



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

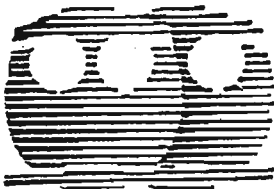
FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL
IgA SOBRE LA INVASIVIDAD E INMUNOGENICIDAD
DE *Salmonella enterica serovar Typhi* EN EL
MODELO MURINO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA
MARCO ANTONIO HERNANDEZ LUNA



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

AÑO 2005

m348755



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

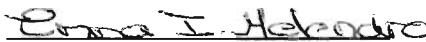
Jurado asignado:

Presidente: MA. DEL CARMEN CORTES DECUIR
Vocal: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ
Secretario: EMMA ISABEL MELENDRO LOZANO
1er. Suplente: RUTH EDITH MARTÍN FUENTES
2° Suplente: MA. GUADALUPE REYES GARCIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM

Asesor del tema.



Dra. Emma Isabel Melendro Lozano

Sustentante.



Marco Antonio Hernández Luna

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

DEDICATORIA

A

MIS

PADRES

y

HERMANDOS

Agradecimientos

A mis Padres Bernardino y Consuelo, por apoyarme en todo momento y esperar tanto tiempo por este trabajo.

A mis hermanos Ari y Hugo, por todas las veces que me ayudaron sin pedir nada a cambio.

A la Dra. Emma Melendro, por haberme dado la oportunidad de cumplir una de mis metas.

A los miembros del jurado, por su participación y su paciencia

A mis amigos de lunes a jueves y hermanos de viernes, Antonio, Genaro, Manuel, Miguel y William, por todos los años que pasamos en la escuela y por los que estamos pasando fuera de ella.

A mis amigos, Armando, Ernesto, Montserrat, Adriana, Jerson, Javier, Víctor, Gerardo, Tomas, por compartir todos los días de la carrera conmigo.

A los integrantes de M. E. (Aunque sigue en discusión) Antonio, Armando y el otro Miguel, por ayudarme a tratar de realizar otra de mis metas.

A todos los que trabajan en el laboratorio de inmanología, Angeles, Martha, Angélica, Malena, Efraín y en especial a el señor Carlos y el señor Catalino por toda la ayuda que me ofrecieron al momento de trabajar con los ratones.

A Marco Elías Gudiño Zayas del departamento de computo por ayudarme con el análisis estadístico y la presentación.

Este párrafo es en especial para todas las personas que por algún motivo olvide anotar, les pido una disculpa, pero aunque sus nombres no aparezcan, también me acuerdo de ustedes.

Y después

*Los laberintos
Que crea el tiempo
Se desvanecen.*

*(sólo queda
el desierto)*

*el corazón,
fuente del deseo,
Se desvanece.*

*La ilusión de la aurora
Y los besos
Se desvanecen.*

*Sólo queda
El desierto.
Un ondulado
desierto.*

Federico García Lorca

INDICE

Introducción	1
• Generalidades	1
• Interacción entre el tracto gastrointestinal del huésped y del patógeno.....	4
• Respuesta inmune en las mucosas	10
• Modelos experimentales	15
• Vacunas.....	17
Planteamiento del problema	20
Hipótesis	22
Objetivo	23
Material y Métodos	24
Resultados	29
Discusión	45
Conclusiones	53
Referencias	54

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Salmonella recibe su nombre en homenaje al anatomopatólogo Daniel Salmón que fue el primero en aislar *Salmonella scholerasuis* del intestino de cerdo. Esta se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, incluyendo el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos, silvestres, reptiles, aves e insectos. Algunos serotipos como *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella sendai* se encuentran muy bien adaptadas al ser humano y no poseen otro huésped natural conocido ⁴⁹.

Reseña histórica

Antes del comienzo del siglo XIX había una confusión entre el tifus y la fiebre tifoidea. En 1850 William Jenner estableció las diferencias entre ambas distinguiendo a la fiebre tifoidea por el hallazgo histopatológico de un aumento de tamaño de las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos. En 1873 Budd demostró que la fiebre tifoidea podía ser transmitida por los alimentos, el agua y el fomite. El bacilo responsable de la Fiebre Tifoidea fue aislado en Alemania por Gaffkey, del bazo de pacientes infectados en 1884. En 1896 Pfeifer y Kalle elaboraron la primera vacuna contra la fiebre tifoidea con microorganismos muertos. La clasificación antigénica de *Salmonella* es el resultado de muchos años de estudio de las interacciones de antígenos de superficie bacterianos con anticuerpos, realizados por Kauffman y White entre 1920 y 1940 ⁴⁹.

Clasificación y taxonomía

La clasificación del género *Salmonella* ha sido recientemente modificada basándose en estudios de electroforesis de enzimas multilocus y análisis de secuencia de nucleótidos, distinguiéndose solo dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* se divide en subespecies designadas por los números

romanos I, II, IIIa, IIIb, IV y V. *Salmonella enterica* subespecie I es principalmente aislada de animales de sangre caliente y corresponde al 99% de los aislados clínicos. Cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovares, de acuerdo al tipo de antígeno flagelar H, o somático O. El antígeno H está conformado por la proteína más abundante del flagelo, que es la estructura que permite el movimiento. El antígeno O está conformado por una cadena repetida de polisacáridos, que forma parte del lipopolisacárido (LPS), que se ancla y sobresale de la membrana externa y que actúa como una barrera de protección a agentes externos ⁹. Se han descrito más de 2,375 serovares de *Salmonella*.

Microbiología

Salmonella son bacilos Gram negativos, no formadores de esporas y anaerobios facultativos que miden 2-3 x 0.4-0.6 µm, al igual que otras enterobacterias, producen ácidos por fermentación de la glucosa, reducen nitritos y no producen citocromo oxidasa. Todos estos microorganismos a excepción de *Salmonella gallinarum-pullorum* son móviles y poseen flagelos peritricos ⁴⁹.

Salmonella enterica serovar Typhi (*Salmonella typhi*) es una bacteria anaerobia facultativa, pertenece al serotipo 9, 12 con base a el azúcar repetida en su antígeno O. El antígeno flagelar “ d ” es el más preponderante, además tienen en su exterior una cápsula de polisacáridos denominada Vi (por antígeno de virulencia). Estos bacilos no producen esporas y la mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos ⁴⁹.

Epidemiología

La fiebre tifoidea todavía representa un problema sanitario global de magnitud considerable, dado que se estima que afecta de 12 a 33 millones de personas por año en todo el mundo, esta enfermedad es endémica en muchas regiones geográficas, en vías de desarrollo, como el subcontinente Indio, América central, Sudamérica y África ¹⁸. En México la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud reportó 20,239 casos de fiebre tifoidea durante el 2003, lo cual muestra una incidencia aún importante en nuestro país ¹⁵.

ANTECEDENTES

INTERACCIÓN ENTRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL HUÉSPED Y EL PATÓGENO

Salmonella ingerida con el agua o comida contaminada debe atravesar la barrera ácida del estómago, que representa la primera línea de defensa contra la infección entérica⁸. Si bien *Salmonella* no sobrevive en presencia de un pH gástrico normal (<1.5), estos microorganismos se adaptan sin problemas a un pH de 4 o mayor y desarrollan una respuesta de tolerancia ácida adaptatoria que permite la supervivencia a un pH menor^{26, 29}.

Posteriormente atraviesa la capa de moco intestinal que recubre el epitelio del intestino delgado y de esta manera *Salmonella* interactúa con los enterocitos y células M de las placas de Peyer preferentemente las del íleo³⁹. *Salmonella* invade las células epiteliales mediante un proceso conocido como endocitosis mediada por la bacteria. La bacteria es transportada en el interior de vacuolas limitadas por membrana, desde la superficie apical a la basolateral de las células epiteliales (trancitosis)²³.

El mecanismo por el cual *Salmonella typhi* entra en el enterocito es complejo e implica adhesinas, así como componentes bacterianos intracelulares, que modifican el citoesqueleto de las células del hospedero y su organización vacuolar. Este proceso es iniciado cuando adhesinas y otros componentes de señalamiento intracelular son transportados hacia las células del huésped por la bacteria, vía el aparato de secreción tipo III, el cual es estimulado por el contacto entre la bacteria y la célula epitelial²⁴.

Se ha reportado que el regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (CFRT) funciona como receptor para *Salmonella typhi* a nivel de la mucosa intestinal. Las adhesinas de la bacteria que interactúan con este receptor están localizadas en el Pili tipo IV⁸¹ y en el "core externo" del LPS de la bacteria⁶⁶.

Se ha encontrado una relación directa entre la expresión o disponibilidad de CFRT sobre la superficie epitelial y la eficacia con la cual *Salmonella typhi* es translocada a la submucosa intestinal de ratón, sugiriendo que cambios en la expresión o disponibilidad de CFRT durante la infección, podrían influenciar el curso de la infección. Se ha demostrado la presencia de CFRT en el citoplasma de las células epiteliales intestinales y *Salmonella typhi* produce factores capaces de redistribuir la expresión de estas proteínas preformadas desde el citoplasma a la membrana plasmática de células epiteliales ⁴⁷.

En el humano se ha encontrado que células de carcinoma de colon T84, las cuales expresan CFRT silvestre internalizan más *Salmonella typhi* en comparación a células isogénicas que expresan la mutación más común del CFRT, una delección de fenilalanina en el residuo 508 (Δ F508) ⁶⁶. Por lo tanto un inhibidor competitivo específico para CFRT o las adhesinas de la bacteria (LPS, Pili tipo IV) podría reducir la entrada de la bacteria a las células epiteliales ^{66, 81}.

Numerosos factores bacterianos revisten importancia en la patogenia de *Salmonella*. Muchos de los genes determinantes de la virulencia de *Salmonella typhimurium* se localizan en las "islas de patogenicidad" de *Salmonella* designados con los nombres SPI-1, SPI-2 SPI-3 SPI-4 y SPI-5.

La región SPI -1 codifica genes bacterianos importantes para la inducción de macropinocitosis por las células epiteliales, por lo tanto, podrían ser importantes para los procesos patogénicos en la superficie de la mucosa, incluida la gastroenteritis. La región SPI -2 esta involucrada en la supervivencia en el interior de los macrófagos y en la patogenia sistémica. Las regiones SPI-1 y SPI-2 se encuentran conservadas en parte en una amplia variedad de serovares virulentos de *Salmonella*, lo que sugiere que puede

ser importante en la patogenia de la infección por otros serovares, aparte de *Salmonella typhimurium*⁴⁹.

La isla de patogenicidad SPI-1 es una región de 40 kb que alberga alrededor de 25 genes, los cuales codifican un sistema de secreción de proteínas tipo III (TTSS), el cual distribuye proteínas bacterianas desde el citosol de la bacteria hasta las células del huésped, además de secretar varias proteínas efectoras cuya finalidad es inducir cambios dentro de las células del huésped⁷³.

El fenotipo adherente e invasivo de *Salmonella enterica* es activado bajo condiciones similares a las encontradas en el intestino humano (alta osmolaridad y baja tensión de oxígeno).

Investigaciones recientes han demostrado que en adición a la presencia de los genes que regulan la entrada de la bacteria a células eucarióticas, los factores ambientales también podrían jugar un papel importante en la regulación de la misma. Los patógenos entéricos experimentan varios cambios ambientales cuando entran al huésped por la vía oral, por ejemplo el pH bajo, incremento de la temperatura, baja tensión de oxígeno, alta osmolaridad y privación de nutrientes. Por lo que la respuesta de la bacteria a estos cambios ambientales, modula la expresión de diferentes genes^{16,56}.

Un estudio de Carmen Tartera y col⁷⁵ provee evidencias para señalar que tanto la osmolaridad como la fase de crecimiento de cultivos crecidos en medios de baja osmolaridad, aumenta la adherencia e invasividad de *Salmonella typhi* sobre células epiteliales intestinales. Sus resultados demuestran que *Salmonella typhi* es menos invasiva cuando el cultivo entra en fase estacionaria, esto debido a un decremento paralelo en el número de bacterias capaces de adherirse a la monocapa epitelial. Así mismo la bacteria crecida en condiciones de alta osmolaridad son más invasivas. Así un

medio de alta osmolaridad es requerido durante la fase logarítmica tardía de crecimiento bacteriano para la inducción del fenotipo invasivo.

Otros investigadores han demostrado también que la anaerobiosis afecta la habilidad de diferentes especies de *Salmonella* para invadir células eucarióticas. Estos estudios mostraron que las bacterias crecidas en bajas tensiones de oxígeno son más invasivas que las bacterias crecidas en cultivos aeróbicos^{27, 70}.

Estos estudios sugieren que cuando *Salmonella typhi* es ingerida con el agua o comida contaminada debe experimentar cambios en la expresión genética antes de su adaptación fisiológica para una óptima adherencia e invasividad. Adicionalmente, la máxima expresión de los factores requeridos para adherencia e invasión fue a 676 mosmol (300 mM), sugiriendo que la osmolaridad encontrada en el íleo distal es apropiada para que *Salmonella typhi* exprese su fenotipo invasivo.

