

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LOS EFECTOS MODULADORES DE
LOS REGULONES *phoP-phoQ* y *pmrA-pmrB* de
Salmonella enterica serovar Typhimurium
SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
CONTRA LA BACTERIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CHRISTIAN IVÁN PÉREZ SHIBAYAMA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente: Profr. Rodolfo Pastelin Palacios.

Vocal: Profr. Jorge Fernando Paniagua Solis.

Secretario: Profr. Alejandro Camacho Cruz.

1er. Suplente: Profr. Norma Angélica Castellanos Chavez.

2o. Suplente: Profr. Armando Isibasi Araujo.

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Investigación en Inmunología del departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en colaboración con la unidad de Investigación en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Dr. Rodolfo Pastelin Palacios

ASESOR

Dr. Constantino III Roberto López Macías

SUPERVISOR TÉCNICO

Christian Iván Pérez Shibayama.

SUSTENTANTE.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Constantino López por su confianza, apoyo, consejos y crítica profunda del presente trabajo.

Al Dr. Rodolfo Pastelin por brindarme su confianza, apoyo y sobre todo ser la persona que me enseñó el camino de la investigación.

A mis compañeros de la Unidad Médica de Investigación en Inmunoquímica por permitirme formar parte de ese fabuloso equipo de trabajo y su apoyo en la realización del presente trabajo.

Al departamento de Biología de la facultad de Química de la UNAM por permitirme llevar a cabo la realización del presente trabajo.

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

El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 43911-m, el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyectos IN224907 y IN214302, el fondo para el fomento de la investigación en salud del IMSS proyecto 2005/1/1/039 y el programa cátedras de la facultad de Química de la UNAM.

Agradecemos al colegio de profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la sección 024 de la Asociación Autónoma del Personal Académico de la UNAM por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis a través de la cátedra “Raúl Cetina Rosado”.

2007-1

DEDICATORIAS.

A mis padres, porque desde pequeño han sido para mi las personas mas maravillosas, ejemplares, cariñosas, responsables, estrictas, admirables, y mucho mas. Gracias por guiar mi vida, gracias por ser los mejores padres. Los amo demasiado.

A mis hermanos Emmanuel y Alan por que a su lado siempre he encontrado el apoyo, la felicidad, la compañía y la fuerza para poder seguir. Los quiero mucho hermanos, son los mejores.

A toda mi familia por su apoyo, cariño y consejos brindados. Son parte muy importante en mi vida.

Al Dr. Armando Isibasi, Dr. Constantino López y El Dr. Rodolfo Pastelin por que desde que los conocí se convirtieron en pilares muy importantes en mi formación como profesionista e investigador. Gracias por todo Doctores.

ÍNDICE.

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
2. RESUMEN.....	10
3. INTRODUCCIÓN.....	11
4. ANTECEDENTES.....	13
4.1 EL GÉNERO Salmonella.....	13
4.1.1 Salmonella entérica serovar Typhimurium.....	14
4.1.2 INFECCIÓN Y MECANISMOS DE VIRULENCIA DE Salmonella typhimurium.....	14
4.2 RESPUESTA INMUNE FRENTE A Salmonella.....	16
4.2.1 INMUNIDAD INNATA.....	16
4.2.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES.....	18
4.2.3 CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA.....	20
4.2.4 INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	24
4.2.5 ANTICUERPOS Y SU FUCIÓN.....	26
4.2.6 OPSONIZACIÓN.....	27
4.3 EL LPS UN PAMP MUY IMPORTANTE EN BACTERIAS GRAM (-).....	28
4.3.1 RECONOCIMIENTO DEL LPS.....	30
4.4 SISTEMAS REGULADORES DE DOS COMPONENTES.....	32
4.4.1 MODIFICACIONES ESTRUCTURALES AL LPS DE S. typhimurium.....	33
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
6. HIPÓTESIS.....	37
7. OBJETIVO GENERAL.....	37
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
8.1 CEPAS BACTERIANAS.....	38
8.2 LÍNEA CELULAR.....	38
8.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS LPS MODIFICADOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE A LA BACTERIA.....	38

