isotónica (SSI). La distribución de los grupos se muestra en la tabla 1. Las muestras de sangre se obtuvieron por sangría de la vena facial en los días señalados.

Tabla No 1. Esquema general de inmunización

Grupo	Antígeno (Dosis en UHA)	Vía de administración	Porina (Dosis µg)	Re-inmunización (Día)	Toma de muestra sanguínea
1	H1N1 (4 UHA)	i.p	OmpC (10µg)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
2	H1N1 (8 UHA)	i.p	OmpC (10µg)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
3	H1N1 (16 UHA)	i.p	OmpC (10µg)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
4	H1N1 (4 UHA)	i.p	LPS (2ng)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
5	H1N1 (8 UHA)	i.p	LPS (2ng)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
6	H1N1 (16 UHA)	i.p	LPS (2ng)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
7	H1N1 (4 UHA)	i.p	Alúmina (100µg)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
8	H1N1 (8 UHA)	i.p	Alúmina (100µg)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
9	H1N1 (16 UHA)	i.p	Alúmina (100µg)	15	4, 10, 14, 20, 30, 60
10	H1N1 (4 UHA)	i.p		15	4, 10, 14, 20, 30, 60
11	H1N1 (8 UHA)	i.p		15	4, 10, 14, 20, 30, 60
12	H1N1 (16 UHA)	i.p		15	4, 10, 14, 20, 30, 60
13	Líquido alantoideo	i.p		15	4, 10, 14, 20, 30, 60
14	Solución Salina isotónica	i.p		15	4, 10, 14, 20, 30, 60

Esquema general de inmunización



6.9 Determinación de títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos por la vacuna de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1).

Para determinar el título de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación se realizó la técnica de inhibición de hemaglutinación. Para esto se analizaron los sueros de los días 4, 10, 14, 20, 30 y 60 de los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales.

6.9.1 Tratamiento de sueros con enzima destructora de receptor

Los sueros fueron tratados con la enzima destructora del receptor (RDE; Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo, Japan) para evitar la unión inespecífica de eritrocitos o anticuerpos a otros componentes del suero, como podrían ser el complemento o proteínas con residuos similares al ácido siálico. La RDE se reconstituyó con 20 mL de SSI al 0.85%.

Para el tratamiento de los sueros con RDE se colocó 100µL de suero en tubos para micro centrifuga de 1.5mL (un tubo para cada suero), se le adicionó 300µL de RDE, en un tubo se colocó únicamente la RDE, este último es el control para RDE, se homogeneizaron las muestras y posteriormente se incubaron durante 20 horas a 37°C en baño María. Al terminar el tiempo de incubación, los sueros se incubaron por 60 minutos a 56°C en baño María para inactivar la RDE así como el complemento. Al finalizar la incubación los sueros se dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente agregar a cada tubo SSI al 0.85% para llevarlos a un volumen de 1.0mL, para obtener una dilución del suero 1:10.

6.9.2 Titulación del virus

Antes de realizar la técnica de inhibición de hemaglutinación es necesario titular el virus de influenza pandémica A (H1N1), para obtener una solución viral de 4 UHA. El virus se tituló por triplicado en una placa de micro-titulación de 96 pozos con fondo en V, se colocó 50µL de PBS en las filas A, B y C en los pozos 2 al 12 y en la fila D en los pozos 1 a 12, esta fila es para el control de eritrocitos, posteriormente se agregó 100µL de virus en los pozos A1, B1 y C1; y se realizaron diluciones seriadas 1:2, tomando 50µL del virus de los pozos A1, B1 y C1, y colocándolos en los pozos A2, B2 y C2 homogeneizando cuatro veces, las diluciones se realizan hasta los pozos 12, los 50µL sobrantes se desecharon, una vez que se realizaron las diluciones se colocó 50µL de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% (ckRBC) en todos los pozos (fila A a la D), la placa se incubó a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos sedimentó y se prosiguió a leer, se tomo como título el valor recíproco de la dilución que presentó hemaglutinación. Al obtener el título del virus se realizó la dilución con PBS estéril para obtener una solución de virus con título de 4 UHA y se re-título por triplicado para verificar que la solución de virus tuviera un título de 4 UHA.

6.9.3 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

Los sueros se titularon por duplicado en placas de micro-titulación de 96 pozos con fondo en V. Las placas se rotularon en el orden en que fueron asignados los sueros tratados. A cada placa se le agregó 50µL de PBS en los pozos 2 a 11, se agregó 100µL en el pozo 12, este pozo se asignó para el control de eritrocitos. Posteriormente en los primeros pozos se adicionaron 100µL de cada uno de los

sueros tratados (A1-F1), en las filas G1 y H1 se colocaron los sueros positivos, a todos los sueros se les realizó una dilución 1:2 de los pozos 1 al 10, se desecharon los 50µL sobrantes. En los pozos 11 se agregó 50µL de suero tratado para tener el control negativo individual para cada muestra. Después de que se realizaron las diluciones de los sueros se colocó 50µL de virus H1N1 con un título de 4UHA en los pozos 1 al 10 (A-H), las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, una vez que terminó el tiempo de incubación se adicionó 50µL de solución de eritrocitos al 0.5% en toda la placa y se incubó a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos sedimentara, aproximadamente 30 minutos, se prosiguió a leer cada una de las placas; se tomó como título de anticuerpos inhibitorios de cada suero el valor recíproco de la dilución que presentó una inhibición total de la hemaglutinación.

