



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Centro Médico Nacional Siglo XXI
UMAE Hospital de Especialidades
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

T E S I S

Estudio de la respuesta de anticuerpos inducida por formulaciones vacunales basadas en porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi contra la fiebre tifoidea

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGICO
PRESENTA

DIEGO LOZANO CISNEROS

No. De cuenta: 315310366

Correo: dlc99236z@gmail.com

Director de Tesis:

Dr. Constantino III Roberto López Macías

Asesora de tesis:

Patricia Vidal Millán

Asesora de tesis:

Dra. Martha Legorreta Herrera



Ciudad de México, Febrero 2024



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.

Agradecimientos

Siempre estaré agradecido con la Universidad Nacional Autónoma de México y con todos mis profesores de las disciplinas en las que fui parte en sus diversos planteles, por brindarme toda mi formación académica, cultural y deportiva. Este trabajo es la culminación de tantos años siendo orgullosamente universitario.

Quiero agradecer a mis sinodales: Dra. Martha Legorreta, Q.F.B. Patricia Vidal, Q.F.B. Francisco Parada y el Q.F.B. Gildardo Herrera por aceptar revisar este escrito, por su tiempo invertido y todos sus increíbles comentarios. ¡Gracias!

Gracias a mi director de Tesis, el Dr. Constantino López, por autorizar y dirigir este proyecto, así como brindarme todas las facilidades para adquirir tantos conocimientos que me ha dejado mi estancia en el laboratorio. Es todo un honor poder formarme como profesionista bajo su mentoría.

A toda la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) por abrirme las puertas, permitirme desarrollar este proyecto y volverme parte de la unidad. Entre ellos, quisiera destacar a la Dra. Tania Rivera por ser un ejemplo a seguir, brindarme todos sus conocimientos y con su paciencia y confianza, volverme parte de su equipo; al cDr. Alejandro y a la Biól. María por adoptarme en la unidad y enseñarme lo que finalmente aplicaría en el proyecto. Es increíble que empezaron siendo mis profesores y terminaron teniendo toda mi confianza para poder llamarlos amigos.

A todos mis amigos de la unidad, además de los antes mencionados, Beatriz, Mariana, Cristian, Samuel, Sharon, Itzel, Ana, Aketcyn, Isauro, Victor entre otros, pues con ustedes, todas las tardes en el laboratorio se volvieron de la más amenas ¡Gracias por su inmuno-amistad!

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo bajo el programa “Apoyo para ayudante de investigador nivel III o emérito” CVU: 1274060.

Dedicatorias

A mis papás, Sonia y Valente, que si hoy he logrado esto, es todo gracias a ustedes. Una dedicatoria es poco comparado con todo lo que les debo, por ser mi principal pilar y motor. Después de tanto tiempo ¡Todos los años detrás de mi valieron la pena!

A mis hermanos, Alvaro y Andres, que siempre seguirán siendo esa motivación que me impulsa día a día a darlo todo. Espero que tomen ésto como inspiración para que ustedes lleguen lejos, mucho más lejos.

A toda mi familia, destacando a mi abue Carmen, mi abue Inocencia y mis tíos Alejandro y Julieta, por brindarme todo su apoyo, que han estado en las buenas y en las malas, desde compartiendo desveladas y traumas hasta los festejos por esas pequeñas victorias.

A los amigos que recorrieron este largo camino conmigo:

A Jacob, César, Eva y Arumi, pues formamos una amistad increíble, vivimos de todo y nunca nos dejamos vencer, por más oscura que se volviera la situación, su compañía era esa luz que iluminaba todo.

A Marian, mi apoyo emocional que siempre estuvo por tantos años y que me impulsó a dar la mejor versión de mi. Siempre estaré agradecido contigo.

A mis amigos de toda la vida: Carlos, Gustavo, Miguel, Jorge, Leonardo, Raúl y Brian que, desde hace más de 12 años, han sido una parte fundamental de mi persona y, tras tantas vivencias, puedo decir que más que amigos, los considero mis hermanos.

Por último, quiero dedicar este trabajo a la memoria de los que empezaron conmigo pero no lograron verme finalizar. A mis abuelos Raymundo y Arturo, y mi tío Enrique. Porque soy consciente de la fe que tenían en mi, espero que donde se encuentren, estén orgullosos de lo que logramos. Si me han impulsado a continuar los recuerdos, les aseguro que han sido los suyos.

Esta tesis es por y para ustedes.

*“LA PRESIÓN ES LA QUE NOS HACE LO QUE SOMOS. EMPIEZAS SIENDO
CARBÓN Y TERMINAS CONVERTIDO EN DIAMANTE.”*

-Matt Haig

Índice

Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vi
Resumen	vii
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1 Vacunas	3
2.3 Fiebre tifoidea	10
2.4 <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovar Typhi	11
2.5 Vacunas contra la fiebre tifoidea	14
2.6 Porinas	16
2.7 Métodos de cuantificación de anticuerpos	19
4. Preguntas de investigación	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	23
6.1 Objetivo principal	23
6.2 Objetivos particulares	23
7. Materiales y métodos	24
8. Resultados y discusión	35
8.1 Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de porinas provenientes de diferentes cepas de <i>S. Typhi</i>	35
8.2 Evaluación del impacto de la alúmina sobre la inmunogenicidad de las porinas	37
9. Discusión	46
9.1 Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de porinas provenientes de diferentes cepas de <i>S. Typhi</i>	46
9.2 Evaluación del impacto de la alúmina sobre la inmunogenicidad de las porinas	47
10. Conclusiones	52
Referencias	53
Anexo 1. Preparación de soluciones	59

Anexo 2. Resumen aceptado del trabajo libre, formato póster, presentado en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023 – Sociedad Mexicana de Inmunología	63
Anexo 3. Constancia de participación como ponente en modalidad cartel en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023 – Sociedad Mexicana de Inmunología	64
Anexo 4. Certificado de análisis de porinas de <i>S. Typhi</i>.....	65

Índice de Figuras

Figura 1. Descripción general del plan de trabajo en la primera parte del proyecto.	26
Figura 2. Descripción general del plan de trabajo en la segunda parte del proyecto.	27
Figura 3. Descripción general del plan de trabajo en la tercera parte del proyecto.	28
Figura 4. Distribución de muestras y controles en ensayos ELISA.	29
Figura 5. Distribución de muestras en plaqueo para preparación bacteriana.....	31
Figura 6. Distribución de muestras en determinación de grado de protección.	33
Figura 7. Diluciones realizadas en determinación de grado de protección	33
Figura 8. Distribución de diluciones plaqueadas para determinación de UFC/g de órgano.	34
Figura 9. La cepa de origen de las porinas no influye en el título de anticuerpos IgGT anti-porina inducidos por inmunización en ratón.	35
Figura 10. La inmunización con porinas provenientes de las cepas UIMIQ A y UIMIQ B brindan un grado de protección similar a la inmunización con porinas de la cepa ATCC.....	36
Figura 11. El uso de alúmina como adyuvante en la inmunización de ratón con porinas induce un aumento en el título de anticuerpos IgGT anti-porina al día 42 post-inmunización.	38
Figura 12. Las porinas en ausencia de adyuvante inducen un aumento en el título de IgM.	39
Figura 13. El uso de alúmina como adyuvante disminuye el grado de protección inducido por la inmunización con porinas.....	40
Figura 14. La formulación Porina/Alúmina induce un decremento en el título de IgG2a e IgG3 al día 28 posterior a la inmunización.	42
Figura 15. El uso de alúmina como adyuvante en la inmunización con porinas de cepa AT induce un incremento en el título de IgG1 e IgG2b y una disminución de IgG2a e IgG3 42 días post-inmunización.	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación, ventajas y desventajas de las diferentes plataformas vacunales.....	5
Tabla 2. Distribución de los grupos de estudio en la primera parte del proyecto...	26
Tabla 3. Distribución de los grupos de estudio en la segunda parte del proyecto.	27
Tabla 4. Anticuerpos secundarios y diluciones utilizadas en ensayos ELISA.	29
Tabla 5. Nomenclatura utilizada en grupos de estudio.	31

Resumen

Las enfermedades producidas por *Salmonella enterica* son un importante problema de salud en todo el mundo. Con el aumento de las medidas sanitarias, la incidencia de estas patologías ha disminuido; sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos ha dificultado el manejo de la enfermedad debido a la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos, por lo que la vacunación cobra relevancia como método profiláctico para combatir la enfermedad. Actualmente, existen vacunas disponibles contra *S. Typhi* basadas en el patógeno atenuado o polisacáridos bacterianos, sin embargo, sería beneficioso la creación de una nueva vacuna con antígenos de naturaleza proteica.

La Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) se encuentra en el desarrollo de una vacuna de subunidad contra la fiebre tifoidea basada en proteínas de membrana externa (OMP) denominadas porinas, las cuales son antígenos altamente inmunogénicos.

Durante los más de 30 años de desarrollo, los estudios se han realizado con porinas de la cepa *S. Typhi* Vid 9, 12 ATCC 9993 (ATCC), la cual, cuenta con restricciones de propiedad intelectual que retrasarían el escalamiento y manufactura de la futura vacuna; por lo tanto, se necesita estudiar porinas provenientes de otras cepas sin estas restricciones legales y determinar si la cepa de origen tiene repercusión en la inmunogenicidad del antígeno. Además, se ha observado el efecto de algunos adyuvantes sobre las propiedades inmunológicas de las porinas sin buenos resultados, no obstante, no se ha estudiado el efecto de un adyuvante de fácil acceso como la alúmina.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar la respuesta de anticuerpos y su capacidad protectora inducida por la inmunización con porinas purificadas de 3 cepas diferentes de *S. Typhi* y por la administración de porinas con alúmina como adyuvante. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c repartidos en diferentes grupos de estudio. Se determinó el título de IgG total (IgG_T) y el grado de protección en un modelo de infección *in vivo* con *S. Typhi* y posterior cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC)/g de órgano en hígado y bazo. Para la determinación

del efecto de la alúmina también se cuantificaron los títulos de IgM totales (IgM_T) y las subclases de IgG. No se encontraron diferencias significativas entre los títulos de IgG_T inducidos por las 3 porinas estudiadas, tampoco se mostraron diferencias en las UFC en hígado y bazo por lo que se concluyó que la cepa de origen de las porinas no tiene efecto directo en la inmunogenicidad del antígeno.

Por otra parte, la adición de alúmina en la formulación vacunal incrementó los niveles de IgG_T, sin embargo, disminuyó los títulos de IgM_T así como el grado de protección inducido por la vacunación. Además, indujo un cambio de subclases caracterizado por el aumento de IgG1 y disminución de IgG2b e IgG3. Se concluyó que el adyuvante indujo un cambio del perfil de IgG a subclases no protectoras, por lo que no se recomienda su uso en posteriores formulaciones vacunales.

1. Introducción

La fiebre entérica es una enfermedad infecciosa potencialmente mortal. Su principal agente causal es *Salmonella enterica* serovar Typhi. La incidencia de la enfermedad ha disminuido con el aumento de las medidas sanitarias en el mundo; sin embargo, el uso indiscriminado de antimicrobianos ha dificultado su manejo debido a la aparición de cepas resistentes a antibióticos, por lo que la vacunación toma relevancia como principal método profiláctico de la enfermedad.

Actualmente, se encuentran en el mercado vacunas contra *Salmonella* Typhi basadas en el patógeno atenuado o en antígenos polisacáridos; sin embargo, la eficacia de las vacunas es limitada debido a su naturaleza antigénica, por lo que es necesario el estudio de nuevas moléculas proteicas para la producción de nuevas vacunas.

S. Typhi expresa proteínas de membrana externa (OMP) denominadas porinas, que son antígenos altamente inmunogénicos. Estas proteínas han sido uno de los objetos de estudio en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica de la Unidad Médica de Alta Especialidad, IMSS por más de 30 años, teniendo resultados prometedores para la generación de una vacuna contra la fiebre tifoidea segura, eficaz, con costos reducidos de producción y con una inducción de protección a largo plazo.

Las porinas estudiadas se han obtenido de la cepa *S. Typhi* 9, 12 Vid ATCC 9993 (ATCC) sin embargo, para el escalamiento de la producción de una vacuna efectiva se necesita analizar otras cepas que no cuenten con restricciones de propiedad intelectual para facilitar el proceso de producción sin comprometer la inmunogenicidad del antígeno. Por lo tanto, es necesario el estudio de las proteínas de membrana procedentes de otras cepas ya que no se tiene registro de la influencia de la cepa de origen en la inmunogenicidad del antígeno.

Además, se ha demostrado la influencia de algunos adyuvantes en la inmunogenicidad y grado de protección; sin embargo, aún no se ha estudiado la interacción de un adyuvante de fácil acceso como la alúmina con la proteína de membrana. Por esta razón se propone estudiar la inmunogenicidad de porinas

provenientes de tres cepas de *S. Typhi* y el efecto de la alúmina en el título y subclases de anticuerpos, así como el grado de protección contra la infección de *S. Typhi* en modelo de ratón.

2. Marco Teórico

2.1 Vacunas

La vacunación es uno de los hallazgos que han marcado a la humanidad, pues constituye una de las principales estrategias para la prevención de enfermedades infecciosas (1). Tan solo en la década de los 60's se salvaron más de 10 millones de vidas con vacunas virales (2). La OMS estima que las vacunas disponibles en la actualidad previenen alrededor de 2 a 3 millones de muertes en el mundo cada año (2).

Anterior a la vacunación, se tenía establecida la idea de que una persona recuperada de una enfermedad no vuelve a contraer el padecimiento; por lo tanto, se ponía en práctica la inoculación (o variolización) en niños en culturas en Asia, África, India y China (2).

La vacunación moderna empezó con Edward Jenner en el siglo XVIII. Al observar que las vaqueras infectadas con el virus de la viruela eran inmunes a la enfermedad, Jenner inyectó pus de pústula de un paciente enfermo con viruela bovina a un niño y posteriormente expuso al infante al virus de la viruela; como resultado, el niño no contrajo la enfermedad (2). En estos hallazgos, publicados en 1798, fue donde se acuñó el término "*Variolae vaccinae*", que posteriormente fue abreviado a "Vacuna" (2). Como consecuencia de la vacunación, la viruela fue erradicada en 1979 (3).

Una vacuna puede definirse como una preparación antigénica capaz de inducir una respuesta inmune contra un patógeno y proteger contra la enfermedad (4,5). Además del antígeno contra el que se desencadena la respuesta inmunológica, las vacunas actuales cuentan con distintos componentes para inducir una respuesta inmune robusta y garantizar las condiciones para su preservación (6)

2.1.1 Componentes y plataformas vacunales

Entre sus principales componentes se encuentran:

- **Antígeno:** Es el principio activo de la vacuna (6). Este puede definirse como molécula capaz de unirse a los receptores de células B o T (7). El antígeno puede ser una modificación o forma parcial de un virus, bacteria o toxina que

causa la enfermedad contra la que se diseña la vacuna. Al tener modificaciones, no causa la enfermedad, pero sí induce inmunidad (6).

- **Adyuvante:** Son compuestos utilizados para mejorar la inmunogenicidad del antígeno. Como resultado, se puede disminuir la dosis y cantidad de antígeno necesario. Los adyuvantes más usados comúnmente incluyen sales minerales, emulsiones, liposomas y combinaciones de éstos; tienen como principales efectos despertar una respuesta inmune más rápidamente, incrementan el título de anticuerpos e inducen respuesta inmune de memoria de larga vida (6).
- **Preservantes:** Sustancias que previenen la contaminación bacteriana y fúngica, por ejemplo: fenol, fenoxietanol, etc (6).
- **Estabilizadores:** Ayudan a preservar las vacunas cuando son expuestas a calor, luz, acidez o humedad, por lo que prolongan su tiempo de almacenaje (6).
- **Antibióticos:** Impiden el crecimiento bacteriano durante la producción y el almacenamiento de las vacunas (6).
- **Diluentes**

Según el tipo de antígeno utilizado, las vacunas cuentan con distintas estrategias para garantizar la respuesta inmunitaria frente al patógeno, por lo que pueden clasificarse en:

Tabla 1. Clasificación, ventajas y desventajas de las diferentes plataformas vacunales.

Tipo	Descripción	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Atenuadas	Éstas cuentan con los virus o bacterias tratadas o debilitadas mediante la formación de mutaciones aleatorias (5) o específicas contra genes relacionados con la virulencia del patógeno (6).	Normalmente se necesita una o dos inmunizaciones para conferir una estimulación antigénica continua (6)	Contraindicadas en personas inmunocomprometidas (5). Existe una mínima posibilidad de revertir la atenuación, ocasionando la enfermedad que se intenta prevenir (5,6)	BCG, Vivotif, entre otras.
Inactivadas	Contienen el microorganismo completo que ha sido inactivado a través de métodos físicos como irradiación o tratamiento con químicos como dukoral o formaldehído (5,6). De esta manera, los patógenos son incapaces de reproducirse e infectar al huésped (6)	Son más estables, seguras y fáciles de conservar comparado con las vacunas atenuadas (6)	La manufactura implica el cultivo del agente infeccioso a gran escala, por lo que existe un potencial peligro para el personal y el medio ambiente. Además puede contener moléculas no caracterizadas provenientes del patógeno o medio de cultivo que pueden desencadenar reacciones alérgicas o alta reactividad en el ser humano (5,6)	Vacuna antirrábica, contra Hepatitis A, entre otras.
Subunidad	Constan de partes purificadas de virus o bacterias que contienen epitopos de distinta naturaleza antigénica, los cuales inducen respuesta inmunitaria (5,6).	Es posible optimizar el antígeno (5) y minimizar las reacciones adversas (6). Es posible usar la vacuna en personas inmunocomprometidas (5,6)	El antígeno no siempre es completamente inmunogénico por lo que se requiere diseñar una formulación para incrementar la inmunogenicidad, disminuir la dosis del antígeno y permitir una correcta interacción con las células del SI (6)	Dtap-IPV/Hib, Tdap, entre otras.
Conjugadas	Surgieron como alternativa a las vacunas de subunidad. En éstas se utiliza una proteína transportadora para el antígeno pobremente inmunogénico para incrementar la respuesta inmune frente al patógeno (6)	Se induce una respuesta inmunitaria robusta, inclusive en niños debido a la inducción de respuesta por mecanismos T-dependientes (5)		Vacuna contra Haemophilus conjugado (HbOC)
Toxoides	Se utilizan toxinas producidas por bacterias. Éstas son inactivadas con formalina o formaldehído (5). El producto se denomina toxoide e induce respuesta inmunitaria (5,6)	Son estables frente a cambios de luz, temperatura y humedad (5,6)	Suelen requerir varias dosis y requieren de adyuvantes para incrementar la inmunogenicidad (6)	DTap
Nuevas plataformas vacunales	Son tecnologías novedosas, cuyo desarrollo se vio acelerado debido a la pandemia de COVID-19. Entre estas se encuentran las vacunas de DNA, RNA y de vector recombinante (6).			