8.4 DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS POR ELISA.....	40
8.6 ENSAYOS OPSONOFAGOCÍTICOS.....	41
9. RESULTADOS.....	42
9.1 EL EFECTO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES AL LPS DE S. typhimurium INDUCEN UNA DISMINUCIÓN EN LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS FRENTE A LA BACTERIA.....	42
9.2 Caracterización de línea celular J774 A.1 a través de la expresión de CD14.....	45
9.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) EN LA BACTERIA S. typhimurium.....	45
9.4 LAS CEPAS DE S. typhimurium QUE EXPRESAN LOS LPS MODIFICADOS INDUCEN UN MENOR EFECTO OPSONOFAGOCÍTICO CONTRA LA BACTERIA.....	47
10. DISCUSIÓN.....	49
11. CONCLUSIÓN.....	54
12. ANEXO.....	54
13. BIBLIOGRAFÍA.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BCR	Receptor del Linfocito B
CAMPS	Péptidos Catiónicos Antimicrobianos
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
IFN-γ	Intereferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i. p.	Intraperitoneal
KDO	Ácido 3-desoxi-2-octulosóico
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolisácarido
LT	Ácidos Lipoteicoicos
OPD	Orto-fenilendiamina
PAMPS	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PG	Péptido Glicano
PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrón
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos

pH	Potencial de H ⁺
rpm	Revoluciones por minuto
SAC	Solución Amortiguadora de Carbonatos
SAC	Solución Amortiguadora de Citratos
SSI	Solución Salina Isotónica
SPF	Libre de Patógenos Específicos
TCR	Receptor de Linfocito T
TLRs	Receptores similares a Toll
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α

RESUMEN.

Durante la evolución los microorganismos han desarrollado estrategias mediante las cuales pueden detectar los ambientes hostiles presentes en el hospedero y responder ante éstos para favorecer su supervivencia. En el caso de *Salmonella typhimurium* se lleva a cabo, entre otros mecanismos, por sistemas reguladores de dos componentes, dentro de los cuales se encuentran los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB que entre otras cosas le permiten llevar a cabo modificaciones estructurales al lípido A de su lipopolisacárido (LPS). Se sabe que las diferencias en las estructuras de los LPS pueden activar de manera diferencial a la respuesta inmune innata y a su vez la inmunidad innata puede inducir y dirigir una respuesta inmune adaptativa por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de las modificaciones estructurales al lípido A del LPS dados por los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB de *S. typhimurium* sobre la respuesta de anticuerpos contra ésta, y se encontró que las cepas que presentan los LPS modificados por los sistemas reguladores induce una disminución en los títulos de anticuerpos comparados con la cepa silvestre además de disminuir la capacidad opsonofagocítica de éstos.

Esos datos indican que *S. typhimurium* ha desarrollado mecanismos importantes de supervivencia, como lo son los sistemas reguladores de dos componentes, de tal manera puede regular al sistema inmune y favorecer la infección.

INTRODUCCIÓN.

Muchas bacterias han evolucionado en una cercana asociación con hospederos eucariontes, con efectos que van desde el parasitismo invasivo hasta el mutualismo obligado. El principal mecanismo por el cual las bacterias patógenas Gram-negativas invaden células eucariontes involucra el empleo del sistema de secreción tipo III (TTSS) para liberar proteínas efectoras que favorecen la entrada a la célula del hospedero, tal es el caso de *Salmonella*¹. Sin embargo, no es el único mecanismo involucrado en la patogenicidad de esta bacteria.

Uno de los múltiples mecanismos de virulencia de *S. typhimurium* que se activa es la modificación del Lípido A del LPS. Algunas modificaciones estructurales del Lípido A del LPS le confieren a *Salmonella* resistencia a péptidos catiónicos, tales son los casos de la adición de 4-amino-arabinosa y la incorporación de un ácido graso adicional⁷⁴. Estas modificaciones son reguladas por un sistema de dos componentes PhoP/PhoQ que controla la transcripción de un grupo de aproximadamente 40 genes implicados en la síntesis de proteínas requeridas para la virulencia y supervivencia de *Salmonella* dentro de macrófagos^{94,96}. El sistema regulador PhoP/PhoQ juega un papel importante en la resistencia a efectores de la respuesta inmune innata, sin embargo, se ha visto que en cepas resistentes a polimixina B y a péptidos catiónicos es requerido un segundo sistema de dos componentes PmrA/PmrB el cual es activado por PhoP/PhoQ mediante la proteína PmrD en respuesta a bajas concentraciones de

magnesio. Aunque PmrA/PmrB puede ser activado independientemente de PhoP/PhoQ debido a condiciones ácidas o altas concentraciones de hierro^{35,74,96}.

Se ha reportado que las cepas de *S. typhimurium* PhoP^c inducen menor expresión de E-selectina en células endoteliales y de TNF- α en monocitos (ambos de humanos) comparados con las cepas PhoP⁻ y de tipo silvestre³⁵. Sin embargo, no se ha reportado el efecto que ejercen las modificaciones estructurales del lípido A de *S. typhimurium* de estas cepas sobre la respuesta de anticuerpos. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar los efectos de estas modificaciones estructurales en la respuesta de anticuerpos contra la bacteria para dos cepas modificadas genéticamente.