6.10 Evaluación de los isotipos de anticuerpos inducidos por la vacuna de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1) mediante Western Blot.

6.10.1 Electroforesis de proteína en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE se efectuó de acuerdo al método de Laemmli en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Biorad) y sistemas de geles discontinuos. El gel separador contenía 9.74% de acrilamida, 0.26% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de tris-HCl 0.35M pH 8.8. El gel introductor contenía 4.2% de acrilamida, 0.12% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125M pH 6.8 que contenía SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol

al 0.005%. Las muestras que se cargaron en los geles fueron: el virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1) y como controles se utilizaron el Líquido alantoideo, porinas de *S. typhi* y ovoalbúmina. Las muestras se analizaron en condiciones reductoras y desnaturalizadas. Para las condiciones reductoras el amortiguador de muestra contenía β -mercaptoetanol al 5%, las muestras se desnaturalizarón a 95°C durante 8 minutos. El corrimiento electroforético se llevo a cabo a 50 volts.

6.10.2 Transferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa.

Una vez que el corrimiento electroforético de las muestras terminó, el gel se colocó en el equipo de transferencia iBlot Gel Transfer System (Invitrogen) para realizar la transferencia de las muestras. Se realizó la transferencia utilizando el programa 2 a 23 volts por 16 minutos. Una vez terminada la transferencia se procedió a bloquear los sitios inespecíficos con solución bloqueadora (leche descremada 5% en TBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un shaker a 60 rpm. Al pasar los 30 minutos, la membrana se lavó en 4 ocasiones con TBS- Tween 20 al 0.05% (TBS-T) durante 5 minutos cada lavado, y una vez con TBS durante 5 minutos. Se adicionó el primer anticuerpo anti-virus H1N1, éste es un pool de sueros de ratón anti-H1N1 de cada grupo (se usó una membrana de nitrocelulosa para cada grupo de ratones), a una dilución 1:200 en solución de bloqueo y se incubó a 4°C a 60 rpm toda la noche. Al término de la incubación se lavó con TBS- Tween 20, por 6 ocasiones cada una por 5 minutos y una vez con TBS durante 5 minutos. Se agregó el segundo anticuerpo HRP-conejo anti ratón de las subclases IgG1, IgG2a o IgG2b en una dilución 1:400 en solución de

bloqueo. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente a 60 rpm. Al final de la incubación se lavó con TBS-Tween 20, por 4 ocasiones, cada una de 10 minutos, con TBS-Tween20 y una vez con TBS durante 10 minutos.

6.10.3 Revelado con sustrato cromogénico

Una vez que se terminó de lavar la membrana se adicionó la solución reveladora (solución de 4-cloro-alfa-naftol), hasta observar bandas (revelado aproximado de 10 minutos). Una vez que se observaron las bandas la membrana se lavó con agua destilada, se secó y se protegió de la luz.

7 RESULTADOS

7.1 Inactivación y titulación del virus de influenza pandémica A (H1N1).

Para obtener el antígeno viral para la vacuna experimental de virus inactivado de influenza A (H1N1), se inocularon huevos embrionados de pollo en la cavidad alantoide con 8 UHA de virus de influenza A (H1N1), cinco días posteriores a la inoculación se recuperó el líquido alantoideo. Una vez que se recuperó el líquido alantoideo, se prosiguió a determinar el título hemaglutinante del virus de influenza A (H1N1) activo (Tabla No. 2); posteriormente se inactivó el virus con formalina, como ya se describió anteriormente en materiales y métodos. Se determinó el título hemaglutinante del virus H1N1 inactivado para observar si la formalina afecta su capacidad hemaglutinante del virus, estos resultados se muestran en la Tabla No 2.

Para verificar si la inactivación del virus de influenza A (H1N1) con formalina fue adecuada, se inocularon seis huevos embrionados de pollo, después de cinco días de incubación, a cada embrión de pollo se le extrajo líquido alantoideo para determinar título hemaglutinante, el cual fue negativo para cada uno de los huevos embrionados.

Tabla No 2. Título hemaglutinante del virus H1N1 antes y después del tratamiento con formalina, Evaluación de capacidad infectiva del virus H1N1 tratado con formalina

	Muestra	Unidades hemaglutinantes (UHA) ¹
	Virus activo de Influenza A (H1N1)	32
	Virus inactivado de Influenza A (H1N1)	16
Líquido alantoideo de embriones de pollo inoculados con virus inactivo	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	6	0

¹. Se realizó por triplicado la determinación del título hemaglutinante.