Modificado de: Gupta S *et al.* *Collection, compilation, and analysis of bacterial vaccines*, 2022; Kocourkova A, *et al.* *Vaccine Ingredients: Components that Influence Vaccine Efficacy*, 2017.

2.1.2 Fundamentos ¿Cómo funcionan las vacunas?

Las vacunas imitan los eventos inmunitarios clave que ocurren durante una infección natural sin los riesgos asociados con los agentes patógenos. Éstas se fundamentan en la activación del sistema inmune desencadenando respuesta innata y adaptativa (7).

Brevemente, el sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa frente a los patógenos (8) y está constituido por barreras físicas y químicas, proteínas en sangre y células. Éstas últimas cuentan con receptores de reconocimiento de patrón

(PRR), localizados en diversas partes de la célula, los cuales reconocen múltiples moléculas indicativas de la pérdida de homeostasis (8,9).

Las moléculas asociadas a infecciones son denominadas patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) y son estructuras relativamente invariantes que coinciden en la mayoría de los microorganismos, por ejemplo, ácidos nucleicos, polisacáridos, entre otros (9). Además, los receptores de la inmunidad innata también reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMP), moléculas endógenas liberadas como resultado de daño o muerte celular, provocadas por infecciones, traumatismos, quemaduras, entre otros (9).

Los PAMP y DAMP son reconocidos por una amplia variedad de PRR distribuidos en distintas partes de las células inmunitarias. Estos receptores, al ser estimulados, inician una cascada de transducción de señales que desembocan en la expresión de moléculas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión endotelial. Ejemplos de PRR son los TLR (*Toll like receptors*), NLR (*NOD like receptors*), entre otros (9).

Los patógenos cuentan con distintos componentes. Algunos de ellos son capaces de unirse específicamente a receptores de células T (*T cell receptor*, TCR) o anticuerpos secretados por células B. Cuando estas fracciones cuentan con esta capacidad se les denomina antígenos. No todos los antígenos son capaces de desencadenar respuesta inmunitaria. Las moléculas capaces de generar una respuesta inmune se denominan inmunógenos (7).

Dentro de las células de la inmunidad innata se encuentran las células fagocíticas, como las células dendríticas, neutrófilos, monocitos y macrófagos, las cuales detectan los PAMP/DAMP por medio de los PRR y fagocitan a los patógenos para presentarlos a otras células. Además, liberan quimiocinas y citocinas que provocan el reclutamiento de leucocitos circulantes en sangre a los tejidos infectados o dañados, fenómeno conocido como quimiotaxis (9). Dentro del grupo de las células fagocíticas, las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos conforman un grupo de células especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos, por lo tanto, se denominan células presentadoras de antígeno (APC) (9).

Las APC también son capaces de migrar del sitio de infección a ganglios linfáticos y bazo por medio de señales de quimiocinas para presentar el antígeno e inducir una respuesta a largo plazo, por lo tanto, son las células que relacionan el sistema inmune innato con el adaptativo (9)

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por tener una respuesta más tardía y ser altamente específico por su diversidad en reconocimiento de antígenos (8). Está compuesto principalmente de linfocitos T y B, los cuales expresan receptores de células B (BRC) o receptores de células T (TCR), que son altamente específicos a antígenos (8). Debido al enfoque del presente escrito, se describirá la respuesta del sistema inmune adaptativo enfocado en la generación de anticuerpos, no obstante, la respuesta celular tiene un papel completamente relevante en la defensa contra patógenos, sin embargo, la respuesta de linfocitos T no se describirá a profundidad.

Las células B son las responsables de la respuesta de anticuerpos y se subdividen en 3 grupos: células B1, de zona marginal (MZ) y foliculares. Las células B1 y MZ son capaces de despertar una respuesta contra el antígeno sin necesidad de estímulos proporcionados por las células T (Respuesta a antígenos T-independientes, TI) (5,10). Las células B foliculares también son capaces de responder a antígenos TI, sin embargo, esta subpoblación se especializa en la respuesta activadora y dependiente de linfocitos T CD4⁺ (10).

En un inicio, existe una respuesta extrafolicular temprana, donde las células B1 y MZ se activan al interactuar el antígeno con su BCR. Esto inicia una cascada de señalización que termina en la diferenciación a plasmablastos de vida corta secretores de anticuerpos, principalmente del tipo IgM (10). Es importante destacar que, al ser una respuesta temprana, no ha pasado por procesos de hipermutación somática (SHM) ni recombinación de cambio de isotipo (ISR), procesos que serán descritos posteriormente, por lo que tienen una afinidad moderada (10).

Por otra parte, el antígeno también ingresa a los órganos linfoides secundarios (ganglios y bazo) solo o asociado con células transportadoras de antígeno. Por otra parte, las APC se dirigen a estos órganos linfoides para presentarlos (7).

Es en estos órganos donde se lleva a cabo la respuesta inmune adaptativa. En ausencia de patógenos, es posible observar estructuras conocidas como folículos primarios, principalmente compuestos de linfocitos B naive (4).

Es importante recordar que las células B son capaces de fagocitar por medio de su BCR. Brevemente, la interacción con el antígeno induce la agrupación de múltiples BCR que se internalizan junto con el antígeno para fagocitarlo. Dentro de la célula, el antígeno se procesa y origina pequeños péptidos; posteriormente se acoplan a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). A la vez que se fagocita el antígeno, se envían señales que aumentan de la expresión de moléculas de MHC-II, moléculas de coestimulación (CD80 y CD86, etc.), receptores para quimiocinas y citocinas, que evitan la apoptosis e inducen la proliferación y diferenciación (7).

Una vez presentado el antígeno en la superficie, los TCR de los linfocitos T pueden reconocer e interactuar con los péptidos presentados en el MHC-II de la célula B, fenómeno que tiene por nombre sinapsis inmunológica (11). Además, se necesitan señales adicionales para continuar con la respuesta: la unión de moléculas de coestimulación, por ejemplo, CD80, CD86 y CD40 del linfocito B con CD28 y CD40L en el linfocito T (4). Adicionalmente, como respuesta a la interacción TCR-péptido-MHCII, los linfocitos TCD4⁺ secretan citocinas, las cuales interactúan con los receptores presentes en los linfocitos B, los que permiten una transducción de señales que terminan en la activación de las células B (4).

Las células B activadas inician con una proliferación masiva, que es posible visualizar como la generación de un compartimento adicional, conocido como manto de linfocitos B, dentro de los folículos primarios (4). Las células B y T se congregan en espacios bien establecidos conocidos como centro germinal. Estos constan de dos zonas:

La zona oscura se encuentra cercana a la periferia y contiene una alta cantidad de linfocitos B, lo que le brinda el aspecto oscuro al microscopio. Estas células, denominadas centroblastos, son grandes, en constante proliferación y no expresan el antígeno en su superficie (4).

La zona clara se localiza en el área central. Existe una menor densidad de linfocitos B debido a que se intercalan con una red de células dendríticas foliculares. Los linfocitos de esta zona se denominan centrocitos, expresan IgD, son pequeños y no proliferan. En ambas zonas se encuentran macrófagos TBM (*tingible body macrophages*) encargados de fagocitar a linfocitos B apoptóticos (4).

Dentro del centro germinal, como respuesta a la sinapsis inmunológica, algunas células B sufren un proceso de mutagénesis donde tienden a modificar la región variable de su receptor, alterando su afinidad (10). Estas células migran a la zona clara, donde serán seleccionadas aquellas clonas con mayor afinidad con el apoyo de células dendríticas foliculares. Las células seleccionadas pueden salir o pasar por rondas adicionales de mutación y selección (10).

Este proceso de maduración de afinidad es conocido como hipermutación somática (*Somatic Hypermutation*, SHM) y permite que los anticuerpos secretados incrementen su afinidad. Aquellas células que han disminuido su afinidad o no reconozcan al antígeno mueren por apoptosis (4,7,10).

Existe otro fenómeno, denominado recombinación de cambio de clase (*Class Switch Recombination*, CSR) donde, por medio de procesos de corte y empalme en el DNA, se modifica la región constante de los anticuerpos, cambiando así la clase de anticuerpo de IgM a IgG, IgE o IgA. El cambio de la expresión de cualquier clase de cadena implica la pérdida irreversible del DNA interpuesto (7). Una vez terminada la SHM y CSR, las células migran a la zona oscura, donde se reciben las señales de IL-2, IL-4 e IL-5 secretadas por linfocitos T CD4⁺ para inducir la proliferación y diferenciación a célula plasmática productora de anticuerpos (4).

Conforme aumenta la diferenciación de linfocito B a célula plasmática, disminuye la expresión de receptores que permiten la salida de la célula del centro germinal, así como incrementan otro tipo de receptores que inducen la circulación de la célula plasmática a tejidos periféricos. Al haber pasado por procesos de SHM y CSR, los anticuerpos secretados son de muy alta afinidad (7); dos o tres semanas posteriores al contacto con el antígeno, las células plasmáticas migran a la médula ósea donde continuarán la secreción de anticuerpos (10).

Al finalizar la respuesta inmune, casi todas las células B y plasmáticas pasan a apoptosis debido a la disminución de la interacción del antígeno con el BCR y consecuentemente, reducen las señales anti-apoptóticas; sin embargo, algunas células de memoria y plasmáticas de larga vida permanecen en médula ósea para responder frente a una reinfección (7).

Todo el proceso descrito ocurre al tener contacto por primera vez con un patógeno específico. Esta respuesta se conoce como primaria y se caracteriza por un periodo *lag*, reflejo del tiempo necesario para la proliferación y diferenciación de células B. En este periodo se liberan principalmente IgG e IgM y como resultado final se desarrollan células B de memoria (4,7).

Cuando se tiene contacto con un antígeno que ya ha desencadenado respuesta inmunitaria, se desarrolla una respuesta secundaria, la cual, es más rápida y robusta, debido a la disposición de células B de memoria específicas para el antígeno, las cuales están disponibles para una diferenciación inmediata a secreción de IgG u otras subclases de alta afinidad. Es posible que las células B pasen por una HSM adicional al exponerse nuevamente al antígeno, para incrementar la afinidad (7).

2.3 Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea, o solamente tifoidea, es una patología endémica de países en desarrollo causada por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhi (*S. Typhi*) (12). Se calcula que ocurren 26.9 millones de casos al año; sin embargo, este índice es probable que esté subestimado pues los síntomas inespecíficos ocasionalmente generan un mal diagnóstico de la enfermedad (13).

Esta patología se caracteriza por la presencia de fiebre alta (39-40°C) acompañada principalmente de síntomas gastrointestinales como náuseas, vómito, dolor abdominal y movimientos intestinales anormales, entre otros (13). En caso de no ser tratada, pueden desarrollarse complicaciones intestinales, neuropsiquiátricas y de otros tipos, convirtiéndose en una enfermedad potencialmente mortal (14). La principal vía de transmisión es oral-fecal (12–14). Posterior a la ingesta, existe un periodo de incubación de 7 a 14 días sin mostrar signos ni síntomas (14). La

transmisión a otros seres humanos continúa con la excreción de *Salmonella* por medio de las heces (14).

En México se reportaron 14,404 casos en 2022 de los cuales 9,112 pertenecen al género femenino y 5,292 al masculino (15). En países con cultura de higiene, acceso a agua tratada y sistemas de salubridad de desechos humanos, la fiebre tifoidea está fuertemente asociada a viajes (13).

El tratamiento original consistía en la administración temprana de antibióticos como cloranfenicol, ampicilina o trimetoprima-sulfametoxazol (16). Sin embargo, desde los años 50 se ha reportado una resistencia generalizada a cloranfenicol causada por la administración temprana de antibióticos de amplio espectro antes de la confirmación diagnóstica (13).

La introducción de las fluoroquinolonas brindó una alternativa para el tratamiento, no obstante, a la fecha han incrementado los casos de bacterias multi drogo-resistentes (MDR), convirtiendo a la fiebre tifoidea causada por cepas MDR una crisis emergente que representa un riesgo para la salud pública por la facilidad de transmisión, principalmente en niños menores de 15 años (13,16).

2.4 *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhi

Salmonella sp. es un género de bacterias perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos de tamaño intermedio, no esporulados, anaerobios facultativos, móviles, que fermentan glucosa y manosa sin producir gas, no fermentadores de lactosa y sacarosa que, en su gran mayoría, producen H₂S (17). El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; *Salmonella enterica* se divide en cinco subespecies: subespecie *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Casi todas las infecciones en humanos son causadas por la subespecie I (*Salmonella enterica* subespecie *enterica*) (17).

Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* cuentan con estructuras antigénicas bien descritas. Los antígenos clásicos de *Salmonella* son el antígeno O, H y Vi (18).

El antígeno O (somático) está conformado por unidades repetidas de polisacáridos en la parte más externa del lipopolisacárido (LPS), éstos son resistentes al calor y alcohol por lo que su detección se basa en reacciones de aglutinación con antisueros. Al ser carbohidratos, los anticuerpos anti-O son principalmente del tipo IgM (17).

El antígeno H (flagelina) está compuesto de proteínas presentes en el flagelo bacteriano que se desnaturalizan en presencia de calor o alcohol. Aglutinan frente a anticuerpos anti-H, generalmente del tipo IgG. Existen dos formas de antígeno H, de fase 1 y 2. La bacteria tiene la capacidad de variar de fase y alternar entre los dos antígenos (17). Estos antígenos son importantes activadores de la respuesta inmunitaria innata ya que son reconocidos por receptores tipo *Toll* (TLR) como TLR5 y NAIP (19).

Una de las principales diferencias entre las serovariedades no tifoideas y *S. Typhi* es la presencia del antígeno Vi, nombre asignado exclusivamente a la cápsula de polisacárido del serovar Typhi. Éste es un factor de virulencia de la bacteria, protege a la bacteria de la fagocitosis y le brinda resistencia sérica, probablemente por la protección del antígeno O de los anticuerpos (19).

La subespecie I de *Salmonella*, a la vez, se clasifica en serovares basados en su antígeno O y H (19). Los serovares se pueden clasificar en dos grandes grupos: tifoideos y no tifoideos (*Non Typhoid Salmonella*, NTS). Los NTS comúnmente son los causantes de gastroenteritis y entre ellos se encuentran *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (19). Los serovares causantes de fiebre enterica son *S. Typhi* (Fiebre tifoidea) y *S. Paratyphi* A, B y C (Fiebre paratifoidea) (12,19).

S. Typhi se describe como un serovar altamente conservado. Según la clasificación de Kaufmann-White, se encuentra en el grupo D con antígeno O tipo 9-12, flagelina fase 1 de tipo H:d y positivo a antígeno Vi. A pesar de ello, se han identificado casos negativos a antígeno Vi o cepas con un antígeno H alternativo, H:j (20).

Tras la secuenciación de su genoma, se han generado árboles filogenéticos donde es posible mapear los aislamientos actuales del patógeno. Se ha analizado la

posibilidad de que todas las *S. Typhi* existentes provengan de un solo organismo. Este serovar es altamente monomórfico y si bien, se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), son poco frecuentes, están distribuidos por todo el genoma y pocos genes han acumulado mutaciones múltiples, lo que conlleva a poca variación antigénica (20).

2.4.1 Patogénesis y respuesta inmunitaria contra *Salmonella sp.*

La patogénesis inicia con la ingesta de una dosis infectiva de 1,000-1 millón de bacterias. El primer mecanismo de defensa contra *Salmonella* es el ácido gástrico, pues la mayoría de las serovariedades NTS no sobreviven al pH bajo. Las bacterias supervivientes son transportadas al intestino delgado, donde se adhieren a las células de la mucosa para posteriormente invadirlas. El patógeno se internaliza por medio las células M presentes en las placas de Peyer para su posterior traslado a los folículos linfoides intestinales y ganglios linfáticos mesentéricos, donde son fagocitados; sin embargo, esta bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células fagocíticas (20). *Salmonella Typhi* es capaz de establecer vacuolas dentro de las células para su supervivencia. También cuenta con sistemas de secreción de tipo III, los cuales arrojan proteínas bacterianas efectoras al citosol de la célula huésped, por ejemplo, algunos efectores (SopE, SopB) provocan la estimulación del reordenamiento de actina en células epiteliales, permitiendo la invasión y colonización (21).

Posteriormente, las bacterias se liberan del espacio intracelular al torrente sanguíneo, y se diseminan por todo el organismo (22). Es común encontrar infección secundaria en hígado, bazo, médula ósea, vesícula biliar y placas de Peyer del íleon terminal. Estos organismos son secretados junto con la bilis, invaden nuevamente el intestino o son excretados en heces (22).