Las cepas de *S. typhimurium* JSG 430 tiene como característica ser PhoP constitutiva y PmrA deficiente (PhoP^c y PmrA⁻) lo cual induce la adición de ácido palmítico al lípido A. La cepa JSG 435, es PmrA constitutiva (PmrA^c) que tiene como consecuencia la adición de amino arabinosa en el lípido A. Finalmente se cuenta con la cepa JSG 210 que es de tipo silvestre.

ANTECEDENTES.

EL GÉNERO *Salmonella*.

La clasificación mas actual del género *Salmonella* está basada en la similitud de su material genético para lo cual queda dividido en dos especies *bongori* y *enterica*. Esta última especie se subdivide después en subespecies denominadas por un número romano. La subespecie I conserva aun los nombres anteriores para designar la subespecie así, el nombre de *S. typhimurium* es: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium¹¹

El género *Salmonella* entérica pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacilos Gram-negativos que infectan a humanos y animales⁶⁶.

Salmonella Serotipo Typhi causa fiebre tifoidea en humanos y *Salmonella* Serotipo Typhimurium causa una enfermedad parecida en el ratón, para ambas bacterias su virulencia está relacionada por su capacidad de sobrevivir después de la fagocitosis por macrófagos, entre otras cosas.⁷²

En ratones *S. typhimurium* se disemina sistémicamente vía circulación y la infección está caracterizada por cambios patológicos severos y alta carga bacteriana en tejidos como placas de Peyer, ganglios mesentéricos, bazo e hígado. Una distribución similar sistémica de bacteria en tejidos está reportada por pacientes con fiebre tifoidea¹⁰⁷

Estudios recientes sobre la patogénesis de *S. typhimurium* muestran que la bacteria transloca un número de proteínas efectoras del sistema de secreción tipo III incluyendo SipA, SopA, SopB, SopD, y SopE2 dentro de las células del

hospedero desencadenando una serie de reacciones que al final conducen a cuadros de diarrea en el humano.¹⁰⁷

Salmonella entérica serovar Typhimurium

S. typhimurium es un bacilo no esporulado, Gram-negativo, móvil, con flagelos peritricos mide dos a tres micras, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es lactosa y sacarosa negativos además de producir ácido sulfhídrico⁸⁴.

La bacteria tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno "H" o flagelar y el antígeno somático "O" que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica.

INFECCIÓN Y MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *Salmonella typhimurium*.

El exitoso establecimiento de infecciones por bacterias patógenas, requiere la adhesión a células del hospedero, colonización de tejidos, y en algunos casos invasión celular, seguido por multiplicación celular bacteriana diseminación hacia otros tejidos o persistencia.⁷⁶

Muchos de los genes de virulencia de *S. typhimurium* están agrupados dentro de las islas de patogenicidad-1 (SPI-1) y 2 (SPI-2), que codifican componentes del sistema de secreción tipo III (TTSS). El TTSS tiene una estructura parecida a una aguja y se encuentra localizada a través de la membrana interna y externa de la bacteria. A través de ésta aguja, *S. typhimurium* inyecta proteínas efectoras dentro de la célula del hospedero, donde interfiere con una gran variedad de procesos celulares. Los TTSS actúan en diferentes estadios

de la infección, ya sea extracelular o intracelular. La bacteria usa el TTSS codificado en SPI-1 en la fase intestinal o extracelular²² cuando el patógeno es ingerido a través de alimentos contaminados y tiene que penetrar uno de los primeros obstáculos: el epitelio intestinal, el cual invade y atraviesa a nivel de ileon y colon por varias vías. Utiliza vellosidades⁴⁴ o células M en las placas de Peyer^{46 47} como puerta de entrada, también puede ser captada en el lumen del intestino por células dendríticas⁸³ y puede inducir fagocitosis en enterocitos²⁰. Se ha visto que todas las células arriba mencionadas están involucradas en la penetración de la bacteria. ¿Cuál de estas rutas es la más importante? sigue siendo una incógnita.

S. typhimurium tiene la capacidad de detectar cambios en el medio ambiente y responder, expresando genes que le permitan sobrevivir a los microambientes presentes en las células del sistema inmune innato que son dañinos para ella, por ejemplo, *S. typhimurium* sobrevive al ambiente fagosomal por dilución de los compuestos tóxicos lisosomales o atenuación de los factores antimicrobianos, que incluyen la acidificación del fagosoma^{77,78}.

Por otra parte la bacteria ha desarrollado mecanismos para manipular células fagocíticas a través de SPI-1 en ésta. *S. typhimurium* puede inducir apoptosis³⁸ para escapar de células fagocíticas y silenciar la respuesta inmune, esto debido a la presencia de la proteína efectora SipB, que interactúa con la caspasa-1³⁸. La SPI-2 activada en la bacteria intracelular⁴⁵ junto con el sistema PhoP/PhoQ ayudan a la bacteria a sobrevivir y crecer dentro de las células del hospedero, lo cual es esencial para su posterior diseminación sistémica^{37,64,90,101}.