Una vez verificada la adecuada inactivación del virus de influenza A (H1N1) con formalina, se prosiguió a determinar la presencia del virus, mediante un Western Blot. Se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (SDS PAGE) del virus inactivado de influenza A (H1N1), posteriormente se transfirió las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se reveló con un suero policlonal de ratón anti-virus de influenza A (H1N1). En la membrana se observó la banda de la Hemaglutinina cuyo peso molecular corresponde a 75 kDa (Figura 2).

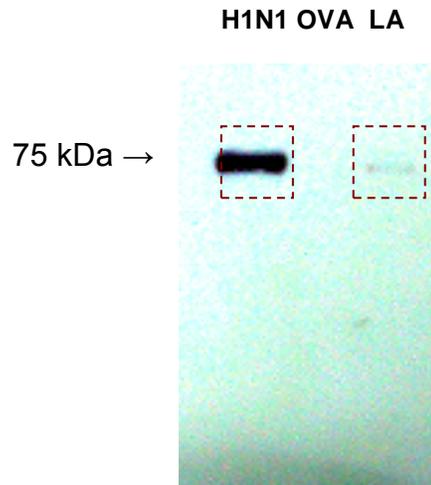


Figura 2. Identificación del virus de influenza A (H1N1) inactivado con formalina Se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 10%, del virus inactivado de influenza A (H1N1), posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se trató con un suero policlonal de ratón anti-virus de influenza A (H1N1) y se reveló con un segundo anticuerpo anti-IgG total de ratón marcado con peroxidasa, la cual se hizo reaccionar con α -naftol. En el carril 1 se colocó 1.5 UHA de virus H1N1 inactivado, en el carril 2 se colocó 5 μ g de Ovoalbúmina (OVA), y en el carril 3 se colocó 10 μ L de Líquido alantoideo (LA).

7.2 Efecto adyuvante de la porina OmpC de *Salmonella typhi* sobre la respuesta de anticuerpos en una vacuna experimental de virus inactivado influenza pandémica A (H1N1).

Estudios previos realizados con porinas de *S. typhi* han demostrado que la administración de 10 μ g de porinas, en conjunto con antígenos modelo, puede potenciar la respuesta de anticuerpos contra el antígeno con el que se co-administraron las porinas. Sin embargo no se sabe si las porinas pueden ser usadas como adyuvantes en una vacuna experimental de virus inactivado contra la influenza pandémica A (H1N1) y si esta nueva formulación es capaz de inducir

mayores títulos de anticuerpos contra el virus en comparación con el virus inactivado sin adyuvante.

Para evaluar el efecto adyuvante de la porina OmpC de *S. typhi* al co-administrarla con el virus inactivado de influenza A (H1N1), ratones de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad, fueron inyectados por vía i.p con 4UHA, 8UHA o 16 UHA de virus inactivado de influenza A(H1N1) sin adyuvante, o con 10 µg de porina OmpC de *S. typhi* más 4UHA, 8UHA o 16UHA de virus inactivado de influenza A (H1N1) en un volumen final de 500µL; para comparar el efecto adyuvante inducido por las porina OmpC grupos de ratones fueron inmunizados con las mismas cantidades de virus mas 100 µg de hidróxido de aluminio (Hidrogel-HPA, USA) y como controles se inmunizaron ratones con liquido alantoideo o solución vehiculo (SSI) Finalmente como la porina OmpC de *S. typhi* es una proteína de membrana externa, posibles trazas de otros componentes bacterianos pudieran contaminar la preparación de porinas, como es el lipopolisacárido (LPS), aunque se realizó la medición de LPS en la preparación de porinas, este fue negativo, sin embargo el límite de detección es de 0.2 ng por 10 µg de porina, por lo tanto grupos de ratones fueron inmunizados con las diferentes concentraciones del virus inactivado de influenza A (H1N1) adicionados con diez veces más las probables trazas de LPS (2 ng), para de esta forma descartar que el efecto adyuvante observado por las porina OmpC de *S. typhi* no se debe a posible contaminación con LPS.

Todos los grupos fueron re-inmunizados en el día 15 con las mismas cantidades (Tabla 1), muestras de sangre fueron tomadas por la vena facial en los días

indicados en las graficas y se analizó la presencia de anticuerpos contra el virus por el método de inhibición de la hemaglutinación.

Los ratones inmunizados con virus inactivado de influenza A (H1N1) sin adyuvante o con porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante no mostraron títulos al día 4 posterior a la inmunización, efecto similar se observó cuando se utilizó alúmina como adyuvante o 2 ng de LPS (Figura 3A, B y C).