Los mecanismos responsables para la virulencia de *Salmonella typhi* son diferentes a otros serovares de *Salmonella* porque *Salmonella typhi* produce polisacárido Vi, el cual es un importante determinante de la virulencia durante la infección⁴⁴. El antígeno Vi de *Salmonella typhi* es un factor importante para la supervivencia y multiplicación de la bacteria dentro de los macrófagos. Así, cuando *Salmonella typhi* expresa el antígeno Vi y entra a los macrófagos, la producción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) no es estimulada. Sin embargo, el antígeno Vi es un factor adverso para la invasión de la bacteria a mucosa intestinal ya que se ha demostrado que cepas de *Salmonella typhi* que no expresan el antígeno Vi son más invasivas que las que lo expresan³¹.

Varios estudios han demostrado que la expresión del antígeno Vi por la bacteria esta regulada por la osmolaridad del medio, Licheng Zhao y col⁴⁴ encontraron que la expresión del antígeno Vi en la cepa silvestre de *Salmonella typhi* GIFU 10007

disminuyó cuando la bacteria se creció en medio de cultivo Luria Bertani adicionado con altas concentraciones de NaCl (300 a 400 mM) y el antígeno O9 (LPS) quedó expuesto a esta concentración. Por el contrario cuando la concentración de NaCl disminuye, la expresión del antígeno Vi aumenta y la aglutinación con O9 es apenas detectable. Estos mismos autores reportan que en la bacteria crecida a alta osmolaridad (300mM) la secreción de las proteínas involucradas en la invasión (Sip C, Sip B y Sip A) aumenta considerablemente. Las bacterias crecidas en estas condiciones fueron altamente invasivas tanto para células epiteliales “in vitro” como para las células M de placas de Peyer de rata.

La entrada en células epiteliales intestinales es una característica esencial en la patogénesis de *Salmonella typhi* agente causal de la fiebre tifoidea en humanos. Este proceso requiere motilidad intacta y secreción de proteínas Sip, las cuales promueven la invasión y son codificadas por los genes *inv*, *spa* y *prg* del sistema de secreción tipo III³.

La producción de proteínas Sip, flagelina y antígeno Vi es modulada diferentemente por los sistemas reguladores RcsB-RcsC en respuesta a cambios en la osmolaridad, esta regulación ocurre en ambos niveles transcripcional y post transcripcional. Así una alta osmolaridad disminuye la expresión del antígeno Vi y aumenta la expresión de flagelina y las proteínas involucradas en la invasividad. Esto podría reflejar la respuesta adaptativa de *Salmonella typhi* a los cambios ambientales encontrados durante los diferentes estadios de la patogénesis³.

La biosíntesis del antígeno Vi es gobernada por un conjunto de genes en el locus *viaB* y controlada por dos sistemas regulatorios, de dos componentes OmpR-EnvZ y RcsB-RcsC. Además de un regulador positivo TviA (VipR), el cual interactúa con RcsB promoviendo una transcripción óptima de genes implicados en la síntesis del antígeno Vi⁶⁵.

La fase de crecimiento, oxígeno, osmolaridad y pH modulan la expresión del gen *hilA*, identificado en la SPI-1, el cual codifica para un miembro de la familia *OmpR–ToxR* el cual regula los genes involucrados en la invasividad ⁴.

La homología entre los genes *iagA* de *Salmonella typhi* y *hil A* de *Salmonella typhimurium* sugieren que la proteína *iagA* puede funcionar también para activar la expresión de genes de invasión en *Salmonella typhi*. En adición los dos componentes del sistema regulatorio, *PhoP–PhoQ* regulan negativamente la expresión de los genes de invasión de *Salmonella typhimurium* y regulan positivamente la expresión de los genes requeridos para la supervivencia intracelular de la bacteria dentro de macrófagos acidificados ^{5, 57, 58}.

Diseminación de *Salmonella typhi*

Al entrar en contacto con las células M los microorganismos se internalizan con rapidez y son transportados hasta el tejido linfático submucoso, donde pueden ingresar en la circulación sistémica.

Una vez que han atravesado la barrera epitelial intestinal las bacterias interactúan con rapidez sobre macrófagos y linfocitos en placas de Peyer al igual que con otras estructuras linfáticas localizadas en la submucosa del intestino delgado ³⁰. El reclutamiento de nuevas células mononucleares y linfocitos pueden conducir a un aumento de tamaño pronunciado y a una necrosis de las placas de Peyer después de transcurridas varias semanas de infección.

Con el transcurso del tiempo *Salmonella* es incorporada por los macrófagos tisulares de la médula ósea, el hígado, bazo y las placas de Peyer. Durante la fase de incubación asintomática la mayoría de los microorganismos se localizan en el interior de macrófagos y quizás células epiteliales. Los síntomas recién se manifiestan después

de la replicación de una cantidad crítica del microorganismo. Esto como consecuencia de la secreción de citocinas por parte de los macrófagos en respuesta a la infección bacteriana. *Salmonella* posee la capacidad de inducir la muerte de los macrófagos y posiblemente esta propiedad contribuya a la supervivencia de los microorganismos después de la fagocitosis y el proceso inflamatorio asociado con el tejido linfático³².

La interacción *Salmonella*–macrófago resulta en una alteración de la expresión de un número de genes del huésped incluyendo la codificación de mediadores proinflamatorios. (Ej. INOS, quimiosinas, interleucina 1- β), receptores o moléculas de adhesión (TNF α R, CD40, ICAM 1), además de otros genes involucrados en la muerte celular o apoptosis (proteasa ICE, TNFR1, fas), y otros factores de transcripción (Egr-1 y IRF-1) “in vitro”^{61, 68}.

RESPUESTA INMUNE EN LAS MUCOSAS

Dentro del sistema inmune se pueden distinguir compartimentos anatómicamente diferentes, los cuales están adaptados para generar una respuesta inmune apropiada a los patógenos presentes en un conjunto particular de tejidos del cuerpo. Uno de estos compartimentos es el conocido como el sistema inmune de mucosas (MALT), que comprende el tejido linfoide asociado a mucosa broncopulmonar (BALT), el tracto gastrointestinal (GALT) y observaciones recientes describen la existencia de la organización de tejido linfoide en nariz y amígdalas (NALT)⁴⁵. Una característica común del MALT es la existencia de sitios inductores y sitios efectores de la respuesta inmune. Por muchos años se consideró que el principal sitio inductor de la respuesta inmune en el GALT eran las placas de Peyer, compuestas por folículos linfoides recubiertos por el epitelio asociado a folículos linfoides (FAE), el cual contiene células especializadas denominadas células M. Estas células presentan micropliegues en su

superficie apical en lugar de las microvellosidades presentes en el resto del epitelio intestinal. Además, estas células no presentan glicocalix en su superficie ni secretan moco por lo cual están adaptadas para interactuar directamente con moléculas y partículas presentes en el lumen intestinal ³⁵.

Las células M internalizan moléculas y partículas del lumen intestinal por endocitosis, este material es transportado en el interior de las células en vesículas hasta la membrana basal en donde es liberado, este proceso se conoce como transcitosis. En su superficie basal la membrana de las células M forma extensos pliegues alrededor de las células dendríticas y linfocitos lo cual hace que el material liberado por estas células pueda ser fácilmente captado por las células dendríticas y procesado para la presentación antigénica. En la actualidad se conoce que no solamente las placas de Peyer funcionan como sitios inductores de la respuesta inmune en el GALT ya que se ha demostrado la presencia de múltiples folículos linfoides aislados a lo largo de la mucosa intestinal los cuales también poseen células M en el epitelio y funcionan como sitios inductores de la respuesta inmune ³⁵.

Las células inmunes efectoras por el contrario, se localizan preferentemente en la lámina propia intestinal fuera de las placas de Peyer, en donde se lleva a cabo la diferenciación final de las células B IgA⁺ a células plasmáticas productoras de anticuerpos y la secreción de la IgA al lumen intestinal. Una gran proporción de los linfocitos T de la lámina propia (TCD4, TCD8, Tγδ) muestran también un fenotipo de células de memoria o previamente activadas ya que expresan el receptor de alta afinidad para la IL-2 (CD25) y producen citocinas. Sin embargo esta distinción funcional no es absoluta ya que también se han demostrado algunas funciones efectoras a nivel de las placas de Peyer ²⁰.

Los linfocitos que son activados en las placas de Peyer salen a través de los vasos linfáticos hasta los nódulos linfáticos mesentéricos donde se piensa que residen por un periodo de tiempo y reciben señales adicionales de diferenciación, posteriormente migran a la sangre a través del conducto torácico para localizarse finalmente en la lámina propia de las mucosas. Este proceso es dirigido por interacciones complejas entre receptores presentes en los linfocitos y sus ligandos expresados en el endotelio vascular de los tejidos. Se sabe que la integrina $\alpha_4\beta_7$ expresada por los linfocitos y las adhesinas vasculares de mucosas (MADCAM1) expresada en los vasos sanguíneos en la lámina propia juegan un papel importante en este proceso. Además participan en este proceso quimiosinas producidas por las células epiteliales intestinales ^{7,10}.

El sistema inmune intestinal tiene la capacidad de discriminar entre los antígenos inocuos como las proteínas de los alimentos y microorganismos comensales de la flora normal intestinal y los microorganismos patógenos que entran al huésped por la mucosa intestinal contra los cuales se requiere la inducción de una respuesta inmune ⁶⁰. Numerosos estudios han demostrado que la administración de antígenos por vía oral pueden producir: 1. Una respuesta inmune a nivel de mucosas asociadas con la producción de IgA secretora, sin respuesta a nivel sistémico, 2. Respuesta inmune tanto a nivel intestinal como sistémico con la producción de anticuerpos séricos IgM e IgG, 3. Desarrollo de tolerancia tanto local como sistémica o la producción de una respuesta inmune intestinal asociada con tolerancia a nivel sistémico ⁴⁵.

Estudios recientes han mostrado que contrariamente a lo que se creía, en ratones normales se produce una respuesta de anticuerpos IgA secretores contra los microorganismos de la flora normal intestinal, sin producción de respuesta inmune a

nivel sistémico. Este mecanismo parece ser fundamental para mantener la homeostasis a nivel de mucosas⁴⁸.

La protección de la superficie de las mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y urogenital, es en parte mediado por la IgA secretora¹⁴. Este anticuerpo consiste en dímeros de IgA asociados con la cadena J que es adquirida durante el proceso de polimerización en células plasmáticas y un componente secretor el cual se produce a nivel del epitelio de la mucosa y se une a IgA en el momento en que esta es secretada, después de haber sido sintetizada por las células plasmáticas en la submucosa. El componente secretor es un derivado del receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR), que une y transporta inmunoglobulinas poliméricas a través del epitelio glandular y mucosas.

En el humano existen dos subclases de IgA: La IgA 1 es el isótipo predominante en suero y se encuentra en forma monomérica y la IgA 2 es mas prevalente en secreciones de mucosas, se encuentra en forma dimérica o polimérica asociada al componente secretor y se le conoce como IgA secretora (IgAs). La principal diferencia entre las dos subclases es que la IgA 1 tiene en la bisagra una región altamente O-glicosilada de 16 aminoácidos (a.a) localizada entre los dominios C α 1 y C α 2, mientras que la IgA 2 tiene 3 a.a en la bisagra que no son glicosilados. Excluyendo la bisagra, la secuencia de aminoácidos de la IgA 1 e IgA 2 humana se diferencia solo en 14 a.a a lo largo del polipéptido^{37,77}.

Ya que la IgAs es la inmunoglobulina predominante a nivel del lumen intestinal, a los anticuerpos de ésta clase se les han atribuido diferentes funciones por las cuales puede mediar la protección contra diferentes patógenos. Una de las funciones mas estudiadas ha sido la exclusión inmune, la cual implica que los anticuerpos de esta clase pueden unirse a antígenos de la superficie de diferentes patógenos, así como a toxinas

bacterianas y otras moléculas, impidiendo su adherencia y/o invasión a las células epiteliales ³³. Otro de los mecanismos, sería inhibiendo la motilidad de los microorganismos y facilitando que sean atrapados en la capa de moco intestinal debido a la unión de la pieza secretora de la IgA al moco ⁷⁸. Alternativamente, complejos inmunes localizados en el lado basolateral del epitelio pueden ser eliminados al lumen intestinal debido al transporte de estos complejos inmunes mediado por PIgR. Así mismo, durante el transporte a través de las células epiteliales mediado por el PIgR se ha demostrado que la IgA es capaz de interactuar con diferentes virus (virus sendai, virus de influenza y rotavirus) bloqueando la replicación, el ensamble y/o el botonamiento ⁵⁴. Recientemente se ha descrito que durante el transporte intraepitelial de los anticuerpos IgA secretores estos pueden interactuar con el LPS bacteriano presente en vacuolas endocíticas inhibiendo las señales dadas por el LPS para inducir la producción de citocinas proinflamatorias ²².