Recientemente se ha observado que las células dendríticas pueden ser vehículos de diseminación de *S. typhimurium*^{70,83}. Células dendríticas pero no macrófagos existen en gran cantidad en sitios de entrada para la bacteria como son las placas de Peyer⁵⁴ y se ha visto que son las primeras células de la inmunidad innata en internalizar a la bacteria⁴¹. La bacteria dentro de vacuolas de células dendríticas secreta proteínas efectoras codificadas en SPI-2⁴⁵, estos factores de virulencia afectan el destino de las vacuolas conteniendo a *Salmonella*. Vesículas conteniendo a cepas mutadas en SPI-2 han mostrado tener mayor cantidad de marcadores lisosomales y endosomas tardíos que la cepa silvestre, por lo que la bacteria usa SPI-2 para interferir con la maduración de endosomas que contienen a *S. typhimurium* dentro de fagolisosomas⁴⁵

Por otra parte se ha visto que *S. typhimurium* puede modificar las propiedades migratorias de fagocitos gastrointestinales promoviendo de esta manera su rápida diseminación, esto debido a la proteína efectora *srfH*, secretada por la bacteria mediante el TTSS. Se ha visto que esta proteína interactúa con la proteína TRIP6, involucrada en la regulación de la movilidad de la célula. Esto se demostró en un experimento con bacterias mutadas en *srfH*, encontrándose que *Salmonella* tipo silvestre llegó a torrente sanguíneo mucho más rápido que la cepa mutada¹⁰³.

Los mecanismos arriba mencionados son usados por la bacteria para favorecer la infección y por lo tanto su supervivencia, pero ¿cuáles son las barreras a las que se enfrenta *S. typhimurium* cuando ingresa al hospedero? A continuación se tocan algunos puntos importantes de la respuesta inmune y que contribuyen tanto a la detección como a la destrucción de *S. typhimurium*.

RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Salmonella*

INMUNIDAD INNATA.

El reconocimiento del hospedero a invasiones microbianas promueve una respuesta inflamatoria a través de secreción de componentes antimicrobianos y reclutamiento de células fagocíticas como son neutrófilos, células dendríticas y macrófagos. Estas respuestas iniciales a la presencia de patógenos es denominada inmunidad innata y no requiere de ninguna exposición previa a el patógeno en cuestión.⁶⁵.

La inmunidad innata es un sistema conservado a través de la evolución y es la primer línea de mecanismos de defensa para proteger al hospedero de patógenos microbianos invasores², a su vez el estudio de la inmunidad innata se ha dividido en dos partes: mecanismos humorales y celulares y que a su vez cada una de estas partes se divide en una rama aferente o sensora y una rama eferente o efectora⁷.

Recientemente los estudios de la inmunidad innata han tomado importancia, esto debido a que se ha demostrado que el tipo, calidad, cantidad y mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa dependen del tipo de respuesta inmune innata, que es activada por el reconocimiento de patógenos⁴⁰.

El sistema inmune innato en humanos usa una variedad de factores para destruir a *S. typhimurium* incluyendo productos tóxicos del estallido respiratorio, enzimas bacteriolíticas tales como la lisozima y la fosfolipasa A2; los componentes terminales del sistema del complemento y péptidos antimicrobianos que alteran la membrana citoplásmica de la bacteria⁷⁴. Los péptidos catiónicos antimicrobianos

(CAMPS) son un grupo abundante y diverso de moléculas que son producidas por diferentes tejidos y tipos celulares. Su composición de aminoácidos, anfipaticidad, carga catiónica y tamaño permiten a éstos insertarse en membranas para formar poros. Los CAMPS están divididos en subgrupos en base a su composición de aminoácidos y estructura¹².

RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES.

El ser humano tiene involucrado un sistema de reconocimiento de patógenos mediante el cual contribuye a la muerte de éstos. Dentro de este sistema de reconocimiento se encuentran una serie de receptores presentes en células de la inmunidad innata y que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), que son altamente conservados y esenciales para la supervivencia de microorganismos³, a este tipo de receptores los conocemos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). La respuesta inmune innata por lo tanto puede reconocer a los PAMPs presentes en los microorganismos a través de un número limitado de PRRs codificados en línea germinal.³

Dentro de los PAMPs se encuentran N-formil metionil péptidos que son típicos en las proteínas bacterianas, el LPS presente en bacterias Gram negativas, ácidos nucleicos como el RNA de doble cadena en los virus, ácidos lipoteicoicos presentes en bacterias Gram positivas y los oligosacáridos ricos en manosa que se encuentran en las glicoproteínas bacterianas⁴³.