Los grupos de ratones inmunizados con 4 UHA más la porina OmpC o la alúmina como adyuvante, mostraron una respuesta de anticuerpos contra el virus temprana al día diez, este efecto no se observa cuando únicamente se inmunizó con 4 UHA sin adyuvante. (Figura 3A). Cuando se aumenta la cantidad de virus inactivado de influenza A (H1N1) a 8 u 16 UHA, se detectaron niveles similares de anticuerpos al día 10 posterior a la inmunización, con el virus inactivado de influenza con adyuvante o sin adyuvante. (Figura 3B y C).

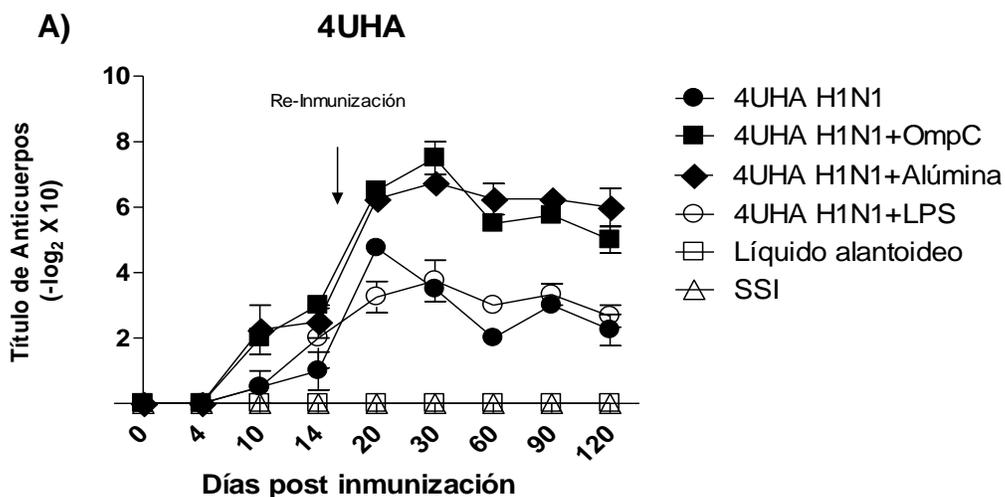
Después de 14 días posteriores a la inmunización, los grupos donde se administró el virus inactivado de influenza A (H1N1) más la porina OmpC de *S. typhi* o la alúmina como adyuvante, mostraron mayores títulos de anticuerpos en comparación al grupo que únicamente recibió el virus inactivado de influenza A (H1N1) sin adyuvante (Figura 3A, B y C).

Se alcanzaron los mayores títulos de anticuerpos contra el virus después de la re-inmunización (día 20), con las tres cantidades evaluadas de virus. Cuando se administró 4 u 8 UHA se observó un aumento de dos títulos de anticuerpos, cuando se utilizó la porina OmpC de *S. typhi* o la alúmina como adyuvante (Figura

3A y B). En el caso de 16 UHA de virus inactivado de influenza A (H1N1), no se encontró diferencia con el uso de la porina OmpC o la alúmina como adyuvante.

Los altos títulos de anticuerpos alcanzados después de la re-inmunización, con el uso de la porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante de la vacuna experimental de virus inactivado de influenza A (H1N1), se mantuvieron al día 30, 60, 90 y 120 posteriores a la inmunización (ultimo día analizado). En contraste los ratones inmunizados con 4 y 8 UHA de virus inactivado de influenza A (H1N1) sin adyuvante, conforme avanzó el tiempo disminuyó el título de anticuerpos (Figura 3A y B). En el caso de los ratones donde se administró 16 UHA de virus, se mantuvieron los títulos de anticuerpos alcanzados, tanto en los grupos inmunizados con virus inactivado de influenza A (H1N1) con adyuvante como sin adyuvante (Figura 3C).

Los ratones inmunizados únicamente con líquido alantoideo o la solución vehículo (SSI) no desarrollaron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.