Las células M son la principal ruta a través de la cual partículas antigénicas, macromoléculas solubles y patógenos son internalizados desde el lumen intestinal a los sitios inductores del sistema inmune de las mucosas.

Existen evidencias de que las células M de animales neonatos y adultos expresan un receptor de inmunoglobulinas IgR sobre su superficie apical que funciona en la unión y transporte transepitelial de anticuerpos desde las secreciones.

Roy y col ⁶⁹, fueron los primeros en proponer la existencia de tal receptor, basados en sus observaciones de que la IgA derivada de la leche materna se acumula sobre la superficie apical de las células M de Placas de Peyer de conejos neonatales, pero no sobre otros tipos de células epiteliales intestinales.

Mantis N. J. y col ⁵⁰, demostraron que la IgA con o sin componente secretor se une selectivamente a la superficie apical de células M de placas de Peyer de ratones,

pero no la IgG e IgM. La unión de IgA a células M no esta mediada por los receptores tipo lectina o por otros receptores FC α R previamente descritos incluyendo el CD 89 y el recientemente descubierto FC α μ R. Estos receptores podrían estar involucrados en el transporte de IgA secretora y complejos inmunes desde el lumen intestinal a los sitios inductores de la respuesta inmune.

MODELOS EXPERIMENTALES

Debido a que *Salmonella typhi* solo infecta al humano y no existe un modelo experimental adecuado para la fiebre tifoidea, el estudio de la respuesta inmune contra ésta se ha basado en los resultados obtenidos en individuos con fiebre tifoidea o la respuesta inmune generada con cepas atenuadas de *Salmonella typhi*. Igualmente se ha utilizado el modelo del ratón infectado con *Salmonella typhimurium* ya que se produce una infección similar a la reportada en el humano con fiebre tifoidea. Tanto los resultados obtenidos en el humano con fiebre tifoidea como en el modelo murino indican que la respuesta inmune humoral y celular son importantes para la protección contra la bacteria. En el modelo experimental del ratón infectado con *Salmonella typhimurium* se ha encontrado que los linfocitos TCD4 y TCD8 juegan un papel importante en la protección y varios estudios han mostrado la inducción de una respuesta inmune Th1, caracterizada por la producción de interferón gama (INF γ), IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la cual se cree que juega un papel muy importante en la activación de macrófagos y eliminación de la bacteria, ya que se trata de un microorganismo intracelular facultativo⁵³. También se ha encontrado la presencia de linfocitos TCD8 capaces de lisar células infectadas con la bacteria, además estos linfocitos TCD8 se ha demostrado que producen citocinas tipo Th1. Los estudios realizados en humanos con fiebre tifoidea o vacunados con cepas atenuadas, han

demostrado también la presencia de linfocitos TCD4 específicos a componentes bacterianos (flagelina, porina) y la mayoría de éstos individuos producen preferentemente citocinas Th1, además se ha comprobado que varias proteínas son capaces de inducir la producción de citocinas proinflamatorias por varios tipos de células (monocitos, macrófagos, células epiteliales intestinales y células NK)⁷¹. Otros estudios han demostrado que la respuesta inmune humoral también juega un papel importante en la protección, especialmente en los tiempos tempranos de la infección. Los ratones infectados con *Salmonella* producen anticuerpos séricos contra una gran cantidad de antígenos bacterianos incluyendo LPS, flagelos, fimbrias, porinas y otras proteínas bacterianas como proteínas de membrana externa, lipoproteínas, proteínas de choque térmico y proteínas del flagelo⁵¹. Sin embargo, la contribución a la protección por los anticuerpos dirigidos contra estos componentes no esta completamente clara. El papel protector del antígeno Vi ha sido también estudiado en el modelo murino utilizando una cepa recombinante de *Salmonella typhimurium* que expresa el polisacárido capsular Vi, la inmunización de ratones con esta cepa en el cojinete plantar indujo protección contra el desafío intraperitoneal con una cepa virulenta de *Salmonella typhi*. Las proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* incluyendo porinas, también inducen protección en este modelo¹¹. Tanto en el modelo murino como en individuos con fiebre tifoidea o inmunizados con vacunas orales, se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgA secretores dirigidos contra el LPS bacteriano. Estudios realizados “in vitro” han comprobado que anticuerpos IgA anti LPS son capaces de inhibir la adherencia e invasividad de *Salmonella* a células epiteliales intestinales³⁴. En el modelo murino se ha demostrado que la inoculación de hibridomas de células B que producen un anticuerpo IgA anti-LPS confiere cierta protección a la infección oral de los ratones, probablemente inhibiendo la adherencia a células epiteliales y células M

intestinales ⁵⁷. En el humano se ha demostrado también la presencia de anticuerpos específicos contra varios componentes de *Salmonella typhi*, por ejemplo anticuerpos séricos IgG contra LPS, antígenos flagelares, porinas, proteínas de membrana externa, etc ⁵². También se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgA secretores dirigidos contra el LPS. Los acarreadores crónicos, muestran altos títulos de anticuerpos contra el antígeno Vi, mientras que solo el 20% de pacientes con fiebre tifoidea aguda tiene anticuerpos anti Vi. Recientemente se ha demostrado que la vacunación con antígeno Vi purificado induce protección contra la fiebre tifoidea ^{1, 38}.

VACUNAS

El avance en ensayos clínicos de vacunas candidatas necesitan ser evaluadas pre-clínicamente en modelos animales relevantes que intenten pronosticar su perfil inmunológico y su seguridad antes de ser administradas al humano ⁶³.

Actualmente las vacunas disponibles contra *Salmonella typhi* pueden ser divididas en tres grupos:

(i) **Vacunas con bacterias muertas.** Consisten en la inactivación de la bacteria con calor o acetona y es administrada parenteralmente. En humanos estas vacunas provocan una buena respuesta inmune humoral y confieren un grado moderado de protección al individuo ⁴², sin embargo, estas vacunas son muy reactogénicas e inducen una pobre inmunidad celular ¹³, por lo cual están en desuso.

(ii) **Vacunas a partir de subunidades.** Estas vacunas están basadas en el polisacárido Vi de *Salmonella typhi*, son seguras, inmunogénicas y actualmente aprobadas para su uso humano, las vacunas con antígeno Vi confieren entre 55 y 75% de protección contra la fiebre

tifoidea en áreas endémicas ¹. Sin embargo, tienen el inconveniente que inducen una pobre memoria inmunológica ya que la respuesta inducida es timo independiente y no inducen una buena respuesta en niños pequeños. Además, se han reportado casos de epidemias de fiebre tifoidea con cepas de *Salmonella typhi* que no expresan el antígeno Vi. Están a nivel experimental vacunas de antígeno Vi acoplado a diferentes proteínas lo cual aumenta la inmunogenicidad y capacidad de protección⁴¹. Aunque todavía no está claro que antígenos son responsables para la protección contra *Salmonella*; niveles bajos de resistencia contra *Salmonella* pueden ser inducidos por la administración de flagelos, porinas o fracciones de polisacárido en el modelo murino, varias de estas vacunas están en diferentes fases experimentales para poder ser utilizadas en el humano.

(iii) **Vacunas Atenuadas.** La disponibilidad del genoma completo de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium* junto con métodos avanzados para identificar los genes de virulencia expresados in vivo, son herramientas útiles para la generación de mutantes atenuadas de *Salmonella* como candidatos a potenciales vacunas⁵⁵.

Están en estudio una gran variedad de cepas atenuadas de *Salmonella typhi* que pudieran ser más inmunogénicas, de tal manera que sea suficiente una o dos dosis para inducir una buena respuesta inmunológica. Las principales cepas atenuadas que se encuentran en fase experimental son: X3927, CVD905, CVD906, CVD908, Ty800, X40073, CVD909⁴³. Además las cepas atenuadas de *Salmonella* son particularmente atractivas como vectores vivos potenciales que expresen antígenos de patógenos no relacionados, debido a que pueden ser administradas vía mucosas y se ha demostrado

que pueden inducir tanto respuestas humorales como celulares. Estas cepas atenuadas de *Salmonella typhi* se ha demostrado que causan solamente una infección local a nivel intestinal y no se detectan a nivel sistémico, sin embargo son capaces de inducir una respuesta inmune de anticuerpos séricos y se pueden detectar linfocitos TCD4 y TCD8 específicos contra componentes de la bacteria en sangre periférica. Estos linfocitos expresan en su superficie integrinas características para su alojamiento en mucosas ($\alpha_4\beta_7$).

Aunque como ya se mencionó anteriormente *Salmonella typhi* no causa una enfermedad sistémica en el ratón, varios estudios han demostrado que *Salmonella typhi* es capaz de invadir la mucosa intestinal murina e inducir una respuesta inmune cuando se administra por vía oral. Por lo tanto pensamos que este modelo puede ser de utilidad para analizar el efecto de anticuerpos de reacción cruzada sobre la invasividad y la inmunogenicidad de *Salmonella typhi* cuando se administra por vía oral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe un gran interés en desarrollar cepas atenuadas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) que puedan conferir una mejor protección no sólo contra el microorganismo homólogo, sino que puedan ser utilizadas como vectores vivos capaces de expresar antígenos heterólogos de otros patógenos y puedan ser utilizadas como vacunas multivalentes administradas vía mucosas. Sin embargo existen datos contradictorios acerca de las características de las cepas atenuadas de *Salmonella* necesarias para inducir una buena respuesta inmunológica cuando se administran a nivel de mucosas. Algunos autores sugieren que se requiere una buena colonización a nivel del GALT para ello ^{17, 74}, mientras que otros autores sugieren que la viabilidad y persistencia de *Salmonella* no son necesarias y el punto crítico es la cantidad inicial de antígenos que estimulen el tejido linfoide asociado a mucosas y no la persistencia de la cepa ¹². Existen también datos contradictorios acerca de cómo puede afectar la existencia de una inmunidad pre-existente contra *Salmonella*, la respuesta inmune inducida por la vacunación con cepas atenuadas de la bacteria. Se ha reportado que existe una correlación inversa entre los títulos pre-existentes de anticuerpos IgA de reacción cruzada contra el LPS de *Salmonella typhi* y la capacidad de la vacuna oral Ty21a de inducir la producción de anticuerpos a nivel intestinal ²⁵. Sin embargo, Ferguson y col ²¹ reportaron que una buena respuesta inmune intestinal a la vacuna Ty21a fue sólo evidente en individuos que habían tenido un contacto previo con *Salmonella*. Datos igualmente contradictorios han sido reportados en el modelo murino con *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*) ⁶.

Por otro lado se ha descrito la presencia de receptores para IgA en la superficie apical de las células M de las placas de Peyer, capaces de unir y endocitar anticuerpos IgA secretores (IgAs). Estos receptores podrían estar involucrados en el transporte de

IgAs y complejos inmunes desde el lumen intestinal a los sitios inductores de la respuesta inmune ⁵⁰. Ya que en individuos que viven en zonas endémicas para infecciones con bacterias Gram negativas la presencia de anticuerpos de reacción cruzada es frecuente es importante conocer el efecto que estos anticuerpos pueden tener sobre la inmunogenicidad de las vacunas administradas por vía oral.

HIPÓTESIS

La presencia de anticuerpos de reacción cruzada anti-Lípido A pueden alterar la invasividad de *Salmonella typhi* a mucosa intestinal murina y la inmunogenicidad de la bacteria administrada por vía oral.

OBJETIVO

Determinar el efecto de anticuerpos monoclonales anti-Lípido A sobre la invasividad de *Salmonella typhi* a mucosa intestinal murina y sobre la inmunogenicidad de la bacteria administrada por vía intragástrica.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratones hembras Balb/c convencionales y libres de patógenos de 6 a 8 semanas de edad para los estudios de inmunización y 10 semanas para estudios de invasividad.

Bacterias y condiciones de cultivo. Se utilizó la cepa de *Salmonella typhi* JM 1301². A partir de una colonia de *Salmonella typhi* se obtuvo un precultivo de toda la noche en 5 mL de caldo Luria 0.3 M el cual se diluyó 1:50 en Luria 0.3 M y se incubó 4 horas a 37 °C para los estudios de invasividad, o 1:1000 toda la noche para los estudios de inmunogenicidad.

Al finalizar el cultivo la suspensión celular se centrifugó a 10000 rpm x 10 minutos y se resuspendió en medio Luria.

Opsonización de las bacterias. Se utilizó un anticuerpo monoclonal IgA ST 19 dirigido contra el lípido A de bacterias Gram negativas⁶². Las bacterias fueron incubadas con diferentes concentraciones del anticuerpo ST 19 durante 1 hora en hielo.