Los PRRs se pueden expresar tanto en la superficie celular, en compartimentos intracelulares o pueden ser secretados al torrente sanguíneo.

Los PRRs intracelulares tienen la finalidad de reconocer patógenos intracelulares, como lo es *Salmonella*. Por mencionar algunos ejemplos tenemos a las proteínas de la familia de dominio de unión a oligonucleótidos 1 y 2 (NOD1 y NOD2) y se ha demostrado que participan en la detección de bacterias intracelulares Gram positivas y Gram negativas^{5,75}.

Por otra parte se encuentran los PRRs solubles y su función consiste en activar al complemento, opsonizar células para facilitar la fagocitosis y en algunos casos funcionan como proteínas accesorias para el reconocimiento de PAMPs por receptores transmembranales, este tipo de receptores son de gran importancia para el reconocimiento y destrucción de *Salmonella*.

Un mecanismo de gran importancia para poder eliminar a la bacteria es a través de los PRRs solubles dentro de los cuales encontramos a la lectina de unión a manosa (MBL) que es una molécula capaz de distinguir entre carbohidratos que se encuentran en glicoproteínas propias y patrones de carbohidratos que se encuentran en superficies de patógenos. La MBL se encuentra asociada a serín proteasas (MASPs) y cuando la MBL se une a un carbohidrato no propio causa la activación de MASPs lo que desencadena la cascada del complemento^{21,104}.

Las transferasas de lípidos como la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) son importantes en el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) el cual es un componente esencial y abundante en las bacterias Gram negativas, además de ser de gran relevancia en el presente trabajo. Una vez que la LBP se une al

LPS, lo transfiere a complejos de reconocimiento presentes en células del sistema inmune innato⁹⁸, la proteína de incremento de la permeabilidad (BPI) también forman parte de los PRRs solubles⁴³.

Por otra parte tenemos a los receptores fagocíticos que reconocen patrones moleculares en la superficie de microorganismos y contribuyen a la fagocitosis de éstos ³⁶. Algunos ejemplos de receptores fagocíticos son los receptores scavenger (SR's) como SR-A ^{36,60}, el receptor de manosa (MR) presente en macrófagos, entre otros. *Salmonella* puede ser reconocido a través de estos receptores favoreciendo su fagocitosis y posterior destrucción.

Por su parte, una de las familias de PRRs actualmente más estudiadas son los receptores tipo toll (TLRs), que tienen la capacidad de iniciar respuestas inflamatorias así como de participar dentro de la respuesta inmune adaptativa. La caracterización funcional de los TLRs ha establecido que la inmunidad innata es un sistema muy hábil que detecta invasión de patógenos microbianos. El reconocimiento de componentes microbianos por los TLRs inicia vías de transducción de señales, que desencadena la expresión de genes, los productos de estos genes controlan la respuesta inmune innata y mas aún dirigen el desarrollo de inmunidad adaptativa antígeno específica.^{65,93}.

A la fecha, 10 miembros de la familia de los TLRs, han sido identificados en el humano, 12 en el ratón²⁴ y una serie de estudios genéticos han revelado sus respectivos ligandos. Por ejemplo y para efectos del presente trabajo el LPS de las bacterias Gram-negativas como *S. typhimurium* es reconocido por TLR-4.

Los TLRs son expresados en varias células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, y en algunas células que

no corresponden al sistema inmune como fibroblastos y células epiteliales. La expresión de TLRs, no es estática y es modulada rápidamente en respuesta a patógenos, variedades de citocinas y stress del microambiente⁵¹.

En adición a su papel de iniciar una respuesta proinflamatoria, los TLRs también han mostrado un control de la respuesta inmune adaptativa, y recientemente también se ha implicado en el desarrollo y protección a través del reconocimiento de bacterias comensales.⁶⁵

CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA..

La inmunidad innata utiliza distintos tipos de células para censar y responder ante la presencia de microorganismos que puedan causar daño o infección, tal es el caso de *Salmonella*. Estas células muestran mecanismos efectores para poder contrarrestar al patógeno, la cual consiste en atraer más células al sitio de la infección y activar a la respuesta inmune adaptativa. Todo esto mediante el reconocimiento de moléculas presentes en los microorganismos, fagocitosis de este, secreción de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiotácticos como lo son las quimiocinas, presentación de antígenos a linfocitos T, etc⁷.