Algunos análisis de expresión génica en células de epitelio intestinal demuestran que *S. Typhi* no activa la respuesta inmune por medio de TLR5 (23). También se ha encontrado que los macrófagos infectados con el patógeno expresan menos IL-8 comparado con infecciones de *S. Typhimurium*, planteando la posibilidad de que

esta bacteria regule a la baja la respuesta mediada por PRR en mucosa intestinal ocasionando ausencia de infiltración de neutrófilos y diarrea inflamatoria (23).

Se ha demostrado un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias mientras que en pacientes graves disminuye la posibilidad de producir citocinas proinflamatorias, como consecuencia de la necrosis de las placas de Peyer (22).

Junto con la enfermedad, se inducen respuestas inmunitarias humorales y celulares, sin embargo, no brindan una protección completa contra la recaída y la reinfección (22).

Las células aisladas de pacientes con fiebre tifoidea tienen una respuesta de $\text{INF-}\gamma$ tras la estimulación con antígenos específicos de *Salmonella* como fimbrias y proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Protein*, OMP). Se ha encontrado en su mayoría respuesta de células T frente a la infección, sin embargo, existe una respuesta específica de células B al exponerse a los antígenos (20).

El papel de la respuesta inmune mediada por linfocitos B frente a *Salmonella sp* ha sido objetivo de varios estudios (24–26) en los cuales se infectan ratones deficientes de células B (*Knock Out*, KO) con *S. Typhimurium*. Los ratones KO inmunizados con bacteria inactivada son capaces de contener la infección primaria, pero sin generación de inmunidad a largo plazo (24), además disminuye la DL_{50} (26). Asimismo, se observa un cambio en el perfil de células T CD4^+ , mostrando una incapacidad de secretar citocinas del perfil $\text{T}_{\text{H}1}$ ($\text{INF}\gamma$ e IL2) (24) y un cambio a perfil $\text{T}_{\text{H}2}$ (25) a comparación de los ratones sin deficiencia de linfocitos B.

Se ha establecido que en las vacunas contra patógenos invasores es de gran importancia el isotipo de anticuerpos inducidos (27). Por lo anterior, el estudio de la respuesta de anticuerpos inducida por las formulaciones vacunales contra *S. Typhi* adquiere una gran relevancia en el desarrollo de vacunas contra la fiebre tifoidea.

2.5 Vacunas contra la fiebre tifoidea

Se ha demostrado la existencia de diversos antígenos capaces de inducir un estado protector contra la fiebre tifoidea, por ejemplo, bacterias vivas atenuadas y el

antígeno Vi. Las vacunas formuladas en ausencia del antígeno Vi (Ty21a) también inducen protección contra *S. Typhi*, lo que indica la presencia de mecanismos T-dependientes e independientes para dicho antígeno (20).

2.5.1 Vacunas atenuadas contra la fiebre tifoidea

La vacuna Ty21a es la única vacuna atenuada aprobada contra la fiebre tifoidea (28). Es una formulación oral que consiste en bacteria atenuada a través de la mutación del gen *galE* e con la incapacidad de expresar el antígeno Vi. La inactivación del gen origina una acumulación intracelular de derivados de galactosa y finalmente lisis bacteriana, conservando la síntesis de LPS. Esta vacuna induce la activación de respuestas de anticuerpos anti-O dosis dependiente, así como anticuerpos del tipo IgG anti LPS e IgA específica al antígeno O; por otro lado, también se inducen respuestas celulares guiadas por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ secretoras de citocinas y actividades efectoras en contra de las células infectadas como de la bacteria completa (13). Mohakud y colaboradores han demostrado que la vacuna confiere protección del 67% con 3 dosis por vía oral hasta 7 años post-inmunización; sin embargo, la eficacia varía con la edad del individuo, principalmente en niños (28).

2.5.2 Vacunas de subunidades polisacáridos

Existen vacunas basadas en el antígeno Vi purificado debido a que es un antígeno que funge como factor de virulencia. Estas vacunas no están dirigidas a la activación de células T, por lo tanto, carecen de protección prolongada. La eficacia de estas formulaciones varía en ensayos clínicos entre un 46-80%. Estas vacunas, al ser pobremente inmunogénicas y funcionar por medio de mecanismos T-independientes no están recomendadas en niños (13).

2.5.3 Vacunas conjugadas contra la fiebre tifoidea

Una alternativa son las formulaciones vacunales conjugadas. Este tipo de vacunas combinan el polisacárido capsular Vi con una proteína portadora de interés, por ejemplo, la vacuna PedaTyph (BioMed) contiene el antígeno Vi conjugado con una proteína recombinante del toxoide tetánico. De esta manera, se pasa de una respuesta independiente a dependiente de células T, permitiendo su administración

en niños (13). Un estudio aleatorizado en India reportó un 100% de eficacia un año posterior a la inmunización en niños de 6 meses a 12 años (29). Otro estudio reporta la presencia del incremento del título de anticuerpos hasta 30 meses posterior a la vacunación (30).

Actualmente existen diversos candidatos vacunales conjugados, por ejemplo, Vi-rEPA une el antígeno Vi con una exoproteína A recombinante no tóxica de *Pseudomonas aeruginosa* con resultados del 91% de protección en niños de 2 a 5 años (28).

2.6 Porinas

Una característica de las bacterias gramnegativas es la presencia de membrana externa, compuesta principalmente de una bicapa lipídica que, por su naturaleza, es impermeable a los compuestos hidrofílicos (31). En 1976 se descubrió que en esta estructura existen moléculas, denominadas proteínas de membrana externa (OMP), capaces de formar canales para el ingreso de nutrientes o expulsión de desechos (32). Se propuso el término “porina” para las OMP que forman canales de difusión inespecíficos (32).

Se ha descrito que *S. Typhi* expresa múltiples porinas, constituidas principalmente por las proteínas OmpC y OmpF con un peso de 37 y 38 kDa respectivamente (32). Estas proteínas adoptan una conformación trimérica y tienden ligeramente a priorizar el paso de cationes por encima de aniones (32).

Para analizar estas moléculas, es posible aislarlas a través del método de Nikaido (32) donde se separa el lisado celular mediante centrifugación por gradiente de densidad con sacarosa o detergentes suaves como Sarkosyl (32), para posteriormente purificarlas por cromatografía de exclusión molecular.

Las porinas han sido el objeto de estudio en múltiples ensayos de inmunogenicidad. En 1986, en búsqueda de la estructura que induce una mayor respuesta de anticuerpos, Calderón *et al* (33). compararon los títulos de IgG e IgM anti-OMP, anti-flagelina y anti-LPS de *S. Typhi* en el suero de pacientes con fiebre tifoidea. Como resultado, las porinas mostraron un mayor título de inmunoglobulinas en la infección activa a comparación del LPS y la flagelina, por lo que concluyeron que estas

proteínas son buenos candidatos vacunales debido a su naturaleza inmunogénica (34). Estudios ulteriores confirmaron por medio de ELISA y Western Blot el aumento de títulos IgG e IgM anti-porinas en sueros de pacientes con fiebre tifoidea (34,35).

Posteriormente, Isibasi *et al.* observaron que la inmunización en ratón con porinas purificadas induce un estado protector capaz de generar una supervivencia del 100% frente a 100 veces la dosis letal 50 (LD₅₀) de *Salmonella Typhi* (36).

Finalmente, se estableció la dosis de 10 µg de porinas y se descubrió que inducen un 30% de protección cruzada contra *S. Typhimurium* (37).

Ante la falta de estudios de la respuesta de anticuerpos a largo plazo inducidos por la inmunización con porinas, en 2006, Secundino I *et al.* (38) Inmunizaron ratones BALB/c con porinas purificadas observando títulos de anticuerpos hasta 476 días posteriores a la inmunización. Además, se demostró la actividad bactericida de las inmunoglobulinas y la presencia de las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (38). En el mismo estudio se analizó la respuesta inducida por OmpC y OmpF individualmente, concluyendo que OmpC es la principal proteína responsable de la respuesta de anticuerpos bactericidas (38).

2.6.1 Uso de adyuvantes con porinas

Existen reportes del impacto del LPS en la inmunogenicidad de porinas de *S. Typhimurium*. En un primer estudio, se observó que la transferencia de anticuerpos anti-LPS en ratón no protege frente a reto con LD₅₀, mientras que la transferencia de IgG anti-Porina-LPS aumenta la protección a un 30% (39) con respecto al grupo al que se le transfirió solamente IgG anti-Porina, por lo que se concluye que el LPS tiene repercusión en la protección inducida por los anticuerpos IgG (39).

Más adelante, se realizó un análisis con anticuerpos monoclonales, encontrando que reconocían epítomos presentes en los complejos Porina-LPS (27). Sin embargo, es conocido que el LPS es pirogénico en humanos y otros mamíferos (40) por lo que se puede utilizar en las formulaciones vacunales y es necesario el análisis del efecto de otros adyuvantes en conjunto con las porinas.

Nandakumar K y Muthukkaruppan V realizaron un estudio comparando el título, subclase y grado de protección inducido por la inmunización con porinas de *S. Typhimurium* en combinación con otros compuestos, como el adyuvante completo de Freund (FCA), polioxidonio (PO) y LPS. Como resultado obtuvieron un incremento del título de anticuerpos IgM e IgG inducido por la combinación de Porinas-PO, seguido de Porinas-LPS y Porinas-FCA. Sin embargo, la capacidad protectora se redujo y se obtuvo el 90% de supervivencia con Porinas-LPS, 70% Porinas-PO y 40% Porinas-FCA frente al 100% de supervivencia inducida por la preparación cruda de porinas (27). Esto demuestra que un aumento del título de anticuerpos no es proporcional al incremento de la capacidad protectora por lo que el análisis de respuesta de anticuerpos no debe limitarse a la determinación del título de IgG totales y toma relevancia el estudio de la capacidad protectora de los anticuerpos inducidos por la inmunización.

En el mismo estudio se analizaron las diferentes subclases de IgG inducidas post inmunización con diferentes preparaciones, observándose un incremento de IgG2b en aquellos ratones con una mejor protección (Porinas-LPS) con respecto a la inducida por la inmunización con Porinas-FCA caracterizado por una reducción en IgG1 e incremento en magnitud de las demás subclases (27) lo que indica que el uso de adyuvantes influye en el patrón de subclases y tiene repercusión directa en la capacidad protectora inducida.

2.6.2 Alúmina

Se denomina alúmina, o también alumbre, a los adyuvantes basados en sales de aluminio como son el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y el sulfato de aluminio. Sin embargo, el hidróxido de aluminio (alhydrogel) es el adyuvante más utilizado (41).

El uso de estos adyuvantes se remonta hasta 1926, donde Glenn *et al* utilizaron alúmina como adyuvante para mejorar la inmunogenicidad del toxoide diftérico (42).

Esta molécula es capaz de adsorber al antígeno por medio de interacciones fisicoquímicas (42). El hidróxido de aluminio adsorbe más eficientemente a

proteínas a pH neutro (42). El adyuvante es capaz de tener efectos en el sistema inmunitario para incrementar la inmunogenicidad del antígeno, lo que permite modular la respuesta frente al antígeno y la dosis necesaria para provocar una respuesta inmune eficiente (43).

El hidróxido de aluminio (Alhydrogel) conlleva varias ventajas para ser considerado un buen adyuvante para nuestro propósito, entre ellas, se encuentra el costo accesible, facilidad de uso y estabilidad, además de que es una molécula aprobada para uso humano y veterinario con capacidad demostrada para aumentar el título de anticuerpos séricos (44).

2.7 Métodos de cuantificación de anticuerpos

Existen diversos métodos utilizados para la detección de moléculas que tienen como principio la reacción antígeno-anticuerpo. Debido a la especificidad de los anticuerpos, se utilizan como reactivos de identificación de alta precisión (4).

Gracias al descubrimiento y avance tecnológico en la formación de anticuerpos monoclonales (mAb), es posible generar mAb con sitios de unión específicos a moléculas blanco, por lo que la aplicación de estas reacciones se limita a la capacidad de generar un anticuerpo monoclonal contra el antígeno de estudio (4).

La detección y cuantificación de anticuerpos puede realizarse con distintos métodos, que van desde los más básicos como la inmunoprecipitación, aglutinación, etc., hasta métodos más complejos como RIA, ELISA, entre otros (4). Debido a que la técnica ELISA cuenta con alta sensibilidad y especificidad, además de ser un ensayo accesible, seguro y previamente estandarizado en nuestro laboratorio, es la principal técnica de elección para el presente estudio, es por ello que se hará énfasis en el siguiente apartado.

2.7.1 ELISA

Uno de los principales métodos usados para la determinación de título de anticuerpos es el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), el cual, es una modificación del radioinmunoensayo (*Radioimmunoassay*, RIA) (4,7,45,46).

El método RIA fue descrito en 1960 por Rosalyn Sussman Yalow y Salomon Benson (7,45,46). La técnica se utilizó para la detección de insulina plasmática endógena en diabéticos, por lo que la doctora Sussman ganó el premio Nobel en 1977 pues su ensayo fue crucial para el avance en endocrinología (7,45).

El radioinmunoensayo consiste en la unión de anticuerpos específicos a una fase sólida, como pozos de poliestireno de placas de titulación, y su interacción con antígenos marcados con radioisótopos y antígenos sin marcar (presentes en la muestra). Esto da lugar a una reacción competitiva donde la radioactividad medida es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (4,7).

A pesar de las ventajas que proporciona esta metodología, cuenta con muchos inconvenientes como los altos costos debido a la construcción de instalaciones especiales y la adquisición de equipo de precio elevado, además de la generación de desechos radioactivos y la falta de seguridad para el personal de laboratorio (45).

Como alternativa, en 1971, Peter Engvall y Eva Perlmann publicaron un artículo donde se determinó IgG de conejo a través de una modificación de RIA, denominada ELISA, donde se utiliza fosfatasa alcalina (enzima) en lugar de radioisótopos (45,46). En el mismo año, van Weemen y Schuurs determinaron gonadotropina coriónica humana en orina por medio de enzimoimmunoensayo (EIA) con peroxidasa de rábano picante (45,46).

El método ELISA consiste en la detección de antígenos o anticuerpos mediante anticuerpos conjugados con enzimas, las cuales reaccionan con sustratos y generan reacciones coloridas, fluorescentes o quimioluminiscentes medibles con equipos especializados (7). Según el requerimiento, existen variaciones de ELISA donde se determinan antígenos o anticuerpos cualitativamente, o bien, por medio de curva estándar se puede determinar la concentración de antígeno o anticuerpo en una muestra (7).

La ELISA indirecta se describió por primera vez por Lindström y Wager en 1978 para determinar IgG porcina (46). Esta técnica consiste en agregar la muestra, que contiene el anticuerpo primario, a una placa con el antígeno fijado. Posteriormente,

se retira el exceso de muestra con lavados y se agrega un anticuerpo secundario (anti-anticuerpo primario) conjugado con una enzima. El exceso se elimina con lavados y el resultado es visible gracias a la adición de sustrato y, en caso de ser necesario, cromógenos (4,7).

Esta metodología es extremadamente sensible y permite determinar moléculas que no son detectables por otros métodos, además de ser más seguras y menos costosas que procedimientos como RIA. Asimismo, la ELISA indirecta es la mejor técnica para la detección de inmunoglobulinas, por ejemplo, anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (7).

3. Planteamiento del problema

Los datos de inmunogenicidad que se han reportado provienen de porinas purificadas de la cepa *S. Typhi* 8, 12 Vid ATCC 9993, sin embargo, para el escalamiento de la producción de una vacuna efectiva se necesita analizar otras cepas que no cuenten con restricciones de propiedad intelectual para facilitar el proceso de producción sin comprometer la inmunogenicidad del antígeno. Además, para optimizar la producción, se requiere de un adyuvante que incremente la inmunogenicidad y capacidad protectora. Por lo anterior, en este estudio se probarán porinas provenientes de 3 cepas diferentes de *S. Typhi* para conocer su inmunogenicidad e investigar si en combinación con el adyuvante alúmina se puede optimizar la inmunogenicidad y la capacidad protectora de las diferentes preparaciones vacunales.

4. Preguntas de investigación

¿Las porinas provenientes de diferentes cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhi mostrarán la misma inmunogenicidad y capacidad protectora que las porinas de referencia provenientes de la cepa ATCC 9993?

Si utilizamos alúmina en la formulación vacunal ¿Se modificará el título y subclase de anticuerpos, así como el grado de protección contra la infección de *S. Typhi* en un modelo de ratón?

5. Hipótesis

El título de anticuerpos inducido por la inmunización con las diferentes formulaciones de porinas purificadas de *S. Typhi* no presentará diferencias significativas respecto a la inmunogenicidad de las porinas obtenidas de *S. Typhi* cepa ATCC.

El empleo de la alúmina en conjunto con las porinas incrementará en magnitud el título de anticuerpos, inducirá un cambio en el patrón de subclases de IgG y aumentará protección contra *S. Typhi*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo principal

Determinar y comparar el título de anticuerpos, subclase de IgG y grado de protección inducida por diferentes formulaciones vacunales contra la fiebre tifoidea mediante la inmunización en el modelo de ratón

6.2 Objetivos particulares

- Determinar el título de anticuerpos IgG e IgM inducido por las diferentes formulaciones de porinas de *S. Typhi* mediante ELISA.
- Determinar la subclase de anticuerpos IgG inducido por las diferentes formulaciones de porinas de *S. Typhi* mediante ELISA.
- Verificar el grado de protección inducido por las diferentes formulaciones de porinas de *S. Typhi* mediante reto de ratones inmunizados y determinación de UFC en bazo e hígado.

7. Materiales y métodos

1. Diseño de estudio

- Tipo de estudio: Experimental, prospectivo y longitudinal.

2. Universo

- Población: Ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad

3. Variables

- Variables dependientes: Título de anticuerpos IgG e IgM; Subclases de IgG; Capacidad protectora de las formulaciones vacunales.
- Variables independientes: Cepa de origen de las porinas; adyuvante.