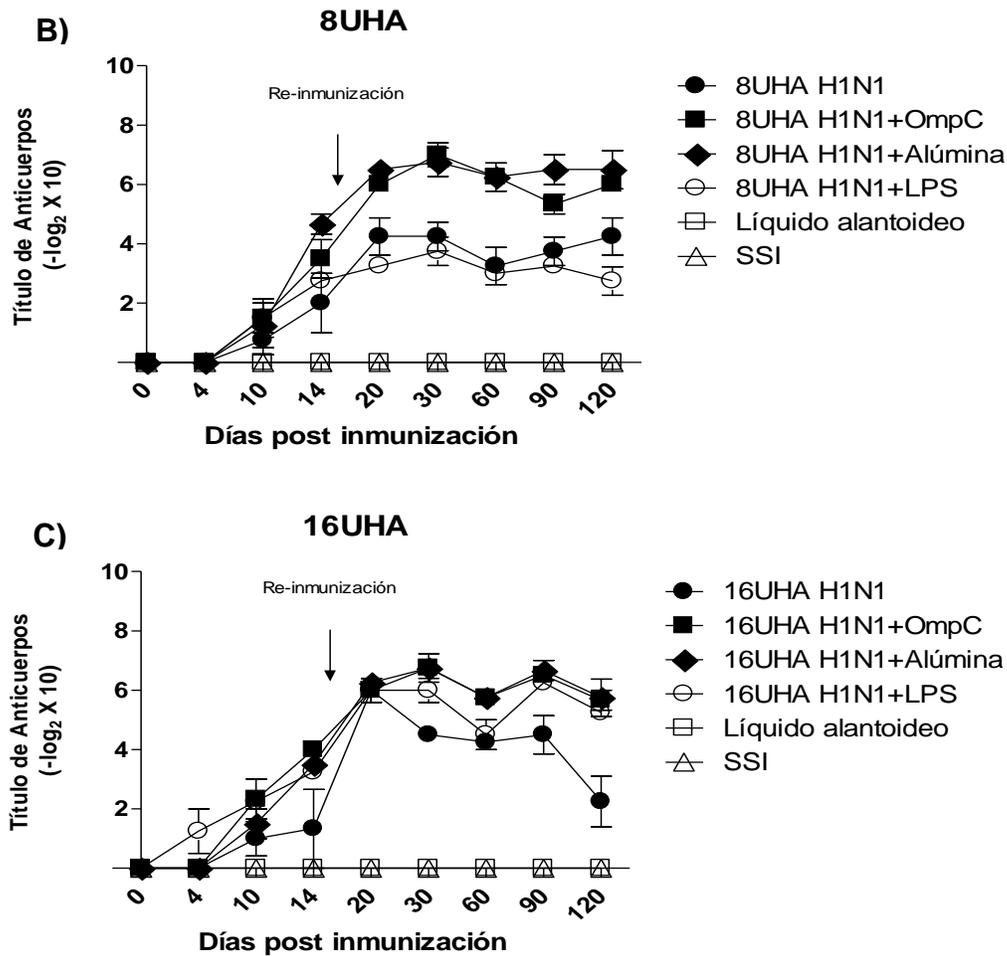


Figura 3. Efecto adyuvante de la porina OmpC de *Salmonella typhi* sobre la respuesta de anticuerpos en una vacuna experimental de virus inactivado influenza pandémica A (H1N1). Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 4 UHA (A), 8 UHA (B) o 16 UHA (C) de virus inactivado de influenza pandémica A (H1N1) sin adyuvante o con 10 µg de porina OmpC de *S. typhi*, o 100 µg alúmina como adyuvantes. Como controles negativos se inmunizó la solución vehículo (SSI) o líquido alantoideo. Al día 15 fueron re-inmunizados con las mismas cantidades, se determinó el título de anticuerpos contra el virus mediante ensayos de inhibición de hemaglutinación en los días indicados en las gráficas. Los resultados se encuentran expresados como el promedio ± la desviación estándar de 4 ratones por grupo.

7.3 La porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante en una vacuna experimental de virus inactivado influenza pandémica A (H1N1) induce cambio de isotipo de anticuerpos contra el virus.

Los resultados anteriores nos muestran que la porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante en una vacuna experimental de virus inactivado de influenza A (H1N1), fue capaz de inducir un aumento en el título de anticuerpos contra el virus, medidos a través de ensayo de inhibición de la hemaglutinación, sin embargo no se conoce con esta técnica, que isotipos de anticuerpos están presentes; con el fin de caracterizar el efecto adyuvante sobre la respuesta inmune humoral de la porina OmpC de *S. typhi*, se transfirió el virus inactivado de influenza A (H1N1) sobre membranas de nitrocelulosa y se trataron con los sueros del día 30 de los ratones inmunizados: con 8 UHA de virus inactivado de influenza (H1N1) sin adyuvante o con la porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante. Se reveló con anticuerpos anti-IgG1, anti-IgG2a o anti-IgG2b de ratón marcados con peróxidasa, para conocer el isotipo de anticuerpo presente.

Se encontró que el virus inactivado de influenza A (H1N1) al ser administrado sin adyuvante, induce anticuerpos de isotipo IgG1 únicamente (Figura 4). Sin embargo cuando se administró 10 µg de la porina OmpC de *S. typhi* más 8 UHA de virus inactivado de influenza A (H1N1), se encontraron además de los anticuerpo de isotipo IgG1, anticuerpos de isotipo IgG2a contra el virus, pero no se detectaron anticuerpos de isotipo IgG2b (Figura 4).

Como controles, se transfirieron al mismo tiempo a la membrana líquido alantoideo y OVA (proteína mayoritaria en el líquido alantoideo), para descartar que los anticuerpos observados no se encuentren dirigidos contra contaminantes de la preparación de virus inactivado de influenza A (H1N1). No se detectó anticuerpo de los isotipos evaluados dirigidos contra OVA o proteínas del líquido alantoideo.