Estudios de citometría de flujo. La bacteria viable cultivada como se mencionó anteriormente fue cosechada por centrifugación y resuspendida en PBS, 1×10^6 bacterias en 50 μ L de PBS fueron incubadas con diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal ST19 o el anticuerpo IgA control MOPC 315⁶⁷ (SIGMA Chemical Co.) el cual esta dirigido contra dinitrofenol-trinitrofenol, durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS conteniendo 2 % de suero fetal bovino (PBS-SFB) por centrifugación a 10000 rpm x 10 minutos. Al botón bacteriano se le añadió 50 μ L de un anticuerpo anti-IgA de ratón fluoresceinado (Zymed Laboratories Inc.).

Las bacterias fueron incubadas 30 minutos a 4 °C y lavadas nuevamente con PBS como se mencionó anteriormente. El botón bacteriano fue resuspendido en 150 µL de PBS-SFB y se le añadió 350 µL de paraformaldehído al 2 % en PBS. Las células fueron almacenadas a 4 °C y posteriormente se analizaron por citometría (FACSCAN Becton Dickson).

Ensayos de invasividad. A los ratones se les administró agua adicionada con gentamicina (500 µg/mL) (Shering – Plough, S.A. de C.V.) y estreptomina (1000 µg/mL) (Laboratorios Monterrey S. A. de C. V.) durante 4 días, 24 horas antes de realizar los ensayos de invasividad los animales se dejaron sin alimento y con agua sin antibióticos. Los animales fueron sacrificados, se obtuvo el intestino delgado y se ligaron segmentos de aproximadamente 3 cm de longitud, los cuales fueron inoculados con *Salmonella typhi* sola o previamente opsonizada con diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal ST 19 (2×10^7 bacterias en 50 µL de RPMI). Estos segmentos fueron incubados a 37 °C con atmósfera de 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Posteriormente se les inoculó 50 µL de RPMI con gentamicina (200 µg/mL) y se incubaron en medio adicionado con gentamicina (100 µg/mL) durante 1 hora a 37 °C en atmósfera de CO₂. Al finalizar el periodo de incubación, se cortaron los segmentos longitudinalmente, se lavaron 3 veces en Hepes Hanks, se suspendieron en 2 mL de una solución al 1 % de tritón X 100 en SSI, los segmentos intestinales fueron homogenizados y se sembraron diferentes diluciones en Agar Salmonella - Shigella (BIOXON) para determinar las unidades formadoras de colonias UFC.

Inmunización de los ratones. Se utilizaron grupos de ratones Balb/c convencionales y libres de patógenos (5 ratones por grupo) los cuales se mantuvieron por 24 horas sin alimento, 30 minutos antes de la inmunización se les administró 0.1 mL de bicarbonato de sodio al 10 %. Los ratones se inmunizaron (día 0) con *Salmonella typhi* viables, solas o previamente opsonizadas con diferentes concentraciones del anticuerpo ST 19 por vía intragástrica (2×10^8 bacterias/ratón). Como controles se incluyeron ratones normales, inoculados con el anticuerpo ST 19 o con la bacteria previamente incubada con un anticuerpo monoclonal IgA control MOPC 315. 28 días después de la inmunización primaria a cada grupo de ratones se les administró un refuerzo.

Obtención de suero. Se obtuvieron muestras de sangre del plexo retro-orbital de los ratones a diferentes tiempos después de la inmunización (15, 27, 36 y 45 días). Se obtuvo el suero y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Obtención de fluido intestinal. Los ratones previamente se dejaron sin alimento 18 hr. Se sacrificaron y se les extrajo el intestino delgado el cual se lavó con 2mL de Solución Balanceada de Fosfatos (PBS) pH 7.2; las muestras se centrifugaron a 13000 rpm x 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se separó el sobrenadante, al cual se le agregaron 0.2 mL de solución inhibidora de tripsina de soya tipo II-S (SIGMA Chemical Co.) (1 mg/mL), 0.02 mL de sal sódica del ácido etil diamino tetracético (EDTA) (SIGMA Chemical Co.) 100 mM de acuerdo al método descrito por Elson y col ¹⁹. El sobrenadante nuevamente se centrifugó según las condiciones descritas, se transfirió a un tubo y se le agregó fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF) (SIGMA Chemical Co.) a una concentración de 0.02 mL dejándose por 15 min a temperatura ambiente y

posteriormente se le agregó 0.05 mL de albúmina sérica bovina (SIGMA Chemical Co.) al 20 %. Los fluidos así obtenidos fueron almacenados en viales a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Determinación de anticuerpos anti LPS de *Salmonella typhi* por Ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se recubrieron los pozos de las tiras de microtitulación (Immunolon II, Dynatech Laboratorios Inc. Alexandria VA, USA) con 50 μL de amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6, conteniendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *Salmonella typhi* (SIGMA Chemical Co.). Las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente. Al momento de usarse las placas se rehidrataron con una solución balanceada de fosfatos (PBS) 0.02M pH 7.2, conteniendo 0.5 % de tween 20 (SIGMA Chemical Co.) y 0.5 % de albúmina sérica bovina (ASB), se lavaron 2 veces con PBS mas tween 20. Posteriormente se añadió una solución de PBS más ASB al 3 % y se incubaron durante 2 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de bloquear los sitios no cubiertos con antígeno. Las tiras se lavaron y se les agregó 50 μL de la dilución adecuada de los sueros, se incubaron toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se lavaron y se les agregó 50 μL de anticuerpos peroxidados por pozo (Zymed laboratoreis Inc.) dirigidos contra la fracción Fc de la IgA, IgG1, IgG2a o anti IgGAM de ratón. Las tiras se incubaron nuevamente durante 2 horas para anticuerpos IgGAM, IgG I e IgG2a y durante 4 horas para anticuerpos IgA, a temperatura ambiente, se lavaron y se les agregó como sustrato 0.05 mL de una solución que contenía 10 mL de amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.5 más 10 mg de o-fenilendiamina (SIGMA Chemical Co.) y 4 μL de una solución al 30 % de peróxido de hidrógeno (SIGMA Chemical Co.). La reacción se bloqueó 5 minutos después con 200 μL de una solución 1M de ácido sulfúrico e inmediatamente después se registraron las lecturas en un lector de ELISA (BIO-TEK instrument) a una densidad óptica de 490 nm. Todas las incubaciones se hicieron en agitación a (90 rpm) en un

agitador (American Rotor M - 4140). Para poder cuantificar los anticuerpos anti-LPS de las subclases IgG1 e IgG2a se incluyeron curvas estándar con concentraciones conocidas de las subclases IgG1 e IgG2a ⁷².

Análisis estadístico. La diferencia entre los grupos fueron calculadas por análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple Tukey, con el programa InStat (GraphPad Software, San Diego, Calif.) las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando los valores de p fueron menores a < 0.05

RESULTADOS

Reactividad del anticuerpo monoclonal ST 19 con *Salmonella typhi* viable.

Como se observa en la figura 1 el anticuerpo monoclonal ST 19 es capaz de reconocer su epítotope en el 68 % de las bacterias viables como se determinó por citometría de flujo.

REACTIVIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL (IgA) ANTI-LIPIDO A CON *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHI

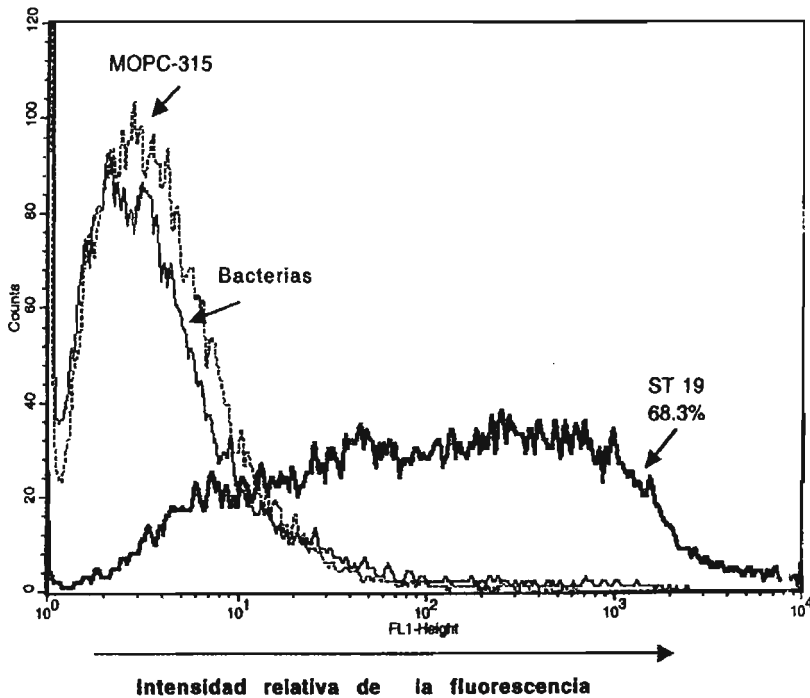
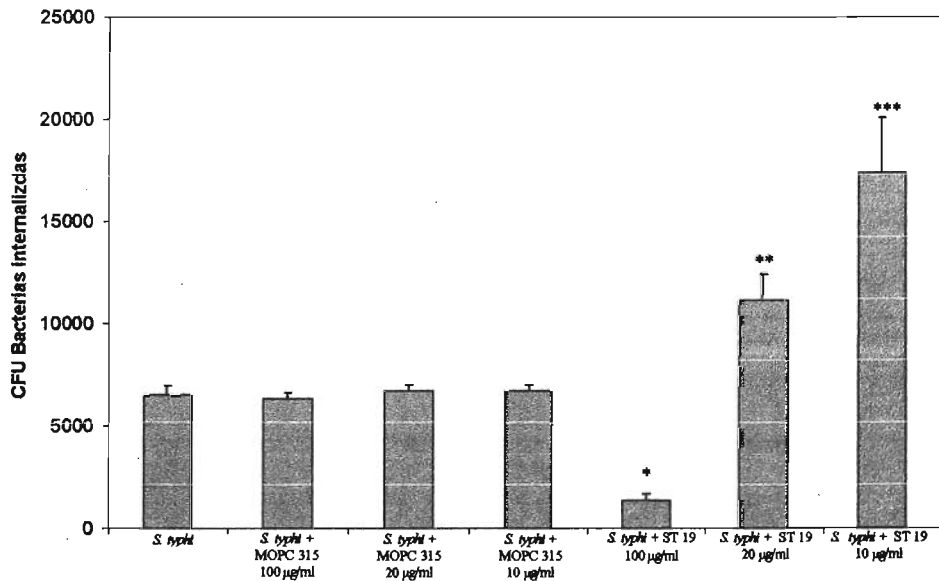


Fig 1. Histogramas que muestran la capacidad de union del anticuerpo ST 19 a *Salmonella typhi* crecida en medio Luria

Efecto del anticuerpo monoclonal ST 19 sobre la invasividad de *Salmonella typhi* a mucosa intestinal murina. Como se observa en la figura 2 solo una alta concentración del anticuerpo monoclonal ST 19 (100 µg/mL) fue capaz de inhibir la invasividad de *Salmonella typhi* a la mucosa intestinal murina. Por el contrario, concentraciones más pequeñas de este mismo anticuerpo aumentaron significativamente la invasividad de la bacteria a la mucosa intestinal. La dosis óptima utilizada fue de 10 µg/mL ya que a concentraciones menores del monoclonal el efecto observado disminuye.

Fig. 2 El anticuerpo monoclonal IgA anti-lípido A altera la invasividad de *Salmonella typhi* a mucosa intestinal de ratón



* *S. typhi* + ST 19 100 µg/ratón vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC $p < 0.05$

** *S. typhi* + ST 19 20 µg/ratón vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC $p < 0.05$

*** *S. typhi* + ST 19 10 µg/ratón vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC $p < 0.05$

Efecto del anticuerpo monoclonal ST 19 sobre la inmunogenicidad de *Salmonella typhi* administrada por vía intragástrica. Grupos de 5 ratones fueron inmunizados con la bacteria sola o pre-incubada con diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal y sangrados a diferentes tiempos. Se utilizaron ratones Balb/c convencionales y ratones Balb/c libres de patógenos.

Ratones Balb/c convencionales

Los resultados de la determinación de anticuerpos anti-LPS (IgGAM) de los ratones Balb/c convencionales inmunizados con la bacteria sola u opsonizada con ST 19 se muestran en la TABLA I. Se puede observar que la inmunización de los ratones con *Salmonella typhi* preincubada con una concentración de 20 µg/ratón del anticuerpo monoclonal ST 19 indujo la producción de niveles mas elevados de anticuerpos anti-LPS de *Salmonella typhi* que la inmunización de la bacteria sola. El efecto fue notorio en la respuesta inmune primaria y dos días después del refuerzo. Por el contrario cuando se administró la bacteria con una concentración mayor del anticuerpo ST 19 no se observaron diferencias, en los días 15 y 30 en los niveles de anticuerpo con respecto al grupo inmunizado solamente con la bacteria o con la bacteria incubada con el anticuerpo monoclonal control, sin embargo, 45 días después de la administración primaria se observó una disminución significativa en los niveles de anticuerpos de este grupo. A ningún tiempo se observaron diferencias en los niveles de anticuerpo de los ratones inmunizados con *Salmonella typhi* y *Salmonella typhi* + el anticuerpo monoclonal control MOPC 315. Las diluciones del suero utilizadas en los diferentes tiempos analizados son diferentes ya que durante la respuesta secundaria los niveles de anticuerpo se elevan considerablemente y no se puede utilizar una dilución uniforme ya que algunas muestras quedarían por fuera de los límites de detección del sistema.