Cepas productoras de porinas

- S. Typhi 9,12 Vid ATCC 9993 (ATCC) (47)
- S. Typhi UIMIQ A (48)
- S. Typhi UIMIQ B (49)

4. Técnicas o instrumentos

Técnicas:

- Determinación de anticuerpos IgM e IgG por medio de ELISA
- Determinación de subclases de IgG por medio de ELISA
- Determinación de grado de protección a través de reto y cuantificación de UFC.

Instrumentos

- Micropipetas de 20-200, 100-1000 y 0.5-5 mL (ThermoScientific)
- Micropipeta multicanal 30-300 mL (ThermoScientific)
- Lector de placas de ELISA Epoch (BioTek)
- Centrífuga Rotina 420R (Sigma Aldrich)
- Homogeneizador TissueLyser II (Qiagen)
- Gabinete de bioseguridad (Heal Force)

5. Procedimiento

- Obtención de Porinas

Se extrajeron las porinas de las 3 cepas de *Salmonella* Typhi mediante el método de Nikaido descrito en literatura (32) con ligeras modificaciones.

A grandes rasgos, se cultivó *S. Typhi* y se cosechó al llegar a la fase logarítmica de crecimiento (Densidad óptica a 540 nm=1.0) por centrifugación a 5,000 rpm, 20 minutos a 3°C. La biomasa obtenida se rompió en un homogenizador, se separó por centrifugación a 15,000 g a 4°C por 15 minutos. El pelet obtenido se sometió a ultracentrifugación a 15,000 g a 37°C por 45 minutos.

El botón obtenido se resuspendió en amortiguador de Nikaido (EDTA 0.005M, SDS 1%, Tris 0.05M, NaCl 0.4M; pH 7.7) y se incubó por 2h con agitación constante a 37°C. Se ultracentrifugó la suspensión a 15,000g a 20°C durante 45 minutos.

Por último, las porinas se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular en columna de separación AP-5 waters con Sephacryl S-200 con amortiguador de Nikaido. Las fracciones correspondientes a las porinas purificadas se sometieron a diálisis de 72h con PBS a pH 7.2.

Se cuantificó la concentración de proteína mediante el ensayo colorimétrico con ácido bicinconínico (Kit para determinación de proteína por BCA, Pierce). A una alícuota de 0.1 mL de la solución de proteína se le añadieron 2 mL de reactivo de trabajo (Reactivo A: Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico, tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1M; reactivo B: sulfato cúprico al 4%) en baño de agua a 37°C en ausencia de luz por 30 minutos. Se obtuvo la densidad óptica a 562 nm y se interpoló la concentración de proteína en una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0.0 a 2,000 µg/mL.

- Esquema de inmunización

En la primera etapa del proyecto, se realizaron diluciones de porinas de cada cepa a una concentración de 10 µg de proteína en 50 µL de solución salina inyectable (SSI) por ratón. Como controles negativos se administraron 50 µL de solución salina

inyectable. La administración de cada dosis de antígeno se realizó según la distribución de los grupos de estudio mostrados en la **Tabla 2**. El esquema constó de dos dosis: la primera inmunización (Día 0) por vía intraperitoneal (IP) y un refuerzo al día 14 con el mismo antígeno, vía y dosis tal como se observa en la **Figura 1**.

Grupo	n (ratones)	Contenido	SSI (μL)	Porinas (μg)	Dosis
1	10	Control negativo	50	0	2
2	10	ATCC	c.b.p. 50	10	2
3	10	UIMIQ A	c.b.p. 50	10	2
4	10	UIMIQ B	c.b.p. 50	10	2

Tabla 2. Distribución de los grupos de estudio en la primera parte del proyecto. Se utilizaron 4 grupos de 10 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad inmunizados en un esquema de dos dosis espaciadas por 2 semanas entre cada una.

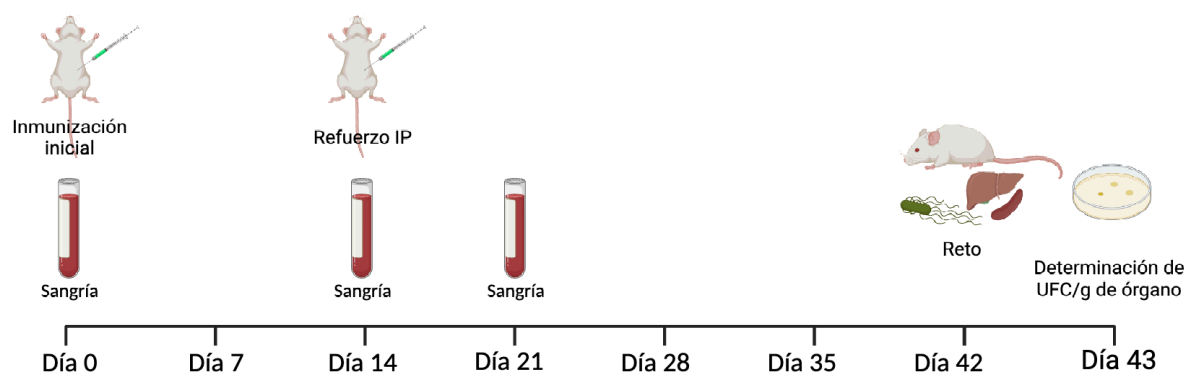


Figura 1. Descripción general del plan de trabajo en la primera parte del proyecto. En la primer parte del proyecto se realizó un esquema de inmunización seguido de sangrías y posterior reto en los grupos de estudio. Brevemente, al día 0 se realizó una sangría de prueba y se inmunizaron a todos los grupos de estudio, 14 días posteriores se aplicó una segunda dosis de refuerzo y extracción de sangre por vena facial. Al día 21 se realizó una tercer sangría a todos los grupos de estudio. 42 días posteriores a la primer inmunización, los ratones fueron infectados y posteriormente sacrificados para la determinación de UFC en bazo e hígado al día 43.

La segunda etapa del proyecto inició con una primera inmunización (Día 0) de cuatro grupos como se presenta en la **Tabla 3**. El inóculo del grupo Porina se preparó de la misma manera que en la primera etapa del proyecto; el grupo Alúmina se administró con 25 μL de solución salina y 25 μL de solución de hidróxido de aluminio (alúmina); el grupo Porina/Alúmina se administró con 25 μL de una disolución de porinas a 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 25 μL de alúmina. Para repetir las condiciones en artículos

previamente descritos (36), se inmunizaron los grupos SSI y Porina por vía intraperitoneal (IP) en un esquema de dos dosis espaciados por 14 días entre inmunizaciones; por otra parte, debido a la teoría de mecanismo de depósito del hidróxido de aluminio, los grupos Alúmina y Porina/Alúmina se inmunizaron por vía intramuscular (IM) en un esquema de dos dosis espaciados por 21 días entre ellas, tal como se representan en la **Figura 2**.

Grupo	n (ratones)	Contenido	SSI (μ L)	Porinas (mL)	Alúmina (mL)	Dosis
1	10	Control negativo	50	0	0	2
2	10	Porinas	c.b.p. 50	10	0	2
3	10	Alúmina	c.b.p. 25	0	25	2
4	10	Porinas/Alúmina	c.b.p. 25	10	25	2

Tabla 3. Distribución de los grupos de estudio en la segunda parte del proyecto. Se utilizaron 4 grupos de 10 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad inmunizados en un esquema de dos dosis espaciadas por 2 semanas entre cada una.

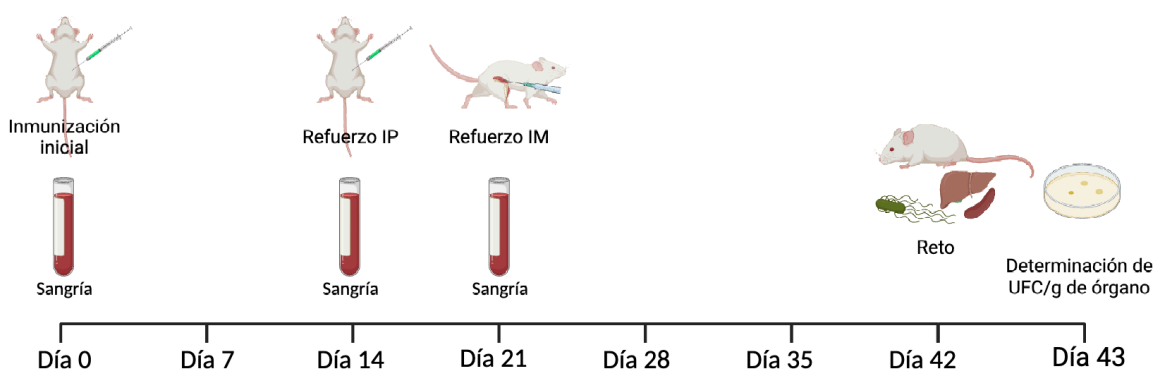


Figura 2. Descripción general del plan de trabajo en la segunda parte del proyecto. En la segunda parte del proyecto se realizó un esquema de inmunización seguido de sangrías y posterior reto en los grupos de estudio. Brevemente, al día 0 se realizó una sangría de prueba y se inmunizaron a todos los grupos de estudio, 14 días posteriores se aplicó una segunda dosis de refuerzo a los grupos Porinas y SSI, 21 días posteriores se aplicó la segunda dosis de refuerzo a los grupos Alúmina y Porina/Alúmina. Se realizaron sangrías los días 14 y 21 posteriores a la primer dosis. 42 días después de la primer inmunización, los ratones fueron infectados y posteriormente sacrificados para la determinación de UFC en bazo e hígado al día 43.

En la tercera etapa del proyecto, se realizó una repetición de los grupos de estudio mostrado en la **Tabla 3**. El plan de trabajo se asemeja a lo estipulado en la segunda etapa, sin embargo, en esta ocasión no se realizó el reto al día 42 y las sangrías se distribuyeron de manera más extensa, como se muestra en la **Figura 3**.

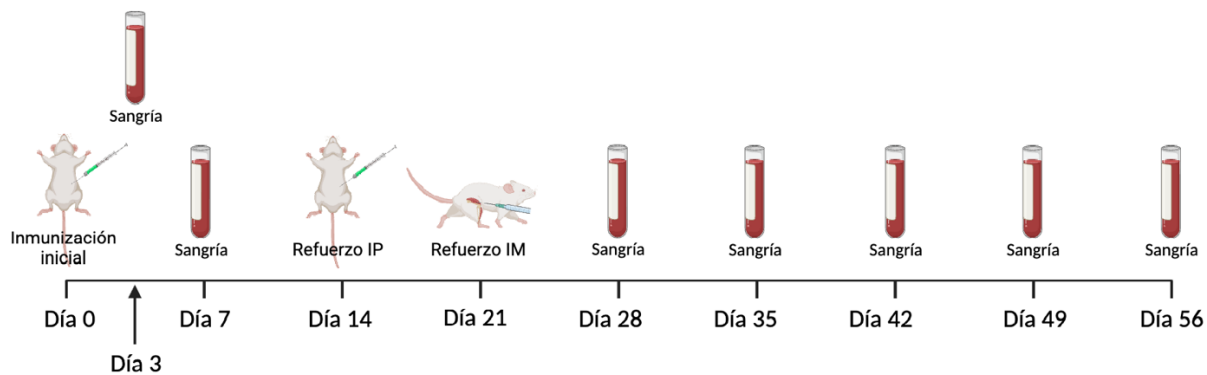


Figura 3. Descripción general del plan de trabajo en la tercera parte del proyecto. En la tercera parte del proyecto se repitió el esquema de inmunización realizado en la segunda parte con dosis al día 0 y una dosis de refuerzo por vía intraperitoneal a los grupos SSI y Porinas a los 14 días mientras que los grupos Alúmina y Porina/Alúmina un refuerzo por vía intramuscular al día 21. Se realizaron extracciones de sangre por vena facial a los días 3, 7, 28, 35, 42, 49 y 56 posteriores a la primer inmunización para completar la cinética de anticuerpos.

- Sangría

Se realizó la toma de muestra de cada ratón por medio de punción de vena facial. Se recolectaron alrededor de 100-150 μL de sangre en tubos microtainer con gel separador, en todo momento se priorizó la integridad del ratón por encima del volumen obtenido de muestra.

- Determinación del título de anticuerpos

Las porinas de *S. Typhi* de la cepa ATCC se diluyeron en amortiguador de carbonatos (Apéndice 1) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En placa de 96 pozos EIA/RIA (Costar) se adicionaron 100 μL de la dilución de porinas a todos los pozos y se incubaron a 37°C por 90 minutos. Posteriormente, se decantó la solución de antígeno y se bloquearon las placas con 200 μL de PBS-Leche 5% (Apéndice 1). Se incubaron toda la noche a 4°C.

Las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 0.1% (Apéndice 1). Se agregaron 100 μL de PBS-Leche-Tween a todos los pozos, 95 μL extra a la fila A y se añadieron 5 μL del suero del ratón a los pozos de la fila A. Se realizaron diluciones seriadas según el siguiente esquema:

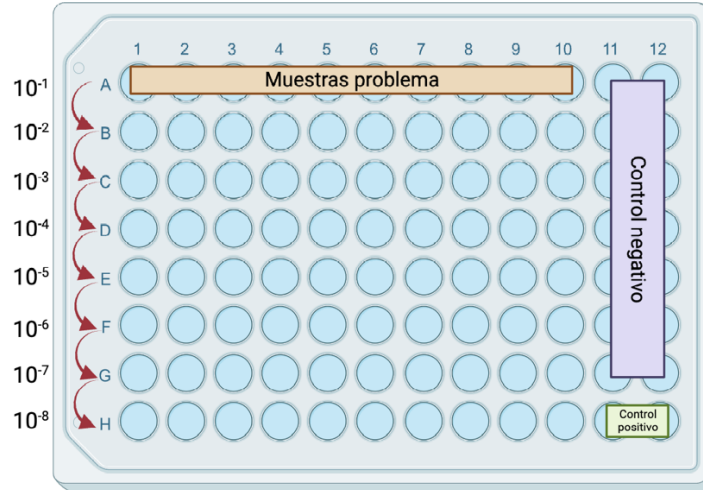


Figura 4. Distribución de muestras y controles en ensayos ELISA. Se adicionaron 100 μL de PBS-Leche-Tween 0.05% a todos los pozos de la placa, adicionalmente 95 μL de PBS-Leche-Tween 0.05% en la fila A. En los pozos A1 al A10 se adicionaron 5 μL de muestra problema en los 195 mL de PBS-Leche-Tween 0.05% de la primer fila. Se tomaron 100 μL de todos los pozos A1 al A12 y se transfirieron a la fila B, se homogenizaron y se repitió la misma dilución en las siguientes filas hasta la H repitiendo el procedimiento. Al finalizar, se adicionaron 25 μL de suero hiperinmune en los pozos H11 y12 como control positivo.

Se agregaron sueros hiperinmunes contra porinas de *S. Typhi* ATCC 9993 como controles positivos en los pozos indicados y se incubó la placa por 1 hora a 37°C.

Posteriormente, se lavaron 4 veces las placas con PBS-Tween 20 0.1% (Apéndice 1) y se añadieron 100 mL de la disolución de anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario difirió según la determinación:

Tabla 4. Anticuerpos secundarios y diluciones utilizadas en ensayos ELISA. Se muestran los anticuerpos y diluciones utilizadas para las diferentes determinaciones de anticuerpos mediante ELISA.

Determinación	Anticuerpo	Dilución
IgG Total	invitrogen Gt anti Ms IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate	1:4000
IgM Total	invitrogen Gt anti Ms IgM Heavy Chain Secondary Antibody, HRP conjugate	1:2000
IgG1	invitrogen HRP-Rat Anti-Mouse IgG1	1:1000
IgG2a	life technologies Goat anti-Mouse IgG2a (γ), HRP conjugate	1:2000
IgG2b	invitrogen HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG2b	1:3000
IgG3	invitrogen Gt anti-Ms IgG3 Secondary Antibody, HRP conjugate	1:2000

Se incubó por una hora. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 y una vez adicional con PBS. Se añadieron a cada pozo 100 μL de solución reveladora de O-fenilendiamina (OPD) 0.65M/Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0.003% (Apéndice 1)

y se incubaron las placas en oscuridad por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción con 10 μ L de ácido sulfúrico 2.5 N (Apéndice 1) y se leyeron en el lector de placas Epoch BioTek a 492 nm. Se graficaron los títulos obtenidos y se determinaron las diferencias significativas por medio de una prueba de ANOVA y comparación múltiple de Dunnett.

- Preparación de suspensión bacteriana para infección

Se estrió en una placa de agar LB una asada de *Salmonella entérica* serovar Typhi cepa S. Typhi 9,12 Vid ATCC 9993. Se incubó la placa a 37°C por una noche. Al día siguiente, se inocularon 20 mL de agar LB con una colonia previamente aislada de S. Typhi y se incubaron a 37°C 180 rpm toda la noche (*Over Night*, ON).

Un día después, en condiciones de bioseguridad nivel 2, se diluyó una muestra de 200 μ L del ON en 1800 μ L de solución salina estéril y se midió la densidad óptica en espectrofotómetro a 540 nm. Determinada la densidad óptica de la dilución del *Over Night*, se determinó el volumen a adicionar del ON en un volumen final de 20 mL para obtener una densidad óptica aproximada a 0.05 según la siguiente fórmula:

$$Volumen = \frac{(Densidad\ óptica\ final)(Volumen\ final)}{Densidad\ óptica\ inicial} = \frac{(0.05)(20mL)}{D.O.}$$

La dilución se incubó a 37°C a 180 rpm durante 3 horas. Se midió la densidad óptica, en caso de obtener DO menor a 1, se continuó con la incubación hasta obtener la DO de 1. Se tomaron 10 mL de la solución y se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos. El pelet obtenido se transfirió a un tubo cónico de 2 mL y se resuspendió en PBS, se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos. Se repitió el lavado una vez adicional.