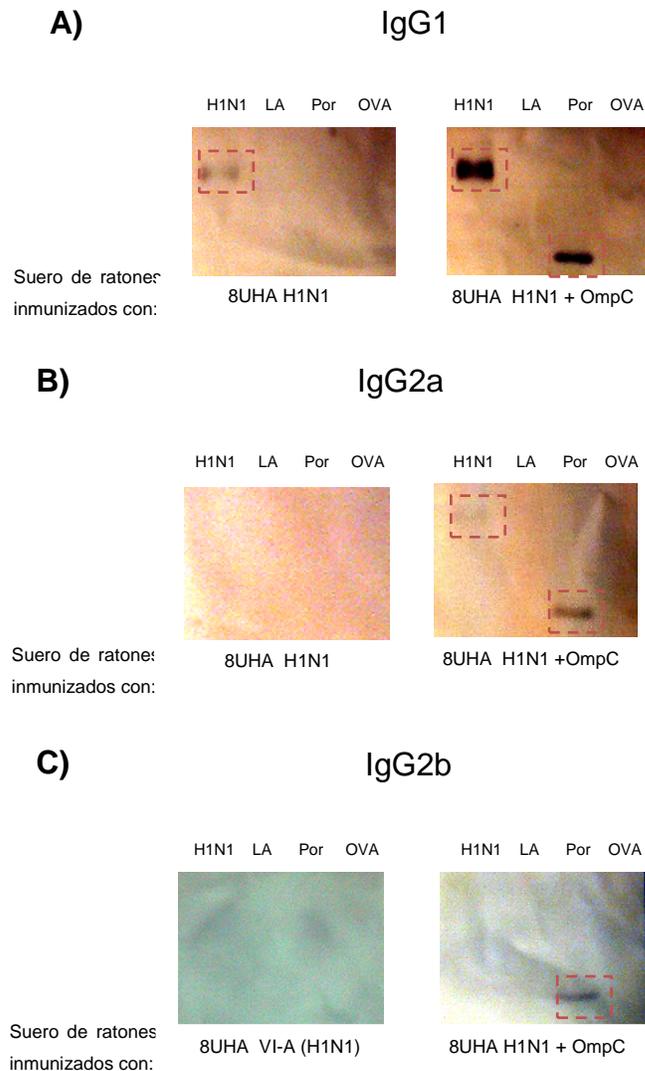


Figura 4. La porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante en una vacuna experimental de virus inactivado influenza pandémica A (H1N1) induce cambio de isotipo de anticuerpos contra el virus. Sueros del día treinta de los ratones inmunizados con 8 UHA de virus inactivado de influenza (H1N1) sin adyuvante o con la porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante se colocaron en una membrana de nitrocelulosa a la que previamente se transfirió virus inactivando de influenza A (H1N1), líquido alantoideo (LA), porina OmpC de *S. typhi* (Por) y Ovoalbúmina (OVA). Se determinó la presencia de anticuerpos de clase IgG1 (A), IgG2a (B) e IgG3 (C), utilizando un segundo anticuerpo marcado con peroxidada y como cromóforo 4 α -naftol.

8 DISCUSIÓN

El objetivo principal de la vacunación es la inducción de una respuesta de memoria que permita a los sujetos vacunados estar protegidos cuando se encuentren con el agente patógeno contra el cual fueron vacunados, sin embargo en algunas vacunas la inducción de una respuesta inmune protectora no es muy eficiente, o se requiere de gran cantidad de antígeno para inducir una respuesta protectora o repetidas re-inmunizaciones, lo que trae consigo un aumento en los efectos adversos relacionados con la vacuna. Por lo que es necesario adicionar moléculas que posean efecto adyuvante que permitan potencializar la respuesta contra el antígeno vacunal o permitan disminuir la cantidad de antígeno, entre otras cosas.

El éxito de las nuevas formulaciones vacunales en gran parte dependerá de la correcta elección del adyuvante, sin embargo hoy en día solo se cuentan con dos adyuvantes con licencia para uso en humanos, la alúmina y el MPL A. Por lo que resulta imprescindible la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades adyuvantes.

Las porinas de *S. typhi* son antígenos altamente inmunogénicos que se han evaluado en humanos como candidatos a vacuna contra la fiebre tifoidea, mostrando que son moléculas seguras para el uso de humanos, además estas proteínas son agonistas de TLR2 y del complejo TLR4/MD2/CD14, activan eficientemente las células presentadoras de antígeno, presentan efecto adyuvante al co-administrar con antígenos modelo poco inmunogénicos, entre otras características; lo que las convierte en excelentes candidatos para ser evaluadas

como adyuvantes en nuevas formulaciones vacunales o para el mejoramiento de las vacunas ya existentes.