TABLA I. Anticuerpos séricos IgGAM anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c convencionales

Dilución	15 días	30 días	45 días
	1:100	1:200	1:800
Control	0.205 ± 0.01	0.189 ± 0.002	0.162 ± 0.02
<i>S. typhi</i>	0.333 ± 0.01	1.565 ± 0.003 ^a	2.190 ± 0.1 ^a
<i>S. typhi</i> + MOPC 315 (50 µg/ratón)	0.339 ± 0.02	1.568 ± 0.004 ^a	2.237 ± 0.1 ^a
<i>S. typhi</i> + MOPC 315 (20 µg/ratón)	0.332 ± 0.01	1.562 ± 0.006 ^a	2.153 ± 0.1 ^a
<i>S. typhi</i> + ST19 (50 µg/ratón)	0.359 ± 0.01	1.562 ± 0.005 ^b	1.198 ± 0.04 ^{b,c}
<i>S. typhi</i> + ST19 (20 µg/ratón)	0.611 ± 0.05 ^{b,c}	1.950 ± 0.02 ^{b,c}	2.009 ± 0.1 ^b

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315 y anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de las lecturas de D.O. 490 nm ± el error estándar.

a. *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC vs Control $p < 0.05$

b. *S. typhi* + ST 19 vs Control $p < 0.05$

c. *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC $p < 0.05$

Para determinar si la opsonización de las bacterias con el anticuerpo monoclonal afecta también la clase y subclase de anticuerpos inducida por la inmunización, se determinaron los niveles de anticuerpos IgA, IgG1 e IgG2a anti-LPS. Los resultados se muestran en las tablas II y III respectivamente.

En la TABLA II se observa que los niveles de anticuerpos IgA de los ratones inmunizados con la bacteria opsonizada con una concentración 20 μg /ratón del anticuerpo ST 19, están aumentados significativamente comparados con los obtenidos en los ratones inmunizados con la bacteria sola. Este incremento en los niveles de anticuerpos IgA fue observado tanto en la respuesta primaria como en la secundaria.

TABLA II. Anticuerpos séricos IgA anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c convencionales

Dilución	15 días	30 días	45 días
	1:100	1:100	1:100
Control	0.225 \pm 0.002	0.306 \pm 0.01	0.121 \pm 0.02
<i>S. typhi</i>	0.302 \pm 0.06	1.004 \pm 0.07 ^a	1.209 \pm 0.02 ^a
<i>S. typhi</i> + MOPC315 (50 μg /ratón)	0.282 \pm 0.04	1.003 \pm 0.05 ^a	1.203 \pm 0.03 ^a
<i>S. typhi</i> + MOPC315 (20 μg /ratón)	0.259 \pm 0.05	0.982 \pm 0.06 ^a	1.205 \pm 0.02 ^a
<i>S. typhi</i> + ST19 (50 μg /ratón)	0.522 \pm 0.04 ^{b,c}	1.009 \pm 0.002 ^b	0.901 \pm 0.09 ^{b,c}
<i>S. typhi</i> + ST19 (20 μg /ratón)	0.488 \pm 0.004 ^b	1.686 \pm 0.07 ^{b,c}	2.629 \pm 0.07 ^{b,c}

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315, anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de las lecturas de D.O. 490 nm \pm el error estándar.

a. *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC 315 vs Control $p < 0.05$

b. *S. typhi* + ST 19 vs Control $p < 0.05$

c. *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC 315 $p < 0.05$

La determinación de los anticuerpos de subclase IgG1 e IgG2a se realizó a los 45 días y se muestra en la TABLA III. Se puede observar que en todos los grupos hay una mayor concentración de anticuerpos de subclase IgG2a que de la subclase IgG1. Sin embargo, la relación de anticuerpos IgG2a/IgG1 fue mayor en el grupo inmunizado solamente con la bacteria que en los grupos inmunizados con la bacteria opsonizada. En el grupo control no se detectaron anticuerpos anti-LPS.

TABLA III. Anticuerpos séricos IgG1 e IgG2a anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c convencionales

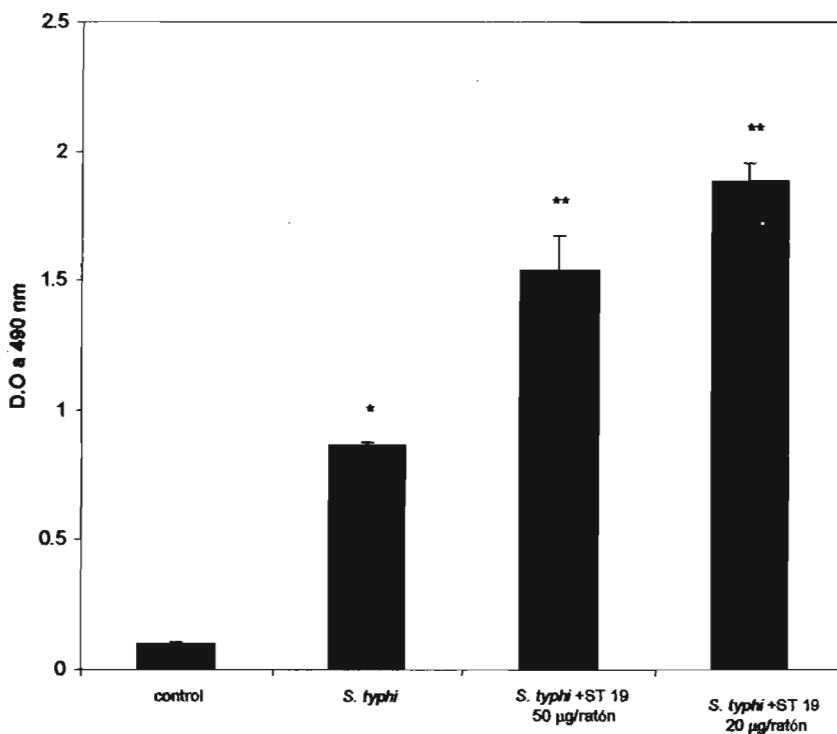
	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	IgG2a ($\mu\text{g/mL}$)	IgG2a/IgG1
Control	-	-	-
<i>S. typhi</i>	184 \pm 52	810 \pm 23	4.35 \pm 0.01
<i>S. typhi</i> + ST 19 (50 μg /ratón)	91 \pm 3.46 ^a	345 \pm 23.64 ^a	3.54 \pm 0.31 ^a
<i>S. typhi</i> + ST 19 (20 μg /ratón)	183 \pm 9	534 \pm 6 ^a	2.92 \pm 0.11 ^a

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315, anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de 3 determinaciones de las concentraciones de anticuerpos específicos de cada subclase \pm el error estándar.

a *S. typhi* vs ST 19 $p < 0.05$

En la figura 3 se presentan los resultados de la determinación de anticuerpos IgA anti-LPS presentes en el fluido intestinal de los grupos de ratones inmunizados, se observa claramente un aumento de anticuerpos IgA específicos en los grupos de animales inmunizados con la bacteria opsonizada con el anticuerpo monoclonal anti-lípido A.

Fig. 3 Anticuerpos IgA anti-LPS de *Salmonella typhi* en fluido intestinal de ratones Balb/c convencionales



Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315, anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de las lecturas de D.O. 490 nm \pm el error estándar.

* *S. typhi*, vs Control $p < 0.05$

** *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi* $p < 0.05$

Ratones Balb/c libres de patógenos

Debido a que en el grupo de ratones Balb/c convencionales los cambios más notorios en los niveles de anticuerpos fueron observados en los ratones inmunizados con la bacteria preincubada con la concentración más baja del anticuerpo anti-lípido A (20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) decidimos analizar en los ratones Balb/c libres de patógenos esta misma concentración y una menor del anticuerpo ST 19 (TABLA IV). La inmunización con *Salmonella typhi* de los ratones libres de patógenos indujo niveles de anticuerpos muy bajos. Por el contrario la inmunización con la bacteria opsonizada indujo niveles más altos de anticuerpos. Estas diferencias fueron observadas tanto en la respuesta inmune primaria como en la secundaria y con la dosis más baja (10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) el efecto fue más notorio.

TABLA IV. Anticuerpos séricos IgGAM anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c libres de patógenos

Dilución	15 días	27 días	36 días	45 días
	1:100	1:100	1:400 (1:100)	1:400 (1:100)
Control	0.175 ± 0.003	0.137 ± 0.009	0.104 ± 0.001	0.286 ± 0.008
<i>S. typhi</i>	0.171 ± 0.002	0.146 ± 0.002	0.105 ± 0.001 (0.376 ± 0.004)	0.474 ± 0.01 ^a (1.481 ± 0.008)
<i>S. typhi</i> + MOPC315 (20 µg/ratón)	0.171 ± 0.002	0.145 ± 0.004	0.103 ± 0.001	0.472 ± 0.01 ^a
<i>S. typhi</i> + MOPC315 (10 µg/ratón)	0.170 ± 0.003	0.141 ± 0.005	0.103 ± 0.001	0.461 ± 0.01 ^a
<i>S. typhi</i> + ST 19 (20 µg/ratón)	0.134 ± 0.001 ^{b,c}	0.759 ± 0.001 ^{b,c}	0.584 ± 0.01 ^{b,c}	0.726 ± 0.006 ^{b,c}
<i>S. typhi</i> + ST 19 (10 µg/ratón)	0.343 ± 0.002 ^{b,c}	1.415 ± 0.001 ^{b,c}	1.871 ± 0.007 ^{b,c}	1.625 ± 0.001 ^{b,c}

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315, anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de las lecturas de D.O. 490 nm ± el error estándar.

a *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC vs Control $p < 0.05$

b *S. typhi* + ST 19 vs Control $p < 0.05$

c *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC $p < 0.05$

Los niveles de anticuerpos IgA anti – LPS en este grupo de ratones fueron bajos y solamente en el grupo inmunizado con la bacteria mas el anticuerpo ST 19 (10 µg/ratón) se detectaron niveles de anticuerpos IgA específicos mas altos especialmente en la respuesta secundaria (TABLA V).

TABLA V. Anticuerpos séricos IgA anti–LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c libres de patógenos

Dilución	15 días 1:50	27 días 1:50	36 días 1:50	45 días 1:50
Control	0.125 ± 0.01	0.121 ± 0.001	0.123 ± 0.008	0.133 ± 0.003
<i>S. typhi</i> + MOPC	0.126 ± 0.005	0.126 ± 0.004	0.125 ± 0.006	0.172 ± 0.001
<i>S. typhi</i>	0.126 ± 0.005	0.125 ± 0.005	0.148 ± 0.002	0.171 ± 0.001
<i>S. typhi</i> + ST19 (20 µg/ratón)	0.134 ± 0.002	0.181 ± 0.002 ^{b,c}	0.228 ± 0.001 ^{b,c}	0.355 ± 0.006 ^{b,c}
<i>S. typhi</i> + ST19 (10 µg/ratón)	0.134 ± 0.005	0.535 ± 0.001 ^{b,c}	1.871 ± 0.03 ^{b,c}	1.973 ± 0.04 ^{b,c}

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315, anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de las lecturas de D.O. 490 nm ± el error estándar.

a *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC vs Control $p < 0.05$

b *S. typhi* + ST 19 vs Control $p < 0.05$

c *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC $p < 0.05$

Al igual que en los ratones Balb/c convencionales hubo un predominio de anticuerpos específicos de la subclase IgG2a e igualmente la relación de anticuerpos IgG2a/IgG1 disminuyó en los grupos de ratones con la bacteria opsonizada (TABLA VI). En los sueros controles no se detectaron anticuerpos anti-LPS.