En una placa de cultivo celular de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana obtenida en 180 mL de PBS. Se plaquearon en agar LB 20 μ L de las últimas cuatro diluciones distribuídas de la siguiente forma:

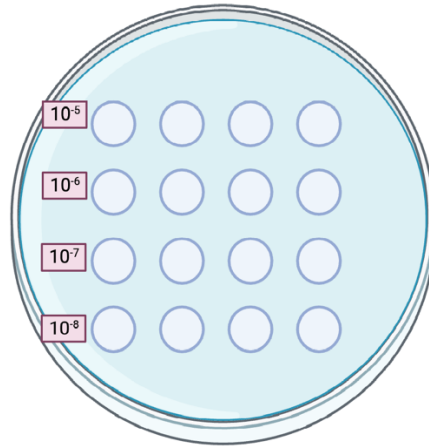


Figura 5. Distribución de muestras en plaqueo para preparación bacteriana

Se incubaron a 37°C por 24 horas. Se contaron las UFC y se determinó la concentración de bacteria en la suspensión.

- Reto

La suspensión bacteriana fue diluída a una concentración aproximada a 1×10^8 UFC/mL diluyendo en 10 mL el volumen determinado por la siguiente fórmula

$$Volumen = \frac{(10^8 \text{ UFC/mL})(10 \text{ mL})}{\text{Concentración determinada previamente}}$$

Se realizaron diluciones seriadas por triplicado de la dilución en una placa de cultivo celular de 96 pozos (Nest) con 180 μ L de PBS para determinar la dosis infectiva real. Se plaquearon 20 mL de cada dilución en agar LB según se observa en la figura 5.

Se incubaron todas las placas a 37°C por 24 horas y posteriormente se cuantificaron las UFC para determinar la concentración infectiva real.

En gabinete de bioseguridad, se infectaron a los ratones con 100 μ L de la dilución de bacteria 1×10^8 por vía intraperitoneal. Se dejaron a los ratones en reposo durante 18 horas manteniendo ciclo de luz/oscuridad cada 12 horas.

- Determinación de UFC/g de órgano

En condiciones de esterilidad se rotularon dos tubos Eppendorf SafeLock de 2 mL por cada ratón siguiendo la siguiente nomenclatura:

Tabla 5. Nomenclatura utilizada en grupos de estudio. La nomenclatura seguida consta de una parte numérica indicativa de cada grupo y subgrupo, así como una parte alfabética indicativa del órgano extraído de cada ratón.

Grupos		
Determinación de:	Cepas	Adyuvante
Número	Grupo	Grupo
1	SSI	SSI
2	ATCC	Porina
3	IMSS	Alúmina
4	AT	Porina/Alúmina

Subgrupos	
Numero	Subgrupo
1.1	Ratón 1
1.2	Ratón 2
1.n	Ratón n

Órganos	
Letra	Órgano
H	Hígado
B	Bazo

En gabinete de bioseguridad, a cada tubo se le agregó 1 mL de PBS estéril y un balín de acero inoxidable previamente esterilizado. Se registró el peso de cada Eppendorf.

Los ratones previamente infectados se anestesiaron con 120 μ L de Xilacina/Ketamina 17.5/2.5 mg/mL y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. En condiciones de esterilidad, se realizó la extracción de hígado y bazo de cada ratón depositando el órgano correspondiente a cada tubo. Se registró nuevamente el peso de los Eppendorf y mediante diferencia de pesaje se determinó la masa de cada órgano obtenido.

Se homogenizó el tejido por medio del homogeneizador TissueLyser II (Qiagen) por dos ciclos (24 Hz por 1 minuto cada ciclo).

En gabinete de bioseguridad, se rotularon placas de cultivo celular de 96 pozos siguiendo la nomenclatura previamente descrita con la siguiente estructura:

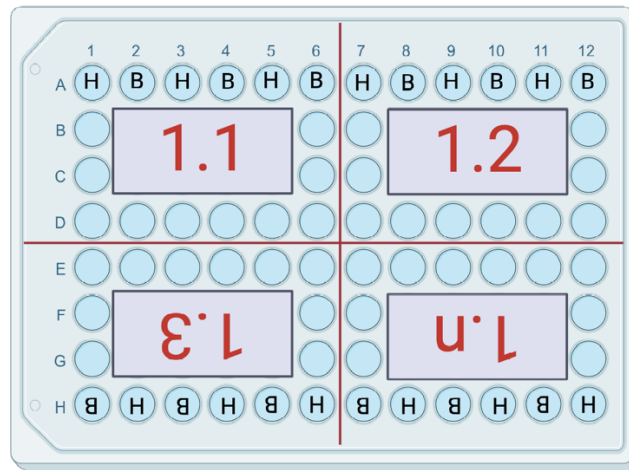


Figura 6. Distribución de muestras en determinación de grado de protección.

A cada pozo se agregaron 180 μL de PBS estéril. A la primera fila se le agregaron 20 μL del sobrenadante del tejido homogenizado según indica el rótulo y se realizaron diluciones seriadas de 100 μL según se ejemplifica en la **Figura 7**.

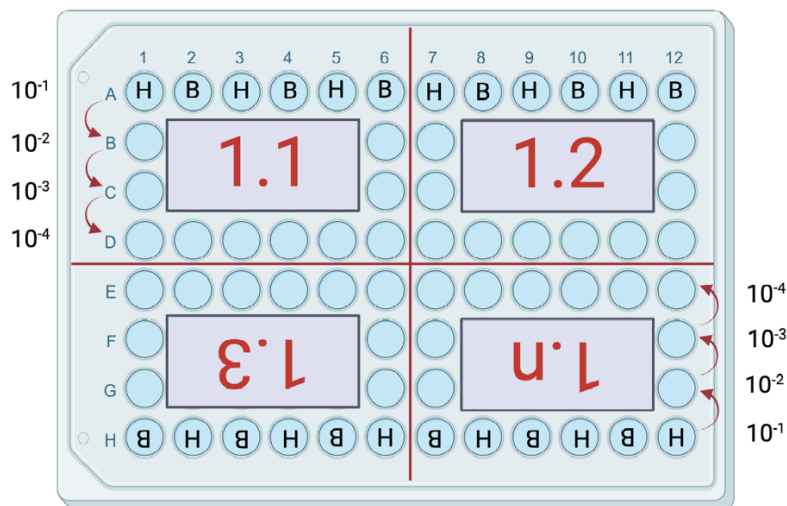


Figura 7. Diluciones realizadas en determinación de grado de protección

Posteriormente, con pipeta multicanal, se tomaron 20 μL de las diluciones más bajas (10^{-4}) y se depositaron en la parte inferior de una placa de agar LB. Se desecharon las puntas y se repitió el procedimiento para las siguientes diluciones empezando de

la dilución más baja a la más alta. La distribución de las muestras se realizaron según lo observado en la **Figura 8**.

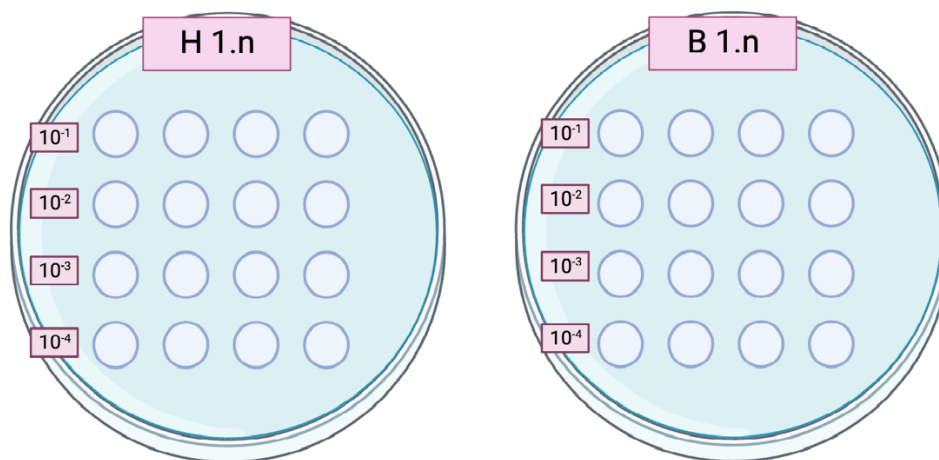


Figura 8. Distribución de diluciones plaqueadas para determinación de UFC/g de órgano.

Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Al día siguiente, se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) en cada placa. Con los datos obtenidos, se calcularon las UFC por gramo de órgano, se graficó en el programa GraphPad Prism v.8 y se determinó la significancia estadística de cada grupo comparado con el control negativo (SSI) con un análisis de Kruskal-Wallis y un post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn.

6. Análisis estadísticos

Se analizó el título de anticuerpos utilizando ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnett.

Para determinar carga bacteriana en hígado y bazo se realizó un análisis de Kruskal-Wallis y un post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn

8. Resultados y discusión

8.1 Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de porinas provenientes de diferentes cepas de *S. Typhi*

Para analizar la respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con porinas de las tres cepas propuestas, se determinó el título de anticuerpos IgG_T anti-porina presentes en sangre de ratón 0, 14 y 21 días posteriores a la administración del antígeno, los cuales son presentados en la **Figura 9**.

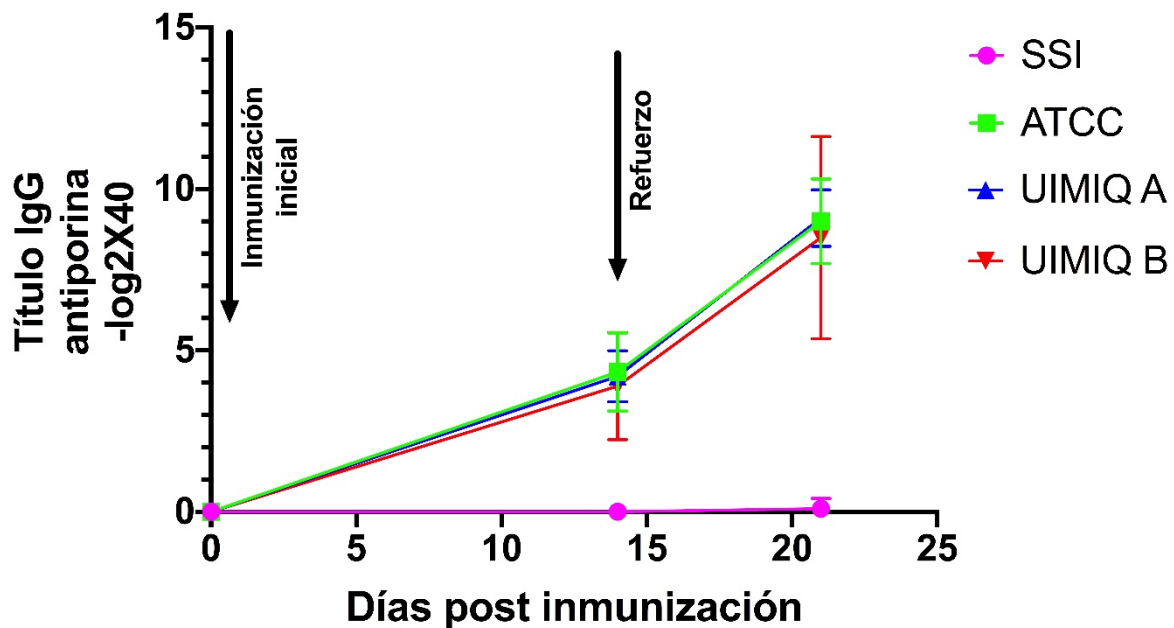


Figura 9. La cepa de *S. Typhi* de origen de las porinas no influye en el título de anticuerpos IgG_T anti-porina inducidos por inmunización en ratón. En la gráfica se presentan los títulos de anticuerpos IgG_T en sangre periférica de ratones BALB/c obtenidos mediante ELISA. SSI= Solución salina isotónica, ATCC= Porinas provenientes de la cepa 9, 12 Vid ATCC9993; UIMIQ A= Porinas provenientes de la cepa UIMIQ A, UIMIQ B= Porinas provenientes de la cepa UIMIQ B. n= 10, prueba estadística= ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnet post hoc.

En la **Figura 9** se representan los títulos de IgG_T anti-porina correspondientes a las 3 cepas de estudio, así como del control negativo. Se observa un incremento del título de anticuerpos inducido por la inmunización con porinas de las tres cepas a los días 14 y 21 a comparación del grupo control negativo (rosa). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de anticuerpos del grupo ATCC (verde) y los grupos UIMIQ A (azul) y UIMIQ B (rojo).

El grado de protección se determinó mediante la infección por vía IP de los ratones inmunizados con porinas provenientes de las 3 cepas de estudio. A cada ratón se

le administraron 2.83×10^7 UFC de *Salmonella Typhi* de la cepa ATCC (cuantificación realizada por medio de diluciones y plaqueo, ver “Reto” en *Procedimiento*). 18 horas después, se llevó a cabo la determinación de UFC/g de hígado y bazo por medio de la técnica de descrita previamente, los resultados se muestran en la **Figura 10**.

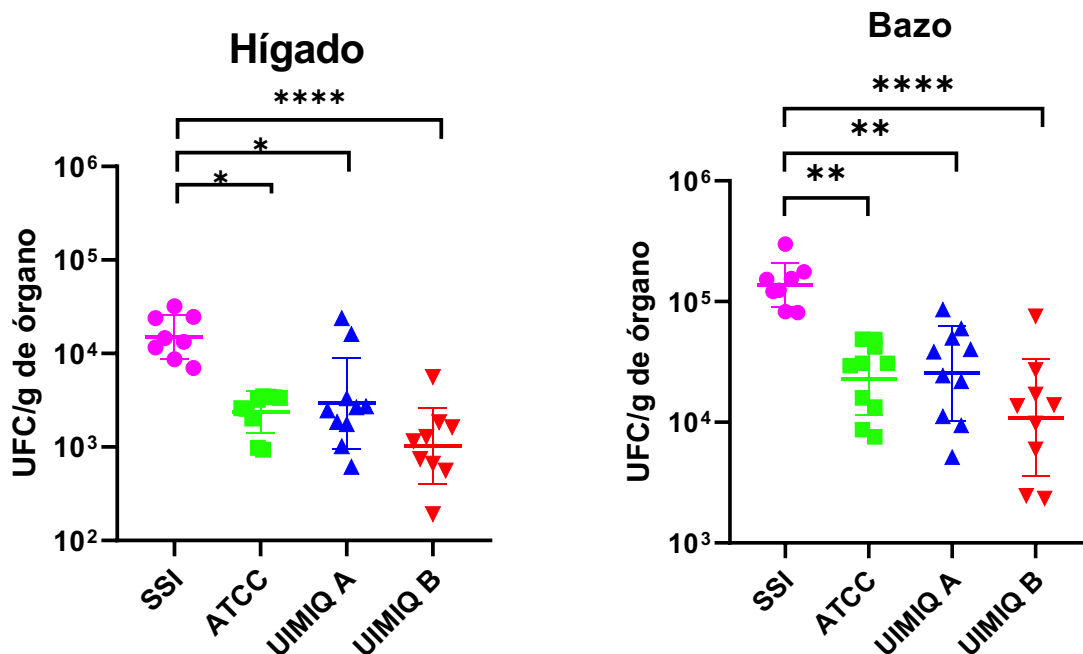


Figura 10. La inmunización con porinas provenientes de las cepas UIMI Q A y UIMI Q B brindan un grado de protección similar a la inmunización con porinas de la cepa ATCC. En la gráfica se presentan las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo de hígado y bazo. SSI= Solución salina isotónica, ATCC= Porinas provenientes de la cepa 9, 12 Vid ATCC9993; UIMI Q A= Porinas provenientes de la cepa UIMI Q A, UIMI Q B= Porinas provenientes de la cepa UIMI Q B. Dosis infectiva = 2.83×10^7 UFC/ratón, $n=10$, prueba estadística = Kruskal-Wallis y análisis múltiple de Dunn post hoc.

Del lado izquierdo de la **Figura 10** se muestran las UFC determinadas en hígado mientras que, del lado derecho, las UFC en bazo. En hígado, el control negativo (rosa) tiene una media mayor a 10^4 UFC mientras que en el grupo ATCC (verde) y UIMI Q A (azul) presentan un promedio superior a 10^3 UFC y una diferencia estadísticamente significativa para ambos ($p=0.0201$) frente al control negativo. El grupo UIMI Q B (rojo) mostró una menor media, aproximándose a 10^3 UFC con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) comparada con el grupo SSI.

En bazo, el grupo inmunizado con solución salina (rosa) cuenta con un promedio mayor a 10^5 UFC, por otra parte, los grupos ATCC (verde) y UIMIQ A (azul) tienen una media superior a 10^4 UFC y una diferencia significativa ($p=0.0029$ y 0.0074) frente al control negativo. En el grupo UIMIQ B (rojo) se detectó menor cantidad de bacteria, con una media aproximada a 10^4 UFC y mayor diferencia significativa ($p<0,0001$).

A pesar de que la cepa UIMIQ B muestra aparentemente un incremento en la protección con respecto al resto de grupos, es importante repetir el estudio para demostrar que el uso de porinas provenientes de esta cepa mejora la protección, por lo que en los resultados existe una tendencia que favorece a la elección de la cepa atenuada para continuar con el estudio. A partir de este punto, el grupo será renombrado como “Porina” teniendo implícito la cepa de procedencia (UIMIQ B).

8.2 Evaluación del impacto de la alúmina sobre la inmunogenicidad de las porinas

El análisis de la respuesta de anticuerpos anti-porina IgG_T presentes en sangre de ratón inducida por la administración de alúmina como adyuvante se determinó por medio de ELISA. Los resultados se muestran en la **Figura 11**.