En este trabajo evaluamos el efecto de la porina OmpC de *S. typhi* como adyuvante en una vacuna experimental de virus inactivado de influenza A (H1N1). Encontramos que el virus de influenza pandémica A (H1N1) al ser administrado sin adyuvante en concentraciones bajas (4 u 8 UHA) Induce una nula o pobre respuesta de anticuerpos en los primeros días, se alcanzan los mayores títulos después de la re-inmunización, sin embargo estos no son tan altos como los inducidos con mayores cantidades de virus de influenza (16 UHA). Sorprendentemente el uso de la porina OmpC como adyuvante en la preparaciones con bajas cantidades del antígeno viral permitió alcanzar títulos de anticuerpos desde los primeros días y estos aumentaron después de la re-inmunización (día 15) y se logran mantener hasta el último día evaluado. Lo que nos indica que la porina OmpC de *S. typhi* podría ser útil en formulaciones vacunales de virus de influenza inactivado, debido a que permite disminuir la cantidad de antígeno e inducir altos títulos de anticuerpos. La disminución de antígeno en las formulaciones vacunales nos permitirá tener mayor cantidad de vacunas a un menor costo, logrando una mayor cobertura de las campañas de vacunación y de esta forma la inmunización mundial se convertirá en una realidad.

El efecto adyuvante de la alúmina sobre la vacuna de virus inactivado de influenza ya se encuentra evaluado por otros grupos de investigación, los datos obtenidos en el presente trabajo correlacionan con lo ya reportado.

El tener un adyuvante que permita aumentar el título de anticuerpo contra el antígeno, no necesariamente se traduce en un estado de protección, es necesario conocer los isotipos de estos anticuerpos, para entender los mecanismos efectores que probablemente podrían participar durante la infección. La respuesta inmune protectora contra los virus de influenza principalmente debe centrarse en una respuesta de anticuerpos neutralizantes, el isotipo IgG1 es el que mejor desempeña esta función, debido a que su Fc tiene mayor afinidad a los receptores de Fc que se encuentran en los monocitos y macrófagos, las cuales son células fagocíticas, por lo que una respuesta con altos títulos de anticuerpos contra el virus de esta subclase nos sugiere que es de suma importancia. Afortunadamente la porina OmpC como adyuvante de la vacuna experimental contra influenza A (H1N1) indujo anticuerpos contra el virus de isotipo IgG1, además fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpo contra el virus de subclase IgG2a, este isotipo de anticuerpo se encuentra relacionado con la activación de la cascada del complemento, que resulta en el aclaramiento o depuración de las partículas virales durante la infección. Futuros estudios serán necesarios para evaluar la protección mediante ensayo de reto con el virus de influenza A (H1N1) adaptado a ratón.

Con todo lo mencionado anteriormente la porina OmpC de *S typhi* resulta ser un buen candidato para ser utilizado en formulaciones vacunales de virus inactivados de influenza A (H1N1).

9 CONCLUSIONES

La inmunización con el virus de influenza pandémico A(H1N1) con porina OmpC, de *Salmonella enterica* serovar Typhi, como adyuvante induce una mayor respuesta de anticuerpos contra el virus de influenza pandémico A(H1N1) en comparación con la respuesta generada con la inmunización del virus sin adyuvante. Además de que ayuda a disminuir la cantidad de antígeno

La porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi como adyuvante en una vacuna experimental contra el virus de influenza pandémica A (H1N1) ayuda a disminuir la cantidad de antígeno.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Murray Patrick R. , E.J.B., James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller., *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. American Society of Microbiology Press Washington D.C. Vol. 2. 2007.
2. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol. 2010. **11**(5): p. 373-84.
3. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D49-53.
4. Webster RG, P.C.D.a.R.A.T. *Influenza virus (orthomyxoviridae), infection and immunity*. Elsevier 1998
5. Nicholson, K.G., J.M. Wood, and M. Zambon, *Influenza*. Lancet, 2003. **362**(9397): p. 1733-45.
6. Webster RG, P.C.D.a.R.A.T., *Influenza virus (orthomyxoviridae), general features*. . 1999 USA: Elsevier.
7. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
8. Acosta-Ramirez, E., et al., *Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus*. Immunology, 2008. **124**(2): p. 186-97.
9. Jenner, *An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western countries of England*. London, 1778.
10. Pasteur, *De l'attenuation du virus du cholera des poules*. C.R. Acad. Sci. Paris 92, 1881: p.673-680.
11. Pasteur , C.C.E., *Sur la vaccination charbonneuse*. C.R. Acad. Sci. Paris 92 1884: p. 1378-1383.
12. Calmette, G.C., Breton M, *Contribution a l'etude de la tuberculose experimental du cobaye (infection et essais de vaccination par la voie digestive)*. . Ann. Inst. Pasteur 21, 1907: p. 401-416.
13. Theiler, M. and H.H. Smith, *The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization*. J. Exp. Med. 65, 787-800 (1937). Rev Med Virol, 2000. **10**(1): p. 6-16; discussion 3-5.
14. Sabin, A.B., et al., *Landmark article Aug 6, 1960: Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses*. By Albert B. Sabin, Manuel Ramos-Alvarez, Jose Alvarez-Amezquita, William Pelon, Richard H. Michaels, Ilya Spigland, Meinrad A. Koch, Joan M. Barnes, and John S. Rhim. JAMA, 1984. **251**(22): p. 2988-93.
15. Black, F.L. and S.R. Sheridan, *Studies on an attenuated measlesvirus vaccine. IV. Administration of vaccine by several routes*. N Engl J Med, 1960. **263**: p. 165-9.