TABLA VI. Anticuerpos séricos IgG1 e IgG2a anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c libres de patógenos

	IgG1 (µg/mL)	IgG2a (µg/mL)	IgG2a/IgG1
Control	-	-	-
<i>S. typhi</i>	1.37 ± 0.12	9.25 ± 0.5	6.75 ± 0.25
<i>S. typhi</i> +ST19 (20 µg/ratón)	3.52 ± 0.37	21.15 ± 1.95	6.00 ± 0.08 ^a
<i>S. typhi</i> +ST19 (10 µg/ratón)	64.00 ± 2 ^b	230.00 ± 20 ^b	3.60 ± 0.42 ^b

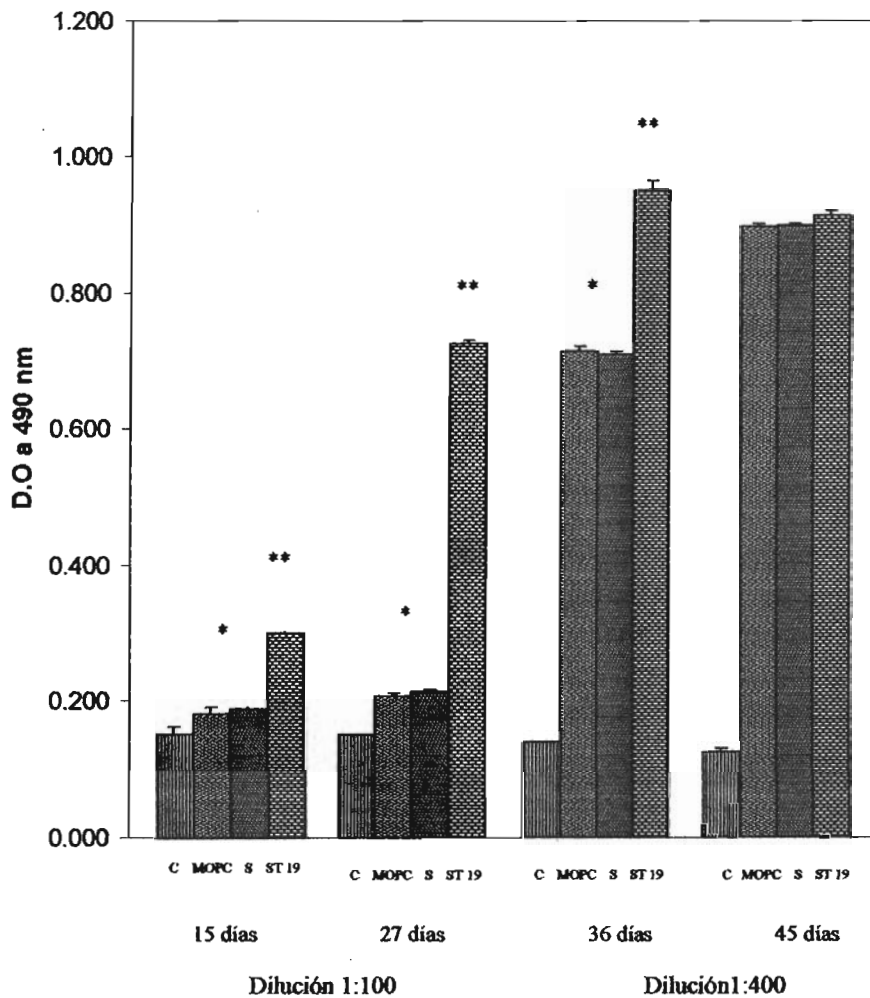
Grupos de 5 ratones fueron inmunizados por vía i.g. el día 0 y 28 con la bacteria sola o previamente incubada con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales IgA, control MOPC 315, anti-lípido A ST 19. Los valores representan el promedio de 3 determinaciones de las concentraciones de anticuerpos específicos de cada subclase ± el error estándar.

a *S. typhi* + ST 19 (20 µg/ratón) vs *S. typhi* $p < 0.05$

b *S. typhi* + ST 19 (10 µg/ratón) vs *S. typhi* $p < 0.05$

Para determinar si la dosis de 10 μg /ratón de ST 19 tiene también un efecto en los ratones Balb/c convencionales se inmunizó un nuevo grupo de ratones convencionales utilizando esta dosis. Los niveles de anticuerpos específicos IgGAM, IgA y las subclases IgG1 e IgG2a se muestran en las figuras 4, 5 y tabla VII respectivamente. Los resultados obtenidos fueron muy parecidos al lote 1 de ratones convencionales. La inmunización con *Salmonella* más el anticuerpo monoclonal ST 19 (10 μg /ratón) indujo niveles de anticuerpos séricos específicos más elevados que cuando se inmunizaron con *Salmonella typhi* el efecto fue detectado en la respuesta primaria y al día 36 (8 días después del refuerzo) figura 4.

Fig. 4 Anticuerpos séricos IgGAM anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c convencionales



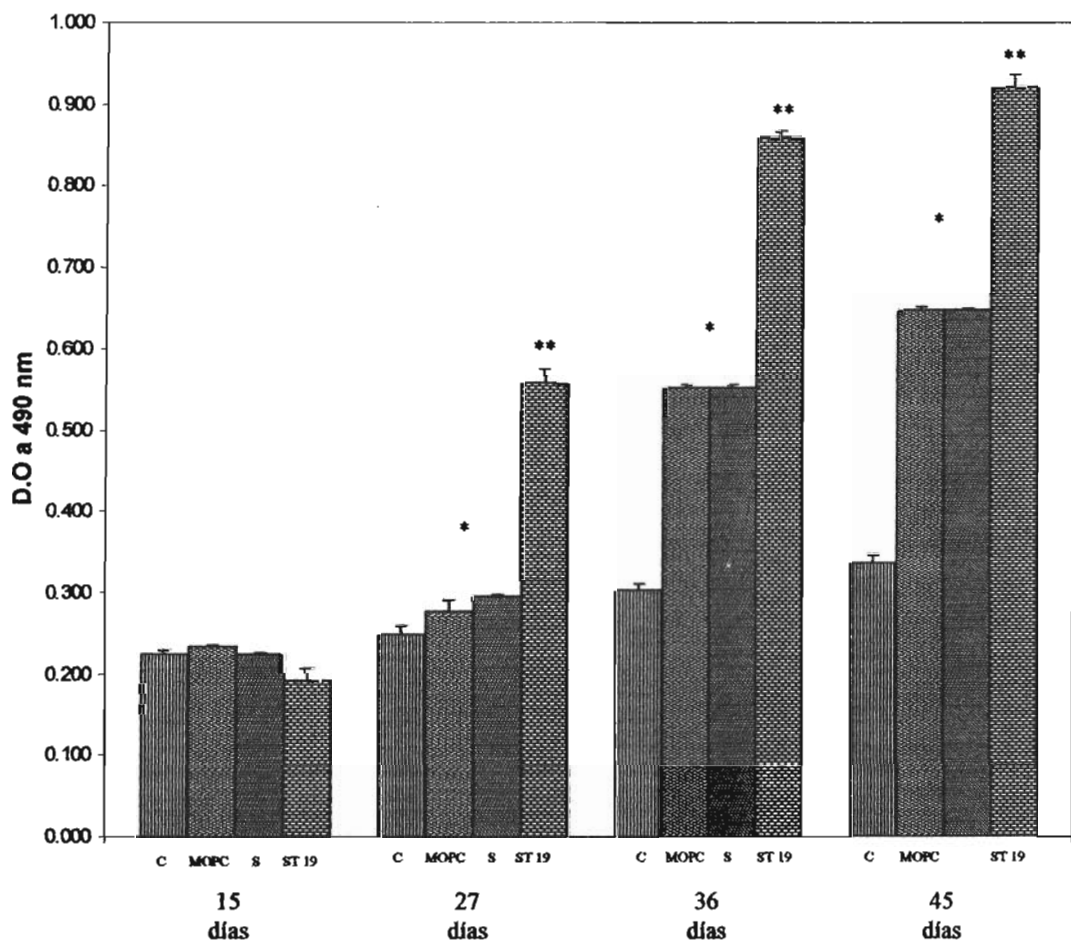
* *S. typhi*, *S. typhi* + MOPC vs Control $p < 0.05$

** *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi* $p < 0.05$

(C= Control, MOPC= *S. typhi* + MOPC, S= *S. typhi*, ST 19= *S. typhi* + ST 19)

En la Figura 5 se observa que los niveles de anticuerpos IgA de los ratones inmunizados con la bacteria opsonizada con una concentración 10 μ g/ratón del anticuerpo ST 19, están aumentados significativamente comparados con los obtenidos en los ratones inmunizados con la bacteria sola. Este incremento en los niveles de anticuerpos IgA fue observado tanto en la respuesta primaria como en la secundaria.

Fig.5 Anticuerpos séricos IgA anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c convencionales



* *S. typhi* vs Control $p < 0.05$

** *S. typhi* + ST 19 vs *S. typhi* $p < 0.05$

(C= Control, MOPC= *S. typhi* + MOPC, S= *S. typhi*, ST 19= *S. typhi* + ST 19)

La determinación de los anticuerpos de subclase IgG1 e IgG2a se realizaron a los 45 días y se muestran en la tabla VII. Se puede observar que hay una mayor concentración de anticuerpos de subclase IgG2a que de la subclase IgG1, cuando se administró la bacteria sola. Sin embargo, cuando se administró la bacteria opsonizada con el anticuerpo ST 19 la relación de anticuerpos IgG2a/IgG1 es mucho menor. No se detectaron anticuerpos específicos anti-LPS en el grupo control.

TABLA VII. Anticuerpos séricos IgG1 e IgG2a anti-LPS de *Salmonella typhi* en ratones Balb/c convencionales

	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	IgG2a ($\mu\text{g/mL}$)	IgG2a/IgG1
Control	-	-	-
<i>S. typhi</i>	25.7 \pm 20.7	261 \pm 29	5.4 \pm 0.4
<i>S. typhi</i> + ST19 (10 μg /ratón)	74.5 \pm 0.5 ^a	98 \pm 2 ^a	1.31 \pm 0.03 ^a

a *S. typhi* + ST 19 (10 μg /ratón) vs *S. typhi* $p < 0.05$

DISCUSIÓN

Varias cepas atenuadas de *Salmonella typhi* son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular a nivel sistémico, así como respuesta inmune a nivel de mucosas cuando se administran por vía oral. Estas características las hacen atractivas para ser utilizadas como acarreadoras de genes de otros microorganismos patógenos para la obtención de vacunas multivalentes. Sin embargo existen dudas importantes acerca de la utilización de vacunas por vía oral. Uno de estos aspectos es si la existencia de anticuerpos secretores de reacción cruzada contra componentes de la bacteria acarreadora pueden afectar la inmunogenicidad de dichas vacunas.

En el presente trabajo se utilizó medio Luria 0.3M de NaCl ya que ha sido reportado por varios autores que la osmolaridad de este medio 676 mosmol es la misma que la encontrada en el fleo distal y varios autores ^{3, 44, 75} han demostrado que *Salmonella typhi* crecida en este medio expresa un fenotipo altamente invasivo: Disminución de la expresión de antígeno Vi, aumento en la expresión de las proteínas codificadas en la Isla de Patogenicidad 1 (SPI-1), las cuales están involucradas en el mecanismo de invasión de *Salmonella typhi* a mucosa intestinal. Los resultados encontrados muestran que el anticuerpo monoclonal anti-lípido A ST 19 es capaz de unirse eficientemente a bacterias viables crecidas en este medio de cultivo.

Los estudios de invasividad realizados en los segmentos ligados de intestino delgado demostraron que el anticuerpo ST 19 puede afectar considerablemente la invasividad de *Salmonella typhi* a la mucosa intestinal murina y el efecto fue dependiente de la concentración de anticuerpo utilizada. Una alta concentración del anticuerpo ST 19 fue capaz de inhibir la invasividad de la bacteria, probablemente por un mecanismo de impedimento estérico, ya que el anticuerpo ST 19 no reconoce directamente las adhesinas descritas para *Salmonella typhi*: Pili tipo IV y core externo

del LPS ^{66, 81}. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores: Iankov, I.D. y col ³⁴ reportaron que anticuerpos monoclonales específicos para el epítotope O:9 de *Salmonella* son capaces de inhibir la adherencia e invasividad de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a células HEp-2, el efecto no es mediado por la unión directa de los anticuerpos a adhesinas bacterianas y probablemente se debe a un mecanismo indirecto por interferencia con las adhesinas bacterianas mediado por impedimento estérico. Michetti P. y col ⁵⁷ encontraron que anticuerpos monoclonales IgA dirigidos contra el LPS de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium son capaces de proteger a ratones contra la infección por vía oral con la bacteria, probablemente por un mecanismo de exclusión inmune. Concentraciones mas bajas del anticuerpo ST 19 aumentaron significativamente la invasividad de la bacteria a mucosa intestinal murina. El aumento en la invasividad de la bacteria podria estar mediado por los receptores para IgA presentes en la superficie apical de las células M de la mucosa intestinal murina. Se ha demostrado que estos receptores son capaces de unir selectivamente IgA con o sin componente secretor y no unen anticuerpos de clase IgG o IgM. Se ha encontrado que tanto la IgA de calostro como de suero humano se adhieren a las células M de placas de Peyer de ratón. Utilizando las subclases de IgA humanas se encontró que el receptor de IgA en las células M requiere los dominios C α 1 y C α 2 de la IgA para su unión, lo cual diferencia este receptor de otros reportados previamente ⁵⁰.

Es interesante mencionar que se ha observado que las células M del fíleo humano están recubiertas de IgAs, lo cual sugiere que las células M humanas, como las de los ratones, puedan expresar un receptor específico sobre su superficie apical, capaces de mediar la transición de IgA secretora y complejos de IgAs – antígeno ⁵⁰.