Las inmunizaciones de refuerzo para las administraciones vía IP (Grupo SSI y Porina) se llevaron a cabo en el día 14 mientras que los refuerzos IM (Grupo Alúmina y Porina/Alúmina) se aplicaron al día 21. Los ratones se sacrificaron el día 42 posterior a la inmunización. El experimento se repitió alargando la vida de los ratones hasta el día 56 para analizar la cinética de anticuerpos posteriores al día del reto.

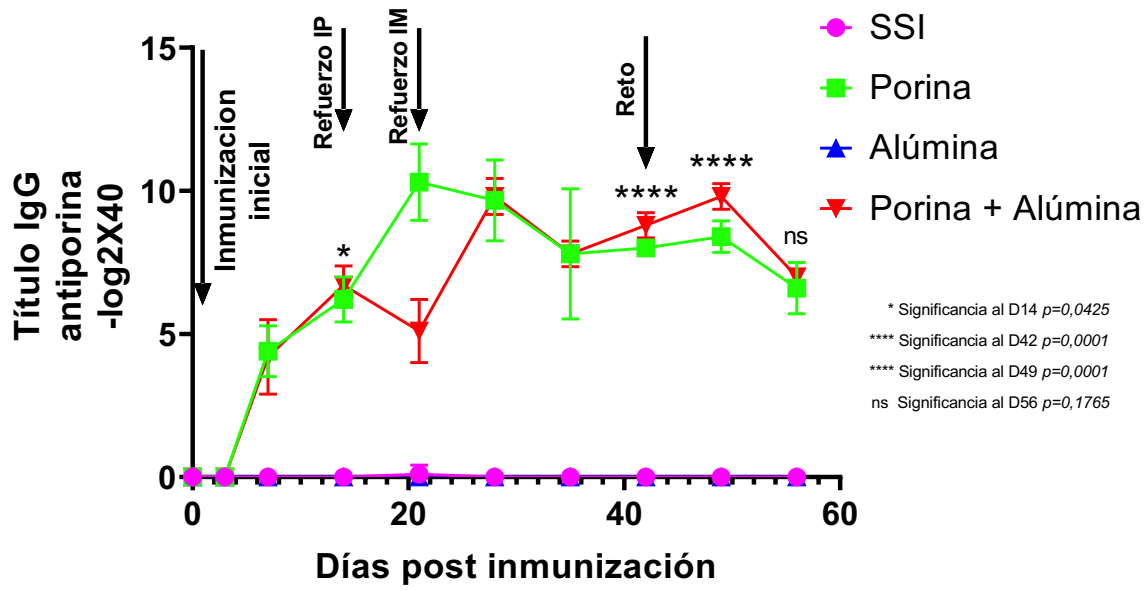


Figura 11. El uso de alúmina como adyuvante en la inmunización de ratón con porinas induce un aumento en el título de anticuerpos IgG_T anti-porina al día 42 post-inmunización. Se presentan los títulos de anticuerpos IgG_T en sangre periférica de ratones BALB/c obtenidos mediante ELISA. SSI= Solución salina isotónica, Porina = Porinas en ausencia de adyuvante; Alúmina = Hidróxido de aluminio en ausencia de antígeno, Porina + Alúmina = Porinas con hidróxido de aluminio, n= 8, prueba estadística= ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnet post hoc.

En la figura anterior podemos observar la nula respuesta de anticuerpos anti-porina inducida por la solución salina (rosa) y la alúmina (azul), ambos funcionando como son los controles negativos. Aumentó en el título de anticuerpos en los grupos tratados con Porina (verde) y con Porina/Alúmina (rojo) tras la inmunización inicial, solamente se detectaron diferencias significativas entre estos grupos en el día 14 ($p=0.0425$). En el día 21 se muestra un incremento en el título de anticuerpos inducido por la inmunización de refuerzo en el grupo Porina mientras que el título del grupo Porina/Alúmina decae pues no contó con una segunda dosis. En el día 28 se observa el aumento del título de anticuerpos inducida por la dosis de refuerzo aplicada al grupo Porina/Alúmina mientras que el título del grupo que recibió Porina decae, ambos títulos no muestran diferencias significativas entre ellos. Para el día 42 y 49, la inmunización del grupo Porina/Alúmina incrementó su título superior al del grupo Porina ($p<0.0001$) sin embargo, los títulos decaen hasta converger en el día 56 donde no se detectaron diferencias significativas.

Es importante señalar que, una vez aplicadas ambas inmunizaciones, los títulos no presentaron diferencias hasta el día 42, fecha de la infección y posteriormente se sacrificaron, por lo que, al momento de evaluar el grado de protección, el grupo tratado con Porina/Alúmina presentó un título de anticuerpos mayor al grupo que recibió Porinas.

Como parte del estudio, también se evaluó la respuesta de anticuerpos IgM en sangre de ratón por medio de ELISA, graficando los títulos en la **Figura 12**.

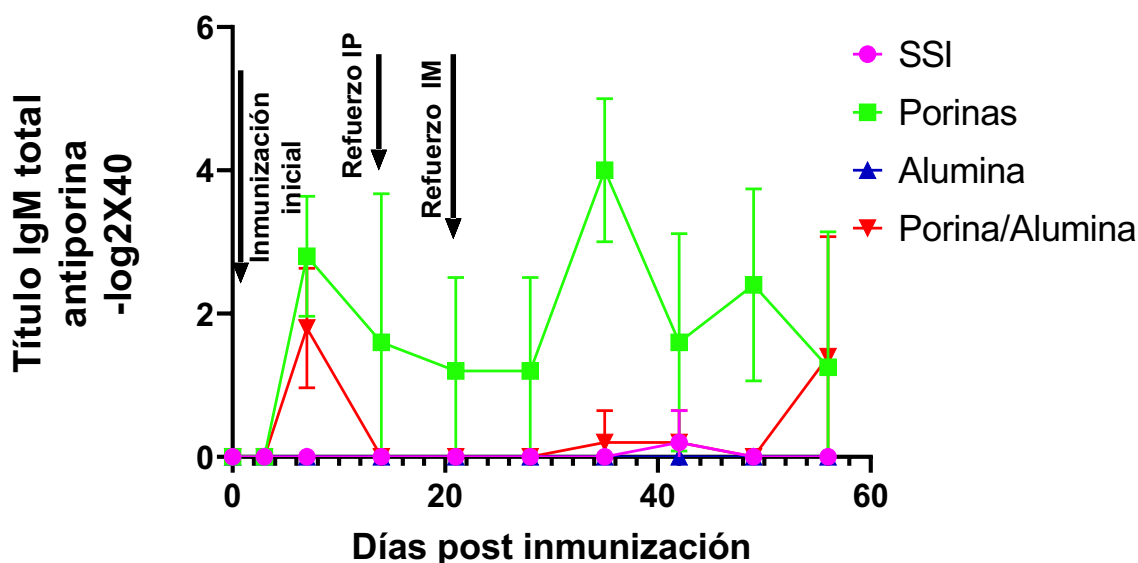


Figura 12. Las porinas en ausencia de adyuvante inducen un aumento en el título de IgM. Se presentan los títulos de anticuerpos IgM_T en sangre periférica de ratones BALB/c obtenidos mediante ELISA. SSI= Solución salina isotónica, Porina = Porinas en ausencia de adyuvante; Alúmina = Hidróxido de aluminio en ausencia de antígeno, Porina + Alúmina = Porinas con hidróxido de aluminio, n= 8, prueba estadística= ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnet post hoc.

En la gráfica se muestra el incremento del título de anticuerpos 7 días posteriores a la inmunización inicial inducida al administrar Porina (verde) y Porina/Alúmina (rojo) en contraposición a la nula respuesta de los controles negativos SSI (rosa) y Alúmina (azul). También se destaca la disminución de anticuerpos del grupo tratado con Porina/Alúmina mientras que el grupo que recibió únicamente Porinas se mantuvo con un título mayor y variable.

Se realizó la evaluación del grado de protección inducida por la inmunización con alúmina en la formulación vacunal a través de un modelo de infección IP en ratón.

Se administraron 1.3×10^8 UFC de *Salmonella* Typhi cepa ATCC por ratón. Se utilizó la técnica de microgota para determinar el número de UFC/g en hígado y bazo. Los resultados se presentan en la **Figura 13**.

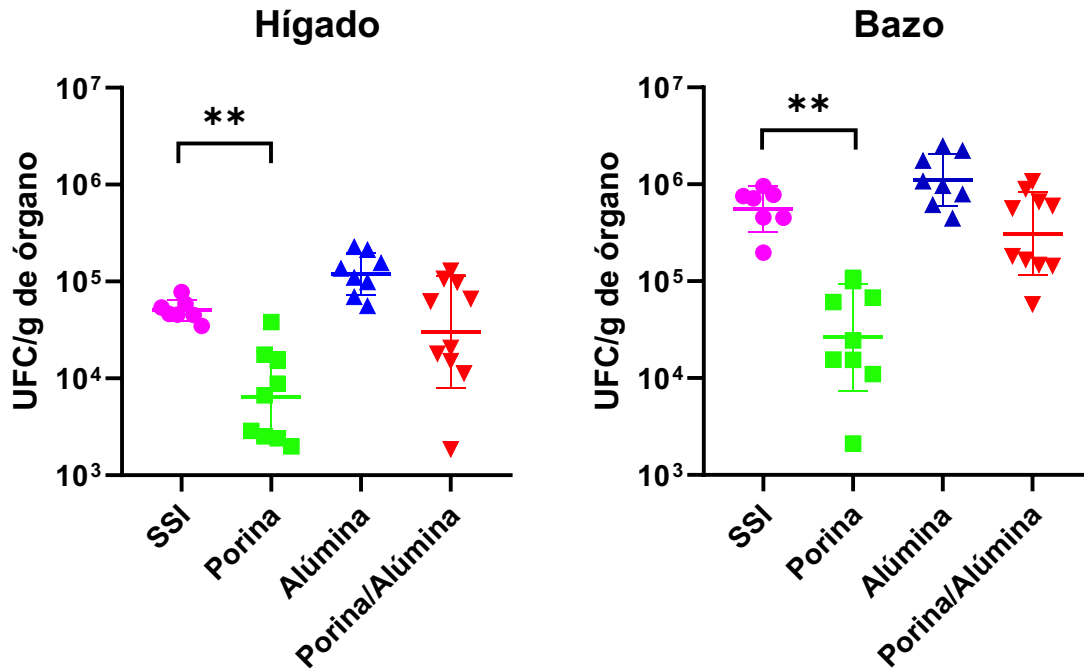


Figura 13. El uso de alúmina como adyuvante disminuye el grado de protección inducido por la inmunización con porinas. Se presentan las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo de hígado y bazo. SSI= Solución salina isotónica, Porina = Porinas en ausencia de adyuvante; Alúmina = Hidróxido de aluminio en ausencia de antígeno, Porina + Alúmina = Porinas con hidróxido de aluminio Dosis infectiva = 2.83×10^7 UFC/ratón, $n=8$, prueba estadística = Kruskal-Wallis y análisis múltiple de Dunn post hoc.

Del lado izquierdo se muestran los resultados obtenidos en hígado, donde se presenta de color rosa al control negativo con una media inferior a 10^5 UFC. De color verde se representa el grupo tratado con Porinas con una media inferior a 10^4 UFC y una diferencia significativa ($p=0,0043$). También es importante destacar que el grupo que recibió alúmina (azul) mostró un promedio mayor a 10^5 UFC mientras que el grupo administrado con Porina/Alúmina (rojo) mostró una media inferior a 10^5 UFC, ninguno de los dos grupos presentó diferencias significativas. Del lado derecho se presentan los resultados en gráfica de puntos para bazo, los controles negativos (rosa y azul) muestran una media superior a 10^5 UFC, se observa una carga bacteriana similar en el grupo Porina/Alúmina en el que no se identificaron

diferencias significativas. El único grupo que mostró diferencias estadísticas ($p=0.0043$) fue el grupo tratado con Porinas, donde se observa una disminución en la media de 10^4 UFC.

Para analizar la causa de la disminución de la protección, se decidió realizar la determinación del título de subclases de IgG de ratón por medio de ELISA. Se realizó el análisis en suero de ratón obtenido al día 28 y 42 posterior a la inmunización, los datos obtenidos se reportan en las **Figuras 14** y **15** respectivamente.

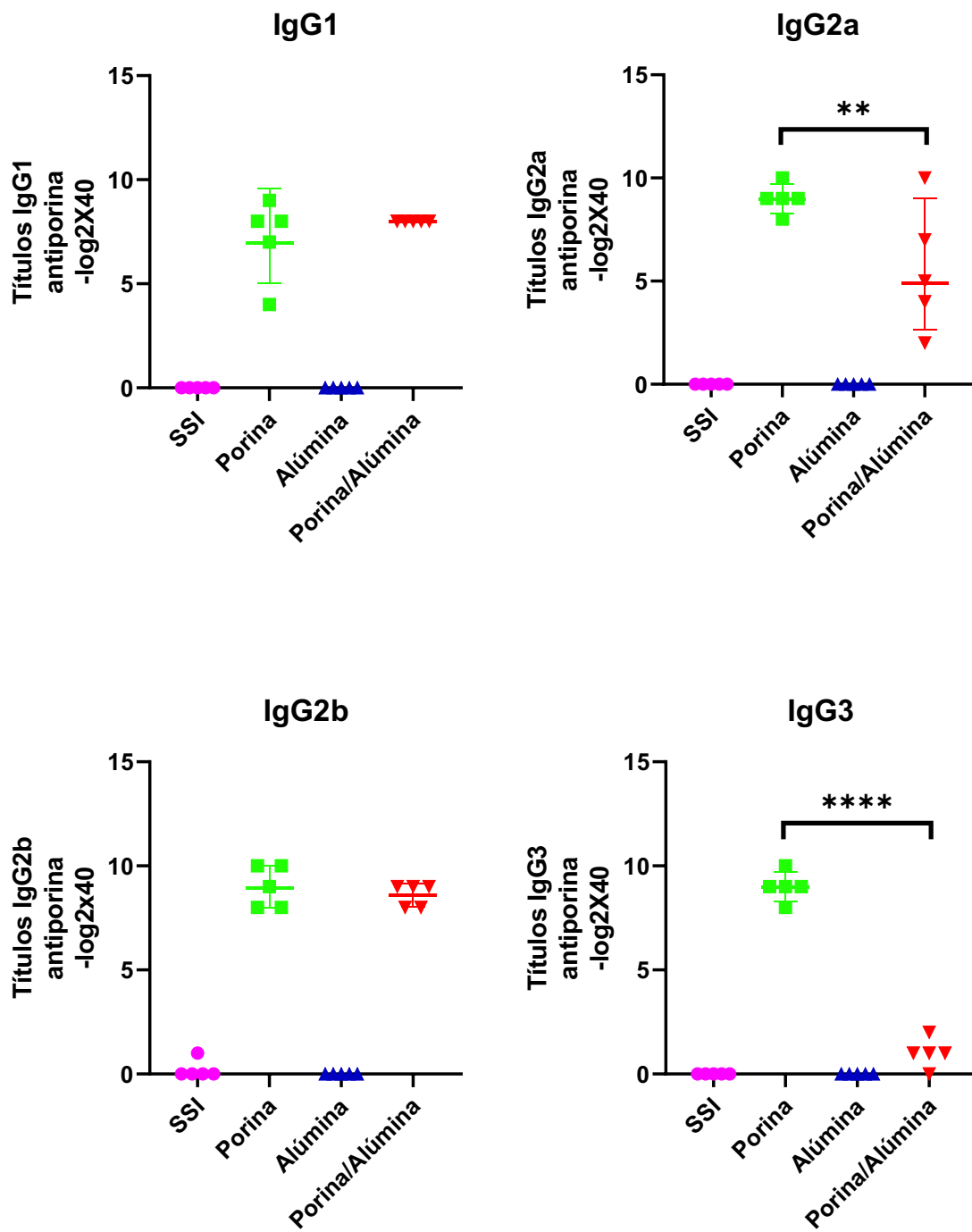


Figura 14. La formulación Porina/Alúmina induce un decremento en el título de IgG2a e IgG3 en el día 28 posterior a la inmunización. Las gráficas representan los títulos de las subclases de anticuerpos IgG en sangre periférica de ratones BALB/c obtenidos mediante ELISA. SSI= Solución salina isotónica, Porina = Porinas en ausencia de adyuvante; Alúmina = Hidróxido de aluminio en ausencia de antígeno, Porina + Alúmina = Porinas con hidróxido de aluminio, n= 5, prueba estadística= ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnet post hoc.

Como se observa en la **Figura 14**, los controles negativos (rosa y azul) no indujeron respuesta de anticuerpos posterior a la inmunización. Los grupos que recibieron Porinas (verde) y Porinas/Alúmina (rojo) mostraron un aumento del título de anticuerpos. Es relevante analizar las diferencias observables en los anticuerpos del tipo IgG2a ($p=0.0034$) donde el grupo Porinas/Alúmina, comparado con el grupo Porinas, muestra una media menor en el título de estas inmunoglobulinas. Mismo caso en anticuerpos IgG3, donde la administración del antígeno con alúmina disminuyó los títulos con respecto al grupo Porina ($p<0.0001$). El resto de las subclases de IgG analizadas no presentaron diferencias significativas entre ellas.

Para la obtención de los resultados mostrados en la **Figura 15**, se repitió el esquema de inmunización en ratones BALB/c, alargando su tiempo de vida a 56 días posteriores a la administración del antígeno. El suero recolectado al día 42 post-inmunización se utilizó para determinar las subclases de anticuerpos por medio de ELISA. La importancia de determinar el perfil de anticuerpos al en el día 42 recae en analizar las subclases de IgG al momento de exponer al ratón frente al patógeno.