El contacto entre la *Salmonella* y las células fagocíticas provoca la internalización de la bacteria a través de un mecanismo llamado macropinocitosis, que se caracteriza por rearrreglos en el citoesqueleto y formación de “ruffling” en la membrana además formación de fagosomas gigantes conteniendo a *Salmonella*⁷⁹. Las células fagocíticas activan mecanismos para poder eliminar a la bacteria

mediante una fase inicial dependiente del sistema NADPH oxidasa, seguida de una fase nitrosativa por lo cual el crecimiento de *Salmonella* es inhibido⁵⁸.

Los principales agentes antibacteriales son los intermediarios de oxígeno reactivo y los intermediarios de nitrógeno reactivo. Al parecer los fagocitos eliminan a *S. typhimurium* con una fase inicial oxidativa dependiente de NADPH oxidasa, seguida de una fase nitrosativa prolongada mediante la cual el crecimiento de la bacteria es inhibido por el producto de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS)^{57,58}. Las bacterias en respuesta producen enzimas antioxidantes, sistemas de reparación, etc.⁸² Por lo que algunas logran sobrevivir dentro del fagosoma e incluso multiplicarse dentro de él. No se conocen los mecanismos que determinan la muerte o supervivencia de la bacteria dentro del fagocito, sin embargo, la activación de los macrófagos por interferón γ (IFN- γ) o factor de necrosis tumoral α (TNF- α) parece ser un prerrequisito para la destrucción de la bacteria. Las que logran sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos provocan una segunda bacteremia que en casos fatales puede provocar un choque endotóxico y muerte^{16,66}.

Algunas células de la respuesta inmune innata importantes en la defensa frente a *Salmonella* son descritas enseguida.

Macrófagos. Este tipo de célula se encuentra en una vigilancia constante en todo nuestro organismo²⁵. Los macrófagos al detectar una señal de daño o peligro en el tejido, contribuyen con la solución mediante el despliegue de una serie de actividades efectoras e inflamatorias¹⁹.

Los macrófagos tienen la capacidad de detectar la presencia de una gran variedad de microorganismos, entre ellos mediante el reconocimiento de PAMP's a través de receptores PRRs presentes en la célula²⁵. Posterior al reconocimiento el macrófago se activa y comienza a mostrar funciones efectoras como son fagocitosis y posterior destrucción del patógeno, producción de citocinas y quimiocinas que contribuyen con la comunicación celular tanto de la inmunidad innata como la adaptativa, y presentación de antígenos a linfocitos T¹⁴.

El crecimiento de *Salmonella* es controlado en los macrófagos por el gene Nramp1 durante los primeros días de la infección. Nramp1 codifica para una fosfoglicoproteína transmembranal NRAMP1 con actividad de canal de cationes divalentes (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) que es rápidamente reclutada por el fagosoma que contiene a la bacteria^{58,66}. Su función es bombear los cationes del interior hacia el exterior del fagosoma. El Mn^{2+} es un cofactor esencial para ciertas isoformas de la superóxido dismutasa, una enzima que neutraliza a las especies reactivas del oxígeno (ROS)²⁶.

Por otra parte los macrófagos en su superficie, presentan receptores para Fc de anticuerpos y proteínas del complemento que se encuentran opsonizando a los microorganismos. Este hecho facilita la fagocitosis del patógeno y su posterior destrucción. Es importante mencionar este punto ya que en el presente trabajo se evalúa la actividad de los anticuerpos para llevar a cabo el proceso de opsonogocitosis.

Células dendríticas (DC). Desde su primera descripción por Ralph Steinman en 1973⁹² el estudio de las DCs ha crecido exponencialmente. Las DCs son células fagocíticas derivadas de médula ósea, la localización de éstas en sitios de

entrada del antígeno; la capacidad de migrar a través de tejidos hacia órganos linfoides; capturar antígenos; procesarlos y presentarlos en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T, entre otras hacen a estas células indispensables para iniciar una respuesta inmune específica eficiente, además de que son cualidades que la hacen ser células presentadoras de antígeno profesionales (APC) ⁹. Como ya se mencionó anteriormente, estas células son las primeras en ponerse en contacto con *S. typhimurium* por lo que son de gran importancia en el reconocimiento y destrucción de la bacteria.

Una vez que la DC reconocen a un microorganismo a través de sus PRRs, ocurren varios eventos como son: Fagocitosis y posterior presentación de antígeno, además de la maduración de la célula, la cual consiste entre otras cosas en un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40, moléculas de MHC para la presentación del antígeno, pérdida de su capacidad fagocítica, secreción de citocinas, todo esto para poder tener una eficiente activación de linfocitos T. El proceso de maduración además incluye un cambio en la expresión de receptores para quimiocinas⁷³ y moléculas de adhesión⁴² permitiendo de esta manera que la DC pueda viajar del sitio de infección al órgano linfóide secundario más cercano, sitio donde se lleva a cabo la presentación de antígeno.