16. Gershon, A.A., *Live attenuated varicella vaccine*. *Pediatr Ann*, 1984. **13**(9): p. 653-6.
17. Ryan, E.T. and S.B. Calderwood, *Cholera vaccines*. *Clin Infect Dis*, 2000. **31**(2): p. 561-5.
18. Anon. *Typhoid vaccination: weighing the options*. *Lancet*, 1992. **340**(8815): p. 341-2.
19. Kekomaki, M.P., N.C. Raiha, and H. Bickel, *Ornithine-ketoacid aminotransferase in human liver with reference to patients with hyperornithinaemia and familial protein intolerance*. *Clin Chim Acta*, 1969. **23**(1): p. 203-8.
20. Audibert, F., *Adjuvants for vaccines, a quest*. *Int Immunopharmacol*, 2003. **3**(8): p. 1187-93.
21. Guy, B., *The perfect mix: recent progress in adjuvant research*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(7): p. 505-17.
22. Denis, J., et al., *Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform*. *Vaccine*, 2008. **26**(27-28): p. 3395-403.
23. Almagor, A., S. Yedgar, and B. Gavish, *Viscous cosolvent effect on the ultrasonic absorption of bovine serum albumin*. *Biophys J*, 1992. **61**(2): p. 480-6.
24. O'Hagan, D.T. and N.M. Valiante, *Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(9): p. 727-35.
25. Lycke, N., *From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM*. *Cell Microbiol*, 2004. **6**(1): p. 23-32.
26. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
27. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 295-8.
28. Alving, C.R., M. Glass, and B. Detrick, *Summary: Adjuvants/Clinical Trials Working Group*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992. **8**(8): p. 1427-30.
29. Edelman, R., *Vaccine adjuvants*. *Rev Infect Dis*, 1980. **2**(3): p. 370-83.
30. McElrath, M.J., *Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction*. *Semin Cancer Biol*, 1995. **6**(6): p. 375-85.
31. Marx, P.A., et al., *Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine*. *Science*, 1993. **260**(5112): p. 1323-7.
32. Edelman, R., *An update on vaccine adjuvants in clinical trial*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992. **8**(8): p. 1409-11.
33. Allison, A.C. and N.E. Byars, *Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects*. *Mol Immunol*, 1991. **28**(3): p. 279-84.
34. Waters, R.V., T.G. Terrell, and G.H. Jones, *Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides*. *Infect Immun*, 1986. **51**(3): p. 816-25.
35. Jennings, R., J.R. Simms, and A.W. Heath, *Adjuvants and delivery systems for viral vaccines--mechanisms and potential*. *Dev Biol Stand*, 1998. **92**: p. 19-28.
36. McKee, A.S., et al., *Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for*

- alum to act as an adjuvant for specific immunity.* J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4403-14.
37. Brewer, J.M., et al., *In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production.* Eur J Immunol, 1996. **26**(9): p. 2062-6.
 38. Goto, N., et al., *Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines.* Vaccine, 1993. **11**(9): p. 914-8.
 39. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
 40. Garmory, H.S., K.A. Brown, and R.W. Titball, *Salmonella vaccines for use in humans: present and future perspectives.* FEMS Microbiol Rev, 2002. **26**(4): p. 339-53.
 41. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.* Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 593-656.
 42. Nikaido, H., *Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein.* Methods Enzymol, 1983. **97**: p. 85-100.
 43. Nikaido, H., *Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes.* J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 3905-8.
 44. Cowan, S.W., et al., *Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins.* Nature, 1992. **358**(6389): p. 727-33.
 45. Kumar, V.S., et al., *Overexpression, purification, and immunogenicity of recombinant porin proteins of Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi).* J Microbiol Biotechnol, 2009. **19**(9): p. 1034-40.
 46. Isibasi, A., et al., *Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins.* Vaccine, 1992. **10**(12): p. 811-3.
 47. Salazar-Gonzalez, R.M., et al., *Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever.* Immunol Lett, 2004. **93**(2-3): p. 115-22.
 48. Secundino, I., et al., *Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response.* Immunology, 2006. **117**(1): p. 59-70.
 49. Gil-Cruz, C., *Evaluación de la respuesta inmune innata inducida por las porinas de Salmonella entrica serovar Typhi.*, in *Biológicas*. 2006, Instituto Politécnico Nacional. : México D.F.
 50. *Compositions comprising Salmonella porins and uses thereof as adjuvants and vaccines (provisional).* United States Application No. 61/073,118. 21-7-2008.