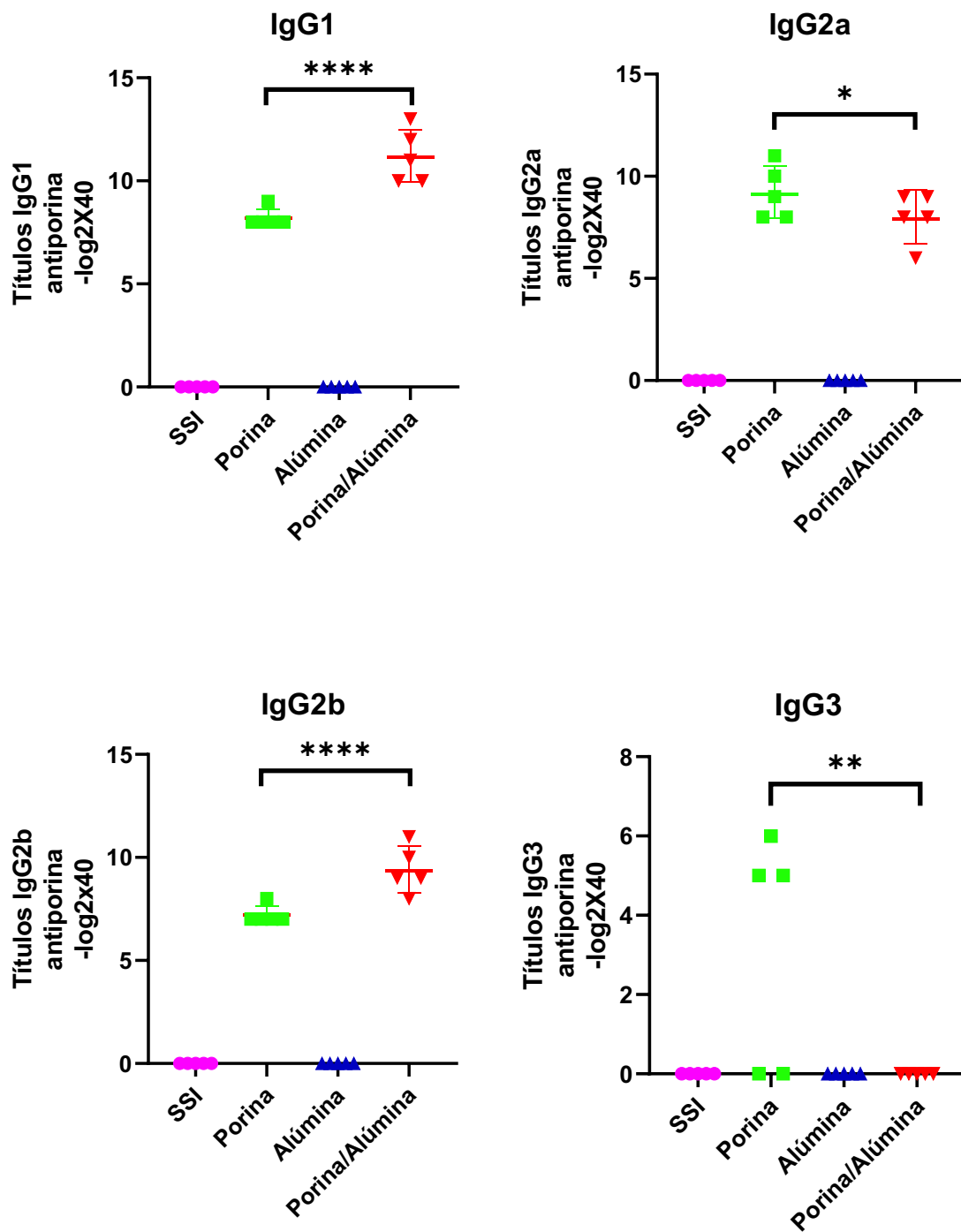


Figura 15. El uso de alúmina como adyuvante en la inmunización con porinas de cepa AT induce un incremento en el título de IgG1 e IgG2b y una disminución de IgG2a e IgG3 42 días post-inmunización. Se presentan los títulos de las subclases de anticuerpos IgG en sangre periférica de ratones BALB/c obtenidos mediante ELISA. SSI= Solución salina isotónica, Porina = Porinas en ausencia de adyuvante; Alúmina = Hidróxido de aluminio en ausencia de antígeno, Porina + Alúmina = Porinas con hidróxido de aluminio, n= 5, prueba estadística= ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnet post hoc.

En la **Figura 15** se observa el aumento del título de anticuerpos anti-porina en suero de ratón inducidos por la inmunización en el grupo Porinas (verde) y Porinas/Alúmina (rojo), mientras que los controles negativos SSI (rosa) y Alúmina (azul) no generaron una respuesta de anticuerpos. En la parte superior izquierda, puede observarse el incremento significativo de IgG1 en el grupo tratado con Porinas/Alúmina en comparación con el grupo tratado con Porinas ($p < 0.0001$). Los resultados fueron similares en la determinación de IgG2b (inferior izquierda), el grupo que recibió Porinas/Alúmina mostró un título superior al que se trató con Porinas con diferencia significativa entre ellas ($p < 0.0001$). Los títulos obtenidos en IgG2a (superior derecha) evidencian una ligera disminución del título anti-porina en el grupo tratado con Porina/Alúmina frente al grupo administrado con Porina, con una diferencia estadística ($p = 0.0499$). En IgG3 (inferior derecha) se observa una nula respuesta de anticuerpos inducida en el grupo tratado con Porina/Alúmina en comparación con el grupo que recibió Porina, ($p = 0.0034$).

9. Discusión

9.1 Evaluación de la inmunogenicidad y capacidad protectora de porinas provenientes de diferentes cepas de *S. Typhi*

La determinación de títulos IgG totales inducidos por la inmunización de porinas provenientes de tres cepas se observó en la **Figura 9** lo descrito previamente por Isibasi (36), quien demostró que la administración intraperitoneal de porinas de *S. Typhi* induce un incremento del título de anticuerpos, lo que evidenció que son altamente inmunogénicas. Al igual que lo reportado por Isibasi (37), en nuestro estudio, la dosis de 10 µg de proteína de membrana en un esquema de inmunización en los días 0 y 14 es suficiente para inducir un incremento de los títulos de anticuerpos.

Como se mencionó anteriormente, no se encontraron diferencias entre los títulos de anticuerpos IgG inducidos por la inmunización con las tres cepas (**Figura 9**), por lo que se cumplió la hipótesis debido a que la inmunización con las cepas UIMIQ A y UIMIQ B inducen títulos de anticuerpos que no presentan diferencias significativas comparados con los inducidos por las porinas provenientes de la cepa ATCC.

Al realizar la determinación de protección, se confirmó lo descrito previamente por Aguilar (50), quienes describieron que el grupo inmunizado con las porinas purificadas de *S. Typhi* redujeron significativamente el número de las unidades formadoras de colonia, no obstante, en este trabajo, se demostró que la inmunización con porinas provenientes de 3 cepas distintas redujo el número de UFC y, por lo tanto, incremento la protección.

Al finalizar la primera parte del proyecto, no se encontraron diferencias entre los efectos inmunitarios provocados por la administración de la proteína proveniente de las tres cepas por lo que se cumple con lo descrito en la primera hipótesis. Esta respuesta similar contra las porinas puede indicar una alta conservación del antígeno.

Las porinas utilizadas en los 3 grupos consisten en una mezcla de proteínas OmpC y OmpF purificadas y previamente analizadas por cromatografía en gel de acrilamida (Anexo 4). En 2006, Secundino *et al* demostraron que la proteína OmpC

es la principal responsable de la respuesta de anticuerpos bactericidas contra *S. Typhi* (38). La porina OmpC de *Salmonella* cuenta con secuencias de aminoácidos altamente conservadas entre serovares de *S. Typhi*, Paratyphi A, B, C y NTS (51). Además, Aguilar demostró que la OmpC de *S. Typhi* no tiene diferencias con respecto a otros serovares como Typhimurium y Paratyphi mientras que OmpF de *S. Typhi* cuenta con una similitud superior al 98% comparada con Typhimurium, Paratyphi y Enteritidis (50).

Es probable que la proteína de membrana sea idéntica entre las cepas o, en caso de presentar variaciones, se encuentren en regiones no reconocidas por las células B/T; sin embargo, es importante realizar estudios más especializados para comprender la estructura y epítomos de las porinas provenientes de las cepas analizadas; no obstante, en el presente estudio, la cepa de origen no afectó la inmunogenicidad y grado de protección inducida por la inmunización con porinas de *S. Typhi*.

9.2 Evaluación del impacto de la alúmina sobre la inmunogenicidad de las porinas

En la actualidad, no se tiene certeza de cuál es el principal mecanismo por el que la alúmina potencia la respuesta inmune contra los antígenos, más bien, se describen un conjunto de fenómenos que concluyen en una modulación del sistema inmunitario (52); en este trabajo se evidenció que la adición del hidróxido de aluminio tiene un efecto sobre el incremento de las IgG_T. Este adyuvante se ha utilizado para incrementar la inmunogenicidad de las vacunas de subunidad (53). Actualmente se conocen diversos mecanismos por los cuales se potencia la respuesta inmunitaria gracias al adyuvante (52,54,55). Uno de estos mecanismos se basa en la capacidad de la alúmina para activar al receptor *NOD Like Receptor 3* (NLRP3), el cual se asocia a la molécula adaptadora ASC y a la caspasa-1 para formar una macromolécula conocida como inflammasoma, el cual tiene como propósito activar a la caspasa-1 que finalmente desencadenará la activación y liberación de moléculas pro-inflamatorias como la IL-1 β e IL-18, las cuales permiten el reclutamiento de células del sistema inmune innato que finalmente generarán una respuesta adaptativa potenciada (54). Otro mecanismo se fundamenta en que la

alúmina tiende a formar pequeños cristales amorfos los cuales, al ser fagocitados, resultan en la inducción de muerte celular por necrosis y, por consiguiente, reacción pro-inflamatoria (55).

Por otra parte, se ha descrito que las IgM son las primeras inmunoglobulinas secretadas en la respuesta inmune primaria y su estructura pentamérica permite la activación del complemento y, por consiguiente, la lisis celular mediada por el complejo de ataque a la membrana (56). Como se ha observado anteriormente, los títulos de IgM anti-porina se mantienen hasta 56 días posteriores a la primera dosis e inclusive, se ha reportado que los IgM inducidos por este candidato vacunal perduran hasta 476 días post-inmunización (38). También se ha descrito que la administración de dos dosis de porinas permite una persistencia en IgM a largo plazo mientras que una sola dosis la disminuye después del día 8 post-inmunización (57).

La persistencia de niveles considerables de IgM días posteriores a la segunda dosis contrasta con la naturaleza de este tipo de anticuerpos, no obstante, se ha observado una respuesta de estas inmunoglobulinas hasta 230 días posterior a la infección con *Borrelia hermsii*, donde se comprobó que esta protección de larga vida es mediada por linfocitos B1b como consecuencia de un estímulo antigénico T-independiente (58). Ante este descubrimiento, Gil-Cruz *et al* analizaron la respuesta de IgM contra porinas de *Salmonella* NTS encontrando que este tipo de anticuerpos son producidos por linfocitos B1b (59).

Más recientemente se han reportado células B de memoria específicas del tipo IgM contra *Plasmodium sp* que ya han pasado por el proceso de hipermutación somática, por lo que las inmunoglobulinas secretadas del tipo M son de alta afinidad (60).

Pérez-Shibayama describió la inducción de células plasmáticas de larga vida del tipo IgM anti-porinas de *S. Typhi* en médula ósea; también encontró que la liberación sostenida de esta clase de anticuerpos se debe a una reacción de centro germinal mediada por mecanismos dependientes de células T CD4⁺ (57).

Es probable que la inmunización con porinas induzca respuestas por ambos mecanismos, pues las porinas activan mecanismos T-independientes para secretar IgM por medio de células B1b (59), así como inducir la formación de células B de memoria por mecanismos dependientes de T CD4⁺ (57), es por ello por lo que en este proyecto se encontró que los niveles de anticuerpos se mantienen hasta 56 días posteriores a la primera inmunización.

Resulta interesante observar que la adición de la alúmina provoca una disminución drástica de los IgM hasta 0, por lo que es posible que el adyuvante induzca una polarización de la respuesta hacia otro tipo de anticuerpos. Se ha observado que la inmunización con el adyuvante sin antígeno provoca la activación de células B secretoras de IgM (61). Otros estudios comprueban que la alúmina como adyuvante en vacunas proteicas, es capaz de incrementar el título de anticuerpos IgM (10,12,13) en cambio, se observa el efecto contrario al añadirlo a nuestro candidato de subunidad.

En el hígado y en el bazo, el grupo administrado con Porinas mostró menor carga bacteriana comparado con el grupo tratado con Porina/Alúmina (**Figura 13**). Al contrario de lo esperado, la administración de alúmina como adyuvante fue contraproducente, disminuyó la protección inducida por las porinas sin adyuvante. Previamente, se ha demostrado la actividad bactericida de los anticuerpos IgG anti-porinas (38) por lo que es probable que la alúmina cambie las subclases de anticuerpos alterando la actividad bactericida de los mismos.

Es importante destacar que, si bien, las subclases de anticuerpos de humano y ratón se dividen en 4, el modelo no es exactamente el mismo y las subclases tienen distintos efectos en los diferentes organismos, por lo que el análisis se limitará a lo observado en ratón BALB/c.

En primer lugar, se conoce que las IgM tienen un fuerte efecto bactericida debido a su capacidad de activar complemento (56); por otra parte, se sabe que en los ratones BALB/c, la subclase IgG2a es la principal activadora de complemento, así como agonista de los receptores Fc γ (62). Se ha observado que los anticuerpos generados con la inmunización con porinas de *S. Typhi* tienen capacidad bactericida

mediada por complemento (38), en consecuencia, es muy probable que la disminución de IgM e IgG2a tiene repercusión directa en el decremento del nivel de protección.

Los anticuerpos del tipo IgG3 en ratón son capaces de activar complemento, pero no son activadores de Fc γ R, por lo que se ha descrito que funcionan como auxiliares en el reclutamiento de células del tipo inflamatorio, pues cuentan con la capacidad de autoagregarse (62). La disminución de este tipo de inmunoglobulina puede deberse al cambio de clase, puesto que estos anticuerpos son de respuesta temprana, usualmente secretados independientemente de células T cooperadoras (62). Es probable que en el día 42, donde se analizaron las subclases de anticuerpos, las células B hayan pasado por procesos de cambio de clase e hipermutación somática para generar anticuerpos de subclases diferentes con alta afinidad al antígeno.

En el día 42 (día de reto), la subclase que predomina es IgG1, que no fija complemento ni genera respuesta por medio de Fc γ R del tipo activador (62) de modo que, a pesar de mostrar un mayor título de IgG τ al momento de exponer el organismo al patógeno, predomina una subclase de anticuerpo que no tiene funciones efectoras necesarias para la respuesta inmune frente a *Salmonella sp* (62).

Retomando la función agonista de receptores de Fc γ , las subclases IgG2a e IgG2b son agonistas de receptores clasificados como activadores (62), que al estimularse desencadenan cascadas de señalización que finalmente conducen a la producción de citocinas, activación celular y quimiotaxis (63). IgG1 es un fuerte agonista de receptores inhibidores de Fc γ (62) nombrados de esta manera debido a que contrarrestan la actividad inducida por los receptores activadores (63).

El grupo inmunizado únicamente con porinas presenta principalmente anticuerpos del tipo IgG2a e IgG3 con fuertes efectos activadores, así como fijadores de complemento, mientras que, al añadir alúmina, predominan anticuerpos IgG1 con efectos inhibidores sin activar complemento (62), por ende, es factible que la

disminución de la capacidad protectora con el adyuvante se deba a una alteración en el perfil de anticuerpos anti-porina, pues las subclases que predominan tras la adición del adyuvante carecen de efectos bactericidas y activadores.

A partir de estos hallazgos encontramos que es importante analizar la interacción de células T/B, pues muchos de los fenómenos encontrados en los anticuerpos pueden explicarse por medio de la alteración del perfil de linfocitos T y, por consiguiente, las citocinas secretadas afectan directamente el tipo de anticuerpos y su función efectora (64).

En un estudio sobre el papel adyuvante de las porinas, se observó que la administración de las proteínas de membrana con ovoalbúmina orienta a las células T a un perfil T_H1 y T_H17 donde es posible detectar altas cantidades de IFN- γ , IL-2 e IL-17 (65) por lo que, sin adyuvante, el perfil esperado en las células T corresponde a un T_H1 ; sin embargo, el patrón de subclases de anticuerpos mostrados coincide con un cambio en las células T a un perfil T_H2 , caracterizado por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 (21,52).

Anteriormente, se ha demostrado que, con la administración de hidróxido de aluminio, se incrementa el reclutamiento de neutrófilos secretores de IL-4, citocina responsable del cambio de perfil a T_H2 (61); a la vez, la respuesta a este perfil de T se caracteriza por el incremento de anticuerpos del tipo IgG1 (62), los cuales corresponden con nuestro estudio.

Por otra parte, el incremento de anticuerpos IgG2a se estimula con la secreción de IFN- γ (57), citocina característica de un perfil T_H1 (4). También, el IFN- γ es necesario para generar una reacción en centro germinal y posterior diferenciación a linfocitos B IgM de memoria específica contra las porinas de *S. Typhi* (57). Es probable que la disminución de IgM e IgG2a se deba a una menor secreción de IFN- γ provocado por la polarización a T_H2 inducida por la alúmina y, en consecuencia, la responsable del decremento en la protección generada con la inmunización con las porinas, pues IgM e Ig2a son los principales anticuerpos responsables de la respuesta inmune temprana frente al patógeno.