INMUNIDAD ADAPTATIVA.

La respuesta inmune adaptativa puede dividirse en respuesta celular y humoral, La respuesta inmune celular esta compuesta por linfocitos T CD4+ y CD8+, mientras que la respuesta inmune humoral esta mediada por anticuerpos.

Una vez que la respuesta inmune innata ha activado sus mecanismos en contra de un patógeno, contribuirá a la generación de la respuesta inmune adaptativa frente a éste. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen a los antígenos exógenos los cuales son presentados por moléculas del MHC clase II. Una vez que esto ocurre, los linfocitos T CD4⁺ se diferencian hacia linfocitos T cooperadores 1 (Th1) o linfocitos T cooperadores 2 (Th2). Los Th1 se caracterizan por secretar interferón gamma (IFN- γ) mientras que los Th2 se caracterizan por secretar interleucina 4 (IL-4).

Los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos endógenos asociados a las moléculas del MHC de clase I. Estos linfocitos están encargados de destruir a las células infectadas por parásitos intracelulares y esto lo llevan a cabo mediante la liberación de IFN- γ y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La respuesta de linfocitos T específicos son otro mecanismo mediante el cual se puede potenciar la eliminación de la bacteria. Estos linfocitos por su perfil Th1 tienen la capacidad de producir IFN- γ el cual activa a los macrófagos para favorecer la destrucción de *Salmonella*¹⁷. Los linfocitos T citotóxicos también contribuyen con la muerte de *Salmonella*, mediante la eliminación de células infectadas por un proceso citolítico directo mediante interacción FAS y ligando de FAS (FasL) o a nivel de caspasas dejando susceptible a la bacteria para su posterior destrucción.

Como ya se mencionó anteriormente, las células de la inmunidad innata no son las únicas en expresar TLRs, los linfocitos B y T también expresan TLRs. Se ha visto que al estimular linfocitos T de ratón con LPS, se aumenta la expresión de TLR2 y 4⁵⁹. Para linfocitos T CD8⁺ muestran incremento en su capacidad

citotóxica cuando señalizan a través de TLR-9, 3, 5 y 7 pero en el caso de TLR2 y 4 no lo hacen⁸⁷.

En los órganos linfoides secundarios, los antígenos son reconocidos en su forma nativa por los linfocitos B, éstos a su vez actúan como células efectoras de la respuesta inmune humoral mediante la expansión clonal antígeno específica y diferenciación hacia células plasmáticas y de memoria³⁹. Los anticuerpos secretados tendrán la especificidad idéntica a la del receptor del linfocito B (BCR). La primera inmunoglobulina que secretan es de tipo IgM pero posteriormente el ambiente de citocinas promueven el cambio de isotipo con lo cual, las células plasmáticas pueden producir diferentes subclases de anticuerpos, que se diferencian entre si por su función.

La estimulación del linfocito B a través del BCR provoca la proliferación y la diferenciación de estas células. Se ha visto que también induce la transcripción de MHC de clase II, expresión de algunos receptores para citocinas como el receptor de IL-4 e IL-2, moléculas de adhesión y coestimuladoras como CD80, CD-86 y CD-40^{62,91}.

La señalización mediada por BCR no es la única señal para la activación del linfocito B, como ya se sabe, es necesaria la señal proveniente del linfocito T a través del ligando de CD40 también conocido como CD154, el cual es de gran importancia en la respuesta frente a *S. typhimurium* ya que ratones deficientes en CD154 fueron susceptibles a infección por la bacteria ya que cuando se les administró una dosis sub-lethal de bacteria atenuada y posterior administración de una cepa virulenta los ratones murieron, mientras que ratones sin la deficiencia

sobrevivieron hasta en un 90%. Por otra parte éstos ratones mostraron deficiente producción de IFN- γ , IL-12 y óxido nítrico⁴.

Anteriormente se pensaba que la respuesta inmune frente a los patógenos intracelulares como lo es *Salmonella* estaba dada por células y que para los patógenos extracelulares la respuesta estaba dada por anticuerpos, ahora este concepto no es del todo cierto ya que existen estudios en los que se sugiere que algunos patógenos intracelulares pueden tener fases extracelulares que les confieren susceptibilidad a la respuesta inmune de anticuerpos¹³.

Exposición de macrófagos de ratón a *S. typhimurium* opsonizada con suero inmune resultó en un incremento en la producción de superóxido favoreciendo la muerte de las bacterias¹⁰⁰.

La capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos permiten formar complejos inmunes con *Salmonella* facilitando su internalización también en células dendríticas, favoreciendo la destrucción de ésta y posterior presentación de antígenos, fenómeno que es bloqueado por la bacteria en condiciones no opsonizantes⁹⁷.