Se encontraron diferencias muy marcadas en los niveles de anticuerpos producidos por los ratones Balb/c convencionales y los libres de patógenos. Los ratones libres de patógenos produjeron niveles muy bajos de anticuerpos cuando se inmunizaron con *Salmonella typhi*. Se han reportado que cepas atenuadas de *Salmonella typhi* administradas a ratones por vía intragástrica (i.g.) son pobremente inmunogénicas; sin embargo, estas mismas cepas administradas por vía intranasal (i.n.) son capaces de inducir altos títulos de anticuerpos. En estos estudios se encontró también que después de la inmunización intranasal se pueden aislar mayor cantidad de las bacterias inoculadas, de placas de Peyer, tejido linfoide asociado a mucosa nasal y pulmones que los mismos tejidos obtenidos de los ratones inmunizados por vía i.g, lo cual podría explicar en parte la mayor inmunogenicidad de la bacteria administrada por vía i.n. También se encontró que aunque la bacteria no se pudo aislar de órganos linfoides sistémicos (Nódulos linfáticos, sangre, bazo) se indujeron altos títulos de anticuerpos IgG específicos a nivel sérico ⁶⁴.

Existen datos contradictorios acerca de las características de las cepas atenuadas de *Salmonella* necesarias para inducir una buena respuesta inmunológica cuando se administran a nivel de mucosas. Algunos autores sugieren que se requiere una buena colonización a nivel del GALT para ello ^{17, 74}, mientras que otros autores sugieren que la viabilidad y persistencia de *Salmonella* no es necesaria y que el punto crítico es la cantidad inicial de antígenos que estimulen el tejido linfoide asociado a mucosas y no la persistencia de la cepa ¹².

Salmonella typhi utiliza como receptor en las células epiteliales intestinales el CFRT, el cual normalmente se puede detectar en vesículas subapicales de las células y productos de *Salmonella typhi* causan una redistribución de éste a la superficie celular, el aumento de la expresión de éste receptor en membrana se correlaciona con un

aumento en la invasividad de *Salmonella typhi* a la célula epitelial. Algunas bacterias comensales de la flora intestinal normal son también capaces de inducir la redistribución del receptor ^{46,47}. Lo que sugiere que la composición de la flora intestinal normal puede afectar la eficacia de invasión de *Salmonella typhi* a la mucosa intestinal. Ya que la composición de la flora intestinal de los ratones libres de patógeno y los ratones convencionales es diferente, esto podría explicar en parte la diferencia en la inmunogenicidad de la bacteria cuando se administra por vía intragástrica a éstos ratones.

Tanto en los ratones Balb/c convencionales como en los libres de patógenos encontramos un aumento en la inmunogenicidad de la bacteria cuando se administró con el anticuerpo ST 19 anti-lípido A. Esto podría deberse a que un mayor número de bacterias sean capaces de invadir la mucosa intestinal mediado por la unión de la bacteria recubierta con los anticuerpos IgA y la interacción de éstos con los receptores de IgA que se han detectado en la superficie apical de las células M del epitelio intestinal ⁵⁰. Recientemente se encontró que la IgA secretora que se une al receptor de las células M en la superficie apical, es transportada a la submucosa se asocia y es internalizada por las células dendríticas presentes en la región del domo subepitelial de las placas de Peyer y se pueden encontrar también asociadas a la superficie de linfocitos TCD4. Corthésy B. y col ¹⁴ encontraron que la administración oral de IgA secretora de conejo a ratones Balb/c indujo la producción de anticuerpos contra la pieza secretora lo cual los hizo pensar que la pieza secretora de la IgA podría servir como un vector para transportar epítopes al tejido linfoide de las mucosas. Estos autores insertaron un epítope de la invasina B de *Shigella flexneri* a la pieza secretora de la IgA de ratones y la administraron por vía oral y encontraron que se indujo producción de anticuerpos contra la invasina B tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas por lo que

sugieren que la IgA secretora puede funcionar eficientemente como un vehículo para presentar antígenos a nivel de mucosas. El aumento en la inmunogenicidad de la bacteria cuando se administró con el anticuerpo ST 19 podría deberse a una mayor invasividad de la bacteria también “en vivo” como se observó “in vitro” lo cual permitiría que mayor cantidad de antígenos se pongan en contacto con las células del sistema inmune. Otra posibilidad es que los antígenos de la bacteria sean mejor procesados y presentados por las células dendríticas. Se ha demostrado que *Salmonella typhimurium* interfiere con la función de las células dendríticas inhibiendo la degradación lisosomal y la presentación de antígenos asociados a moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los linfocitos T⁷⁶. Sin embargo, cuando la bacteria se opsoniza con anticuerpos IgG, los cuales interaccionan con los receptores FcγR en la superficie de las células dendríticas, los antígenos bacterianos son eficientemente procesados y presentados en las moléculas de clase I y II del CMH, sin embargo, este mecanismo no ha sido estudiado con anticuerpos IgA. Aunque nosotros no encontramos una inhibición en la inmunogenicidad de la bacteria incubada con el anticuerpo ST 19, esto podría deberse a que se requiere una concentración mayor del anticuerpo para poder observar este efecto.

La inmunización de ratones por vía oral con diferentes cepas de *Salmonella* induce preferentemente una respuesta inmune tipo Th1²⁸, en el caso del humano se ha visto que algunos individuos inmunizados con la vacuna oral Ty21a producen citocinas tipo Th1 y otros tipo Th2⁸⁰. En el ratón se ha observado que la producción de citocinas tipo Th1 induce preferentemente anticuerpos de subclase IgG2a, mientras que las citocinas tipo Th2 inducen preferentemente anticuerpos de la subclase IgG1. Se sabe que el LPS de *Salmonella* induce la producción de citocinas pro-inflamatorias que favorecen la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 con la producción

predominante de anticuerpos de subclase IgG2a²⁸. Ya que el anticuerpo que utilizamos en este estudio está dirigido contra el lípido A y éste está involucrado en la inducción de citocinas pro-inflamatorias era importante determinar si la administración de la bacteria opsonizada producía un cambio no solo cuantitativo sino cualitativo en la respuesta inmune humoral. Los resultados mostraron que la inmunización con *Salmonella typhi*, produce como ha sido reportado por otros autores mayores niveles de anticuerpos IgG2a, mientras que en los animales inmunizados con la bacteria opsonizada la proporción de anticuerpos IgG2a /IgG1 disminuye, esto podría deberse a la menor producción de citocinas pro-inflamatorias ya que nuestro anticuerpo se une al lípido A, igualmente se favoreció la producción de anticuerpos de isotipo IgA tanto a nivel sérico como a nivel de mucosas.

Existen resultados contradictorios acerca de si la presencia de anticuerpos IgA secretores puede afectar la inmunogenicidad de vacunas administradas por vía oral. Forrest B.D. y col²⁵ encontraron que en individuos que viven en una zona no endémica para *Salmonella typhi* existe una correlación inversa entre los títulos de anticuerpos anti-LPS detectados en fluido intestinal (pre-vacunación) y los títulos obtenidos después de la inmunización con la vacuna Ty21a. Esta correlación dejó de observarse cuando se utilizaron mayor cantidad de bacterias (10^{11}) para la inmunización. Por el contrario Ferguson y col²¹ reportaron que una buena producción de anticuerpos secretores IgA anti-LPS solo fue evidente en individuos vacunados con Ty21a que tenían niveles intermedios de anticuerpos IgA secretores. Kollaritsch y col.⁴⁹ sugieren que la inmunidad local puede interferir con la colonización del intestino de la cepa vacunal ya que después de la inmunización primaria ellos detectan una tasa de seroconversión del 62% mientras que a los 2.5 años es de 47% y a los 3.5 años es de 46% a nivel sérico, mientras que la seroconversión a nivel de mucosas es de 70% después de la

inmunización primaria y de 47% a los 2.5 años y 63% a los 3.5 años, resultados similares han sido encontrados por otros autores ⁸⁰.

Existen también resultados contradictorios utilizando el modelo del ratón inmunizado con diferentes cepas de *Salmonella*. Se han utilizado distintas cepas de *Salmonella* que expresan antígenos recombinantes para estudiar el efecto de la inmunidad pre-existente sobre la respuesta inmune tanto a la *Salmonella* utilizada como al antígeno recombinante. Algunos autores han encontrado que la inmunización primaria con *Salmonella enterica* serovar Dublin potencia la respuesta de anticuerpos tanto a la bacteria como al antígeno expresado después de un refuerzo con la *Salmonella* recombinante ⁷⁹. En contraste, la inmunidad pre-existente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium tiene un efecto negativo en la respuesta inmune a un antígeno bacteriano en ratones inmunizados por la vía oral con *Salmonella* expresando el antígeno ³⁶. Estudios más recientes han demostrado que el impacto de la inmunidad pre-existente puede ser variable y depende tanto de la cepa de *Salmonella* utilizada como vector así como de la naturaleza del antígeno extraño expresado. Vindurampullet C. J. y col ⁷⁹ utilizaron cepas atenuadas *Salmonella enterica* serovar Stanley y de *Salmonella enterica* serovar Dublin y estas mismas cepas expresando dos diferentes antígenos: Pili K88 o la subunidad B de la toxina lábil de *Escherichia coli* (LT-B) y analizaron el efecto de la inmunización con el vector sobre la respuesta inmune después de un refuerzo con la cepa recombinante. Cuando se utilizó la cepa de serovar Stanley como vector se encontró que la respuesta de anticuerpos séricos IgG y anticuerpos intestinales IgA al Pili K88 no fue detectable y a la subunidad LT-B disminuyó significativamente cuando se dio el refuerzo con las cepas recombinantes que expresaban dichos antígenos, sin embargo, la respuesta al LPS de serovar Stanley no se vio disminuida. Cuando realizaron un experimento similar con serovar Dublin como vector la respuesta al

Pili K88 se redujo considerablemente pero no a LT-B. Paradójicamente la inmunización primaria con este vector indujo una respuesta de anticuerpos anti-LPS más elevada y sin embargo no hubo supresión al antígeno LT-B y la respuesta anti-LPS aumentó significativamente tanto a nivel sérico como intestinal.

Los resultados del presente trabajo muestran que un anticuerpo de reacción cruzada IgA puede alterar significativamente la inmunogenicidad de *Salmonella typhi* cuando se administra por vía oral. Los mecanismos involucrados podrían ser diversos y sería interesante estudiarlos. Estos resultados apoyan el que la respuesta inmune a vacunas que utilizan bacterias atenuadas administradas por vía oral en zonas endémicas podrían dar resultados muy variables.

CONCLUSIONES

- *Salmonella typhi* es capaz de inducir una buena respuesta inmune tanto a nivel local como sistémico en animales Balb/c convencionales pero no en los ratones libres de patógenos.

- El anticuerpo monoclonal ST 19 es capaz de inhibir o aumentar la invasividad de *Salmonella typhi* a mucosa intestinal murina en estudios realizados “in vitro”.

- El anticuerpo monoclonal ST 19 aumenta considerablemente la inmunogenicidad de *Salmonella typhi* administrada por vía intragástrica.