Con estos resultados, se abren nuevos nichos de oportunidad, donde se destaca el análisis de homología entre las porinas de *S. Typhi* de las diferentes cepas estudiadas. Por otra parte, es posible realizar el estudio de la respuesta de linfocitos T inducida por la administración de porinas en conjunto con alúmina y su repercusión del perfil generado en los linfocitos B y sus anticuerpos resultantes.

10. Conclusiones

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- a) La cepa de procedencia de las porinas de *S. Typhi* utilizadas no tiene repercusión directa en la inducción e incremento del título de anticuerpos IgG y la protección en contra de la infección.
- b) El empleo de alúmina en la inmunización con porinas de *S. Typhi* incrementa el título de anticuerpos IgG totales, pero disminuye las IgM totales, induce un cambio a subclases de IgG no fijadoras de complemento y reduce el grado de protección inherente de las porinas.

Con base en lo anterior, podemos afirmar que la inmunogenicidad de las porinas provenientes de las cepas UIMIQ A y UIMIQ B es comparable con las obtenidas de la cepa ATCC por lo que es posible utilizarlas para futuros estudios. Por otra parte, la adición de alúmina resultó perjudicial en la protección frente a infección de *S. Typhi*, por lo que no se recomienda su uso como adyuvante para futuros estudios.

Referencias

1. Canouï E, Launay O. [History and principles of vaccination]. *Rev Mal Respir.* enero de 2019;36(1):74–81.
2. Kayser V, Ramzan I. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Hum Vaccines Immunother.* 17(12):5255–68.
3. Conmemoración de la erradicación de la viruela: un legado de esperanza para la COVID-19 y otras enfermedades [Internet]. [citado el 14 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/08-05-2020-commemorating-smallpox-eradication-a-legacy-of-hope-for-covid-19-and-other-diseases>
4. Pavón Romero L, Jiménez Martínez M del C, Garcés Alvarez ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional.* Wolters Kluwer; 2016.
5. Gupta S, Sharma N, Naorem LD, Jain S, Raghava GPS. Collection, compilation and analysis of bacterial vaccines. *Comput Biol Med.* octubre de 2022;149:106030.
6. Kocourkova A, Honegr J, Kuca K, Danova J. Vaccine Ingredients: Components that Influence Vaccine Efficacy. *Mini-Rev Med Chem.* el 1 de febrero de 2017;17(5):451–66.
7. Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Kuby: inmunología (7a. ed.)* [Internet]. México, D.F., MEXICO: McGraw-Hill Interamericana; 2014 [citado el 17 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbmhe/detail.action?docID=3219420>
8. Carlberg C, Velleuer E. Cells and Tissues of the Immune System. En: Carlberg C, Velleuer E, editores. *Molecular Immunology: How Science Works* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citado el 29 de agosto de 2023]. p. 1–18. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-031-04025-2_1
9. Carlberg C, Velleuer E. Innate Immunity and Inflammation. En: Carlberg C, Velleuer E, editores. *Molecular Immunology: How Science Works* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citado el 29 de agosto de 2023]. p. 19–40. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-031-04025-2_2
10. Nutt S I., Hodgkin P d., Tarlinton D m., Corcoran L m. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* el 27 de marzo de 2015;15(3):160–71.
11. Lenin Pavon-Romero. *Inmunología molecular, celular y traslacional.*
12. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2015;28(4):901–37.
13. Masuet-Aumatell C, Atouguia J. Typhoid fever infection – Antibiotic resistance and vaccination strategies: A narrative review. *Travel Med Infect Dis.* marzo de 2021;40:101946.
14. Crump JA. Progress in Typhoid Fever Epidemiology. *Clin Infect Dis.* el 15 de febrero de 2019;68(Supplement_1):S4–9.
15. Secretaría de Salud. Anuario de morbilidad 1984-2021 [Internet]. Disponible en: <https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/,08-12-2022>

16. Connor BA, Schwartz E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infect Dis*. octubre de 2005;5(10):623–8.
17. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF. *Microbiología médica* [de] Jawetz, Melnick y Adelberg. 25a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011. 216 p.
18. Patrick Murray, Ken Rosenthal, Michael Pfaller. *Microbiología Médica*. 7°. España: Elsevier; 2014. 260, 264–266 p.
19. Johnson R, Mylona E, Frankel G. Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2018;20(9):e12939.
20. Dougan G, Baker S. *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever. *Annu Rev Microbiol*. el 8 de septiembre de 2014;68(1):317–36.
21. Spanò S. Mechanisms of Salmonella Typhi Host Restriction. En: Leake MC, editor. *Biophysics of Infection* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado el 31 de marzo de 2023]. p. 283–94. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 915). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-32189-9_17
22. Christopher Parry, Tran Tihn, Gordon Dougan, Nicholas White, Jeremy Farrar. Typhoid fever. *N Engl J Med*. 2002;347(22):1770–82.
23. Raffatellu M, Wilson RP, Winter SE, Baumler AJ. Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Dev Ctries*. el 1 de agosto de 2008;2(04):260–6.
24. Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE, Dougan G. Igh-6^{-/-} (B-Cell-Deficient) Mice Fail To Mount Solid Acquired Resistance to Oral Challenge with Virulent *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Show Impaired Th1 T-Cell Responses to Salmonella Antigens. *Infect Immun*. enero de 2000;68(1):46–53.
25. Ugrinovic S, Ménager N, Goh N, Mastroeni P. Characterization and Development of T-Cell Immune Responses in B-Cell-Deficient (Igh-6^{-/-}) Mice with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection. *Infect Immun*. diciembre de 2003;71(12):6808–19.
26. Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SHE. Cutting Edge: Role of B Lymphocytes in Protective Immunity Against *Salmonella typhimurium* Infection. *J Immunol*. el 15 de febrero de 2000;164(4):1648–52.
27. Nandakumar, Muthukkaruppan. Influence of Immunopotentiators on the Antiporin Immunoglobulin G Subclass: Distribution and Protective Immunity Against Murine Salmonellosis. *Scand J Immunol*. 1999;50(2):188–94.
28. Das S, Mohakud NK, Suar M, Sahu BR. Vaccine development for enteric bacterial pathogens: Where do we stand? *Pathog Dis*. el 1 de julio de 2018;76(5):fty057.
29. Milligan R, Paul M, Richardson M, Neuberger A. Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database Syst Rev*. el 31 de mayo de 2018;2018(5):CD001261.
30. Chinnasami B, Sadasivam K, Vivekanandhan A, Arunachalam P, Pasupathy S. A Study on Longevity of Immune Response after Vaccination with *Salmonella Typhi* Vi Conjugate Vaccine (PedatyphTM) in Children. *J Clin Diagn Res JCDR*. mayo de 2015;9(5):SC01–3.

31. Steiger B, Steiger J, Locher KP. Membrane lipids and transporter function. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* el 1 de mayo de 2021;1867(5):166079.
32. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* diciembre de 2003;67(4):593–656.
33. Calderón I, Lobos SR, Rojas HA, Palomino C, Rodríguez LH, Mora GC. Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect Immun.* abril de 1986;52(1):209–12.
34. Ortiz V, Isibasi A, García-Ortigoza E, Kumate J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol.* julio de 1989;27(7):1640–5.
35. Verdugo-Rodríguez A, López-Vidal Y, Puente JL, Ruíz-Placios GM, Calva E. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* abril de 1993;12(4):248–54.
36. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, González C, Moreno J, et al. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d, Vi. *Infect Immun.* noviembre de 1988;56(11):2953–9.
37. Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Pelayo R, González CR, García JoséA, et al. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine.* el 1 de enero de 1992;10(12):811–3.
38. Secundino I, Lopez-Macias C, Cervantes-Barragan L, Gil-Cruz C, Rios-Sarabia N, Pastelin-Palacios R, et al. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology.* enero de 2006;117(1):59–70.
39. Muthukkumar S, Muthukkaruppan VR. Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. *Infect Immun.* julio de 1993;61(7):3017–25.
40. Cavillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon.* el 1 de julio de 2018;149:45–53.
41. McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* el 1 de octubre de 2009;183(7):4403–14.
42. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccines Immunother.* el 18 de febrero de 2015;11(2):477–88.
43. Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* el 1 de febrero de 2014;32(2):106–14.
44. Harris JR, Soliakov A, Lewis RJ, Depoix F, Watkinson A, Lakey JH. Alhydrogel® adjuvant, ultrasonic dispersion and protein binding: A TEM and analytical study. *Micron.* el 1 de febrero de 2012;43(2):192–200.

45. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. el 1 de octubre de 2015;72:4–15.
46. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem*. el 1 de diciembre de 2005;51(12):2415–8.
47. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium - 25566 | ATCC [Internet]. [citado el 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/25566>
48. Luis Puente J, Flores V, Fernández M, Fuchs Y, Calva E. Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene*. el 1 de enero de 1987;61(1):75–83.
49. Hernández-Lucas I, Gallego-Hernández AL, Encarnación S, Fernández-Mora M, Martínez-Batallar AG, Salgado H, et al. The LysR-Type Transcriptional Regulator LeuO Controls Expression of Several Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *J Bacteriol*. marzo de 2008;190(5):1658–70.
50. Daniel Isui Aguilar Salvador. Desarrollo de una vacuna multivalente contra fiebre tifoidea, paratifoidea y salmonelosis no tifoídicas hecha con porinas de *Salmonella enterica*. [México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
51. Puente J, Juárez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. The *Salmonella* ompC gene: Structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene*. el 14 de abril de 1995;156(1):1–9.
52. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. abril de 2009;9(4):287–93.
53. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant | Microbiology Society [Internet]. [citado el 4 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.038943-0#tab2>
54. Oleszycka E, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr Opin Immunol*. el 1 de junio de 2014;28:1–5.
55. Wen Y, Shi Y. Alum: an old dog with new tricks. *Emerg Microbes Infect*. marzo de 2016;5(3):e25.
56. Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies*. el 13 de octubre de 2020;9(4):53.
57. Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, Pastelin-Palacios R, Cervantes-Barragan L, Hisaki E, Chai Q, et al. IFN- γ -Producing CD4⁺ T Cells Promote Generation of Protective Germinal Center-Derived IgM⁺ B Cell Memory against *Salmonella Typhi*. *J Immunol*. el 1 de junio de 2014;192(11):5192–200.
58. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b Lymphocytes Confer T Cell-Independent Long-Lasting Immunity. *Immunity*. el 1 de septiembre de 2004;21(3):379–90.
59. Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, Kingsley RA, Ross EA, Henderson IR, et al. The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc Natl Acad Sci*. el 16 de junio de 2009;106(24):9803–8.

60. Krishnamurty AT, Thouvenel CD, Portugal S, Keitany GJ, Kim KS, Holder A, et al. Somatically Hypermutated Plasmodium-Specific IgM+ Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity*. el 16 de agosto de 2016;45(2):402–14.
61. Wang HB, Weller PF. Pivotal Advance: Eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol*. abril de 2008;83(4):817–21.
62. Collins AM. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol Cell Biol*. noviembre de 2016;94(10):949–54.
63. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*. noviembre de 2015;268(1):25–51.
64. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol*. abril de 2009;10(4):385–93.
65. Pérez-Toledo M, Valero-Pacheco N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Moreno-Eutimio MA, et al. Salmonella Typhi Porins OmpC and OmpF Are Potent Adjuvants for T-Dependent and T-Independent Antigens. *Front Immunol*. el 9 de marzo de 2017;8:230.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones

1. Amortiguador de fosfatos (PBS) 10X pH 6.8

En balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado.

Volumen total:	500 mL H ₂ O	1L H ₂ O
NaCl	40.05 g	80.1 g
KCl	1.0 g	2.0 g
Na₂HPO₄	7.1 g	14.2 g
KH₂PO₄	0.7 g	1.4 g

Disolver los reactivos en el 80% del volumen final. Con potenciómetro, ajustar el pH a 6.8 y posteriormente aforar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 minutos. Finalmente almacenar a temperatura ambiente.

2. Amortiguador de fosfatos (PBS) 1X pH 7.4

En balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado.

Volumen total	500 mL H ₂ O	1L H ₂ O
NaCl	4.1 g	8.2 g
KCl	0.1 g	0.2 g
Na₂HPO₄	0.6 g	1.2 g
KH₂PO₄	0.1 g	0.2 g

Disolver los reactivos en el 80% del volumen final. Con potenciómetro, ajustar el pH a 7.4 y posteriormente aforar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 minutos. Finalmente almacenar a 4°C.

3. Amortiguador de carbonatos pH 9.6

En balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado.

Volumen total:	250 mL H ₂ O	500 mL H ₂ O
Bicarbonato de sodio	1.75 g	3.5 g
Carbonato de sodio	0.05 g	0.1 g

Disolver los reactivos en el 80% del volumen final. Con potenciómetro, ajustar el pH a 9.6 y posteriormente aforar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 minutos. Finalmente almacenar a 4°C.

4. Amortiguador de citratos pH 5.6

En balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado.

Volumen total:	250 mL H ₂ O	500 mL H ₂ O
Ácido cítrico	1.05 g	2.1 g
Citrato de sodio	7.25 g	14.5 g

Disolver los reactivos en el 80% del volumen final. Con potenciómetro, ajustar el pH a 5.6 y posteriormente aforar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb de presión por 15 minutos. Finalmente almacenar a 4°C.

5. PBS 1X + leche 5%

En balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS (mL)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Leche (g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Disolver los reactivos y homogeneizar

6. PBS 1X + leche 2% + Tween 20 al 0.05%

En balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS (mL)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Leche (g)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
Tween 20 (μ L)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50

Disolver los reactivos y añadir el Tween indicado con una pipeta automática de 200 μ L. Homogeneizar.

7. PBS + Tween 20 al 0.1%

Agregar 1 mL de Tween 20 por cada litro de PBS 1X. Homogeneizar y almacenar.

8. Solución reveladora de OPD

Con precaución, en balanza semi-analítica, pesar las siguientes cantidades de reactivo y transferir a un frasco de vidrio previamente despirogenizado. Evitar tocar el OPD directamente con las manos. En caso de hacerlo, lavar inmediatamente con abundante agua.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Buffer de citratos (mL)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
OPD (mg)	6	12	18	42	30	36	42	48	54	60
H ₂ O ₂ (μL)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Disolver los reactivos y añadir el peróxido indicado con una pipeta automática de 200 μL. Homogeneizar.

Anexo 2. Resumen aceptado del trabajo libre, formato póster, presentado en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023 – Sociedad Mexicana de Inmunología

Immunogenic study of porins from three different *Salmonella enterica* serovar Typhi strains

Lozano-Cisneros D^{1*}, Morales-González C¹, Gordillo-López S¹, Torres-Flores A¹, García-Valeriano M¹, Calva-Mercado E², Rivera-Hernández T¹, López-Macías C¹.

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, UMAE, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México.

²Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México. dlc99236z@gmail.com

The diseases produced by *Salmonella enterica* are still a major health problem around the world. Our laboratory has developed a multivalent vaccine against these diseases based on outer membrane proteins (OMP) named porins, which have been shown to be highly immunogenic antigens. To produced vaccine at industrial level for the subsequent commercialization, a *Salmonella* strain that highly express porins is needed. The objective of these study is to determine the antibody response and protection capacity of porins purified from 3 different *S. Typhi* strains. For this, total IgG antibody titer was determined by ELISA. The protection level was determined through an in vivo infection model with *S. Typhi* and subsequent quantification of CFU/g of organ in liver and spleen. The antibody titer of the 3 strains was obtained without a significant difference between the study strains. At once, it was determined that the strain number 3 induced a higher level of protection with respect to the rest of the strains. Therefore, it is concluded that strain number 3 is the best candidate to be used a for porins vaccine production.

Anexo 3. Constancia de participación como ponente en modalidad cartel en el XXV Congreso Nacional de Inmunología Querétaro 2023 – Sociedad Mexicana de Inmunología



SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA
En la lucha contra las enfermedades infecciosas, autoinmunes, alérgicas y el cáncer



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

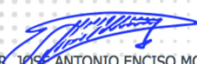
Diego Lozano Cisneros

Por su participación como **ponente modalidad CARTEL** con el trabajo titulado:

Immunogenic study of porins from three different Salmonella enterica serovar Typhi strains

XXV Congreso Nacional de Inmunología
Querétaro 2023

Querétaro, Qro., México, del 4 al 8 de junio del 2023


DR. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO
PRESIDENTE
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA

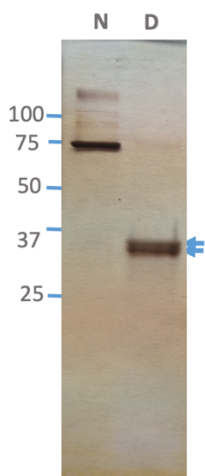

DR. JULIO ENRIQUE CASTAÑEDA DELGADO
SECRETARIO
SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA

Anexo 4. Certificado de análisis de porinas de *S. Typhi*

Porinas de *S. Typhi*

Prueba o Característica	Resultado	Observaciones
Organolépticas	Incoloro/inodoro	Cumple parámetros
Aspecto	Solución transparente libre de partículas extrañas	Cumple parámetros
Volumen	Mayor a 10 ml	Cumple parámetros
Identidad de porinas	Porinas OmpC (~36 kDa) y OmpF (~34 kDa) identificadas por electroforesis en condiciones reductoras y desnaturalizantes.	Cumple parámetros
Prueba de esterilidad	En proceso	
Endotoxinas bacterianas (UE/10 µg de proteína)	<0.01	Cumple parámetros

Concentración (µg/ml)	Proteína total (mg)	Volumen (ml)	Observaciones
816.67	38.79	47.5	LOTE VERDE



SDS-PAGE (12%)
Tinción de Plata

N: condiciones no reductoras
D: condiciones desnaturalizantes

Cromatograma FPLC