Los anticuerpos presentes en el lumen intestinal (IgM e IgG) bloquean la entrada de la bacteria inhibiendo su adherencia a las células epiteliales⁶³, se encontró que ratones Knock-out para el receptor polimérico de la inmunoglobulina (pIgR) encargado del transporte de IgA e IgM a la mucosa intestinal, presentan mayor susceptibilidad a la infección por *S. typhimurium*¹⁰².

ANTICUERPOS Y SU FUCIÓN.

Las inmunoglobulinas son un grupo amplio de proteínas presentes en el suero, pueden encontrarse principalmente en forma soluble conocidas como anticuerpos o anclados a la membrana de los linfocitos B al cual se le conoce como el receptor para antígeno de estas células (BCR).

La función principal de los anticuerpos es unirse de forma específica a un determinado antígeno, una vez que el anticuerpo se une al antígeno pueden surgir diferentes consecuencias, como la neutralización, activación del complemento, opsonización o citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), la función efectora de los anticuerpos dependerá de la estructura, la localización anatómica y el isotipo del anticuerpo. Por ejemplo la IgG2a, la IgG2b y la IgG3 activan el complemento, pero no la IgG1. En el caso de opsonofagocitosis los subtipos que mejor se unen a sus receptores en células fagocíticas son la IgG1 e IgG3⁴⁸.

OPSONIZACIÓN.

Los patógenos pueden ser eliminados por mecanismos mediados por la interacción de la fracción Fc de los anticuerpos con sus específicos receptores en la superficie de células efectoras.

Las células fagocíticas expresan receptores para las porciones Fc de los anticuerpos, cada uno con una afinidad y selectividad diferente para los distintos subtipos de inmunoglobulina. Por ejemplo, el receptor FcγRI (CD64) exhibe apreciable afinidad por los anticuerpos de clase IgG1 y IgG3, el receptor FcγRII (CD32) presente en células fagocíticas une complejos monoméricos de IgG1 y IgG3, y el receptor FcγRIII-b (CD16) une polímeros de IgG1 y IgG3. La mayoría de

los FcR sólo se unen a las inmunoglobulinas cuando está unida al antígeno, ya que ésta sufre un cambio conformacionales en la región Fc que lo permite⁴⁸.

Cuando las moléculas de IgG se unen a una partícula antigénica y la recubren, a este proceso se conoce como opsonización, la IgG unida es reconocida por los receptores FcγR de las células fagocíticas, lo que sirve para aumentar la eficacia de la fagocitosis, los subtipos que mejor se unen a estos receptores son la IgG1 e IgG3 siendo los que mejor favorecen la fagocitosis.

Algunos determinantes antigénicos presentes en *Salmonella* pueden ser reconocidos por anticuerpos frente a estos y llevar a cabo el proceso de opsonización de la bacteria para favorecer su eliminación.

La opsonización puede dar lugar algo mas que el simple incremento de la unión de las sustancias particuladas a los fagocitos. Los receptores FcγR de alta y baja afinidad también están implicados en la activación metabólica de la fagocitosis, aumentando la eficacia de la posterior degradación intracelular de las partículas ingeridas.

Hasta este momento se ha estudiado a grandes rasgos como el sistema inmune puede combatir a *S. typhimurium*; ésta a su vez responde a los ataques, entre otras cosas modificando una estructura muy importante y conservada en las bacterias Gram (-): el lipopolisacárido, el cual se describe enseguida así como su reconocimiento de una manera más específica.

EL LPS UN PAMP MUY IMPORTANTE EN BACTERIAS GRAM (-)

El LPS, también conocido como endotoxina, es bien conocido por sus efectos inmunológicos, farmacológicos y fisiopatológicos mostrados en diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*.

El LPS bacteriano puede producir fuertes respuestas inflamatorias y, en hospederos normales, estas respuestas pueden proteger frente a infecciones bacterianas. Sin embargo, respuestas incontroladas frente al LPS pueden desencadenar el desarrollo de sepsis o choque séptico, causando complicaciones inflamatorias severas con una mortalidad considerable.⁵⁶ La evasión de infecciones por bacterias Gram negativas está determinada por la habilidad de los hospederos de no solo detectar al LPS y responder en su presencia, sino de numerosos fenómenos que pueden inactivar el LPS, y/o prevenir reacciones incontroladas producidas por éste.⁶⁸

El LPS es una molécula compleja anfipática que presenta una arquitectura común que comprende tres dominios denominados A) una región hidrofóbica o lípido A, unido a una región intermedia denominada core. B) núcleo o core común y C) una cadena específica de unidades de repetición de azúcares llamado antígeno "O".²⁸

La porción del LPS denominada lípido