REFERENCIAS

- 1) Acharya, I L., Lowe, C. U., Thapa, R. & 10 other authors (1987). Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. N Engl J Med 317, 1101 -1104.
- 2) Alfaro G. 1977 Related R plamid in *Salmonella typhi* strains isolated in México city from clinical samples Rev.Lat. amer Microbiol 14:209-215.
- 3) Arricau Nathalie, D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey, and M. Y. Popoff, The RcsB – RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity, Molcular Microbiology, (1998) 29(3), 835- 850.
- 4) Bajaj, V., Hwang, C., and Lee, C.A. (1995) hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. Mol Microbiol 18: 715-727.
- 5) Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., and Lee, C.A. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. Mol Microbiol 22: 703-714
- 6) Benyacoub Jalil, Sally Hopkins, Alexandra Potts, Sandra Kelly, J. P. Kraehenbuehi, R. Curtis III, P. Grand, and D. Haefliger. The nature of the expressing human papillomavirus type 16 virus-like particles response in nasally immunized mice. Infect. Immun 1999. 67: 3674 – 3679
- 7) Berlin C., et al $\alpha_4\beta_7$ integrin mediates lymphocyte binding the mucosal vascular addressin MadCAM – 1. Cell: 74; 185 –195.
- 8) Blaser M. J., Newman L. A review of human salmonellosis infective dose. Rev. Infec. Dis 1982; 4: 1096 – 1106.
- 9) Brenner F. W., Villar R. G., Angulo F. J., Tauxer, Swaminthan B. *Salmonella* nomenclature. J. Clin Microbiol 2000. 38: 2465 – 2467.
- 10) Butcher, E.C., Williams M., Youngman K., Rott L., & Briskind M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. Adv Immunol. 1999; 72: 209 – 253.
- 11) Cao Y, Wen Z., Lu D. Construction of a recombinant oral vaccine against *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 1992; 6: 2823 – 2827.
- 12) Cardenas I. V. Dasgupta, and J. D. Clements. 1994. Influence of Strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carriers. Vaccine 12:833 – 840.
- 13) Collins, F. M. (1974). Vaccines and cell-mediated immunity. Bacteriol Rev 38, 371-402

- 14) Corthésy Blaise, M. Kaufman, A. Phalipon, M. Peitsch, M. R. Neutra, and J. P. Kraehenbuhl, A Phatogen – specific Epitope Insetred into Recombinant Secretary Immunoglobulin a is immunogenic by the Oral Route, The Journal of Biology Chemistry, Vol. 271, No 52, pp. 33670 – 33677, 1996.
- 15) Dirección General de Epidemiología. www.dgepi.salud.gob.mx
- 16) Dirita, V. J. and J. J. Mekalanos. 1989. Genetic regulation of bacterial virulence. *Annu. Ren Genetic.* 23:455 – 482.
- 17) Dunstan, S.j., C. P. Simmons, and R.A Strogneil, 1998. Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strain to elicit humoral immune response against a heterologus antigen. *Infec. Immun.* 66: 732 – 740.
- 18) Edelman R, Levine MM, summary of a international workshop on typhoid fever. *Rev infect Dis*, 1986; 8: 329 – 349.
- 19) Elson C.O. Caldin W., Lefkowitz J. 1984. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretion. *J. Immunol. Methods.* 67: 101 – 108.
- 20) Fagarasan Sidonia and Tatsuku Honjo. Intestinal IgA sintesis: regulation of front – line body defence. *Rev Nature* 2003; 3: 63 – 72.
- 21) Ferguson and J. Sallam, *Lancet* 339: 179 (1192).
- 22) Fernandez M. I. Pedron T., Tourbebeze R., Sansonetti P. J., and Phalipon A. Anti-inflammatory role for intracellular Dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity.* 2003; 18: 739 – 749.
- 23) Finlay, B. B., J. Fry, E.P Rock, and S. Falkow. 1989. Passage of *Salmonella* through polarized epithelial cells: role of the host and bacterium. *J. Cell Sci.Supp* 11:99-107.
- 24) Finlay, B. B., F. Hefferson, and S. Falkow. 1989. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 243:940-943
- 25) Forrester D. B. Impairment of immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a due pre – existing. Cross – reactin intestinal antibodies.
- 26) Foster G. W., Hall H. K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 771 – 778.
- 27) Francis, C. L., M. N. Starnbach, and S. Falkow. 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* 6:3077-3087.

- 28) Galdiero M., Martino L., Marcatili A., Nuzzo I., Vitiello M. Th1 and Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella typhimurium* porins. *Immunology*. 1998; 94: 5–13.
- 29) Gorden J., Small PL. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 1993; 61:364-367.
- 30) Hackett J. Et al. The colonization of Peyer's Patches by strain of *Salmonella typhimurium* cured of the cryptic plasmid. *J. Infect Dis.* 1986; 153:1119 – 1125.
- 31) Hirose, K., To, M, Kawamura, Yokoyama, and Takami. 1997. Survival of Vi capsulated and Vi-deleted *Salmonella typhi* strain in cultured macrophage expressing different levels of CD 14 antigen. *FEMS. Microbiol. Lett.* 147:259-265.
- 32) Hornick R.B., Greisman S.E., Woodward T.E., DuPont H.L., Dawkins A.T., Snyder M.J., Typhoid fever, pathogenesis and immunologic control, *N. Engl. J. Med.*; 283: (1970) 686-691.
- 33) Huimin Yan, Lamm M. E. Bj[or]ling E. and Huang Y. T. Multiple functions of immunoglobulin A in Mucosal Defense against Viruses: an In vitro Measles virus model. *J Virol.* 2002; 76 (21): 10972 – 10979.
- 34) Ianko D. Iankov, Petrov D. P., Mladenov I. V., Haralambieva I., Mitov I. Lipopolysaccharide – specific but not anti – flagellar immunoglobulin A monoclonal Antibodies Prevent *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis invasion and replication within Hep-2 cell monolayers.
- 35) Janeway Jr Charles A- Travers P., Walport M., Shlomchik M.J.; *Immunobiology. The immune system in health and disease.* USA. Ed Garland Science 2005.
- 36) Jespersgaard C., Zhang P., Hajishengallis G., Russel M. W. and Michalek S. M. Effect of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing *Streptococcus mutans* antigen on secondary response to cloned protein. *Infect. Immun.* 2001; 69 (11): 6604-6611.
- 37) Kerr, M. A. 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 271:285
- 38) Klugman K.P., Koornhof H.J., Robbins J.B. & Lecam N. 1996. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine.* 14: 435 – 438.
- 39) Kohbata S., Yokoyama H. Yabuuchi E. Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cell of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops, and ultrastructural study. *Microbiol Immunol.* 1986, 30: 1225 –1237.

- 40) Kollaritsch H., Cryz J., Lang A.B., Herzog C., Que J.U., Wiederman G. Local and systemic immune response to combined *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR and *Salmonella typhi* Ty21a live oral vaccines after primary immunization and reimmunization. *Vaccine*. 2000; 18: 3031-3039.
- 41) Kossaczka, ZL, Lin, F. Y., Ho, V. A. & 11 other authors (1999). Safety and Immunogenicity, of Vi conjugate vaccines for typhoid fever in adults, teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam. *Infect Immun* 67, 5806-5810.
- 42) Levine, M. M, Ferrecio, C., Black, R. E., Tacket, C.O.S, Germanler, R.(1989). Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev Infect Dis* 11(Suppl. 3), 8552-8567.
- 43) Levine M. M., Tacket C. O., M. B. Sztein, Host – *Salmonella* interaction: human trials, *Microbes and Infection*, 3, 2001, 1271 – 1279.
- 44) Licheng Zhao, T. Ezaki, Zhi-Yu Li, Y. Kawamura, K. Hirose and H. Watanabe. Vi-Suppressed Wild Strain *Salmonella typhi* Cultured in High Osmolarity Is Hyperinvasive toward Epithelial Cell and Destructive of Peyer's Patches, *Microbiol, Immunol.*, 45(2), 149-158, 2001.
- 45) Logra Pearay, Mucosal immunity: Some historical perspective on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines, *Immunology and Cell Biology* (2003) 81: 23 – 33.
- 46) Lyczak J.B. Commensal bacteria increase invasion of intestinal epithelium by *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect. Immun.* 2003; 71 (11): 6610 – 6614.
- 47) Lyczak Jeffrey and G. B. Pier, *Salmonella enterica* Serovar Typhi Modulates Cell Surface Expression of Its Receptor, the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, on the Intestinal Epithelium, *Infection and Immunity*, 2002, Vol.70 No.11: 6416-6423.
- 48) Macpherson J. A., and Uhr T., Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 2004; 3003: 1662 – 1665.
- 49) Mandell Gerald, Benett J., Dolin R. *Enfermedades Infecciosas Principios y práctica* Vol. 2 Cap. 210; 2846 – 2865 Ed panamericana 2002
- 50) Mantis Nicholas J., M. C. Cheung, K. R. Chintalacheruvu, J. Rey, B. Corthésy, and M. R. Neutra, Selective Adherence of IgA to Murine Peyer's Patches M Cell: Evidence for a Novel IgA Receptor, *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 1844 – 1851.
- 51) Mastroeni P., Chabalgoity JA., Dunstand SJ., Maskell DJ., Dougan G. *Salmonella*: immune response and vaccines. *Vet J* 2001; 161: 132 – 164.
- 52) Mastroeni P. and Menage N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *Rev. J. Med Microbiol.* 2003; 52: 453 – 459.

- 53) Mastroeni P., Villareal-Ramos B., Hormaeche C.E. Role of T cells, TNF - α and INF γ in recall of immunity to oral challenge with live attenuated aro *Salmonella* vaccines. *Microb Pathog* 1992; 13: 477 – 491.
- 54) Mazanec M. B, Coudret C. L and Fletcher D. R. 1995. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J. Virol.* 69:1339 – 1343.
- 55) McClelland, M, Sandalson, K. E, Spieth, J. & 23 other authors (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852 - 856.
- 56) Mekalanos, J.J. 1992 Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1-7.
- 57) Michetti Pierre, Mahan MJ., Slauch J., Mekalanos J.J., Neutra M R. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1992;60(5): 1786 – 1792.
- 58) Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. (1989) A two-component regulatory system [*phoP phoQ*] controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5054-5058.
- 59) Miras, I., Hermant, D., Arricau, N., and Popoff, M.Y. (1995) Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhi. *Res Microbiol* 146: 17-20.
- 60) Mowat A. McI . Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Rev. Nature.* 2003; 3: 331 – 340.
- 61) Navarre WW., Zychilinsky A. Pathogen induced apoptosis of macrophages: a common and for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* 2000; 2:265 – 273.
- 62) Padilla M.A, M.E. Zaragoza, C. Riebeling, C. Ximénez, E.I. Melendro. La capacidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-lípido A a bacterias Gram negativas es afectada por condiciones ambientales. XV Congreso Nacional de Inmunología. Ixtapa Zihuatanejo, México del 28 de Abril al 1º de Mayo del 2002.
- 63) Paseti Marcela F., M. M Levine, M. B. Sztein, Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors, *Vaccine* 21 (2003) 401 – 418.
- 64) Paseti M.F., Pickett T.E., Levine M.M, Sztein M.B., A comparison of immunogenicity and in vivo distribution of *Salmonella enterica* serovar Typhi and Typhimurium live vector vaccines delivered by mucosal routes in the murine model. *Vaccine.* 2000; 18: 3208 – 3213.

- 65) Pickard, D., Li, J., Roberts, M., Maskell, D., Hone, D., Levine, M., *et al.* (1994) Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect Immun* 62: 3984-3993.
- 66) Pier, G. B., M. Grout, T. Zaidi, G. Meluleni, S. S. Mueschenborn, G. Banting, R. Radcliff, M. J. Evans and W. H. Colledge. 1998. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82.
- 67) Potter M. Immunoglobulin – producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev.* 1972 52 (3) 631–719
- 68) Rosenberg CM., Scott MG., Gold MR., *et al.* *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophages gene expression. *J. Immunol* 2000; 164: 5864 – 5904.
- 69) Roy. M. J., and M. Varvayanis. 1987. Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: association of IgA with M cells. *Cell Tissue Res.* 248:645
- 70) Shiemann, D. A., and S. R. Shope. 1991. Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henic 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 59:437-441.
- 71) Stein M.B., Wasserman S.S., Tacket C.O., Edelman R., Hone D., Lindberg A.A. & Levine M.M. (1994). Cytokine production patterns and lymphoproliferative response in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strain of *Salmonella typhi*. *J infect. Dis.* 170: 1508 – 1517.
- 72) Stevens T.L., A. Bossie, M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R.L. Coffman, T.R. Mosmann and E.S. Vitetta. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cell. *Nature*; 334: 255-258.
- 73) Sukhan A, The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium*: common and unique features. *Cell Mol life Sci* 2000; 57: 1033-1049.
- 74) Tacket, C. O., S. M. Kelly, F. Schödel, G. Losonsky, J. P. Nataro, R. edelman, M. M. Levine, and R. Curtiss III. 1997. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd Balance lethal vector system. *Infect. Immun.* 65: 3381 – 3385.
- 75) Tartera Carmen and Eleanor S. Metcalf, Osmolarity and Growth Phase Overlap in regulation of *Salmonella typhi* Adherence to and Invasion of Human Intestinal Cell, *Infection and Immunology*, 1993; 61 (7): 3084-3089.

- 76) Tobar J.A., González P.A. and Kalergis A.M. *Salmonella* escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fcγ receptors on dendritic cells. *J. Immunol.* 2004; 173: 4058 – 4065.
- 77) Underdown, B. J., and J. M. Schiff. 1986. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* 4:389.
- 78) Uren Tania, Wijburg O. D., Simmons C., Johansen F. E., Brandtzaeg P. and Strugnell R. A. Vaccine – induced protection against gastrointestinal bacterial infections in the absence of secretory antibodies. *Eur J. Immunol.* 2005; 35: 180 –188.
- 79) Vindurampullet C. J. and Attridge S. R. Impact of vector priming on the immunogenicity of recombinant *Salmonella* vaccines. *Infect. Immun.* 2003. 71(1): 287-297.
- 80) Viret J.F., Favre D., Wegmüller B., Herzog C., Stanley J.U., Cryz J. and Lang Alois. Mucosal and systemic response in human after primary and booster immunization with orally administered invasive and noninvasive live attenuated bacteria. *Infect. Immun.* 1999; 67(7): 3680- 3685.
- 81) Xiao – Liang Zhang, Inez S. M., Cecilia M. C., Ada W. Y., Danny K. Wong, Xiaoyun Dai, Yanhua Yang, Jim Hackett and Chistina Morris. *Salmonella enterica* serovar Typhi uses Type IVB Pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 2000; 68: 3067 – 3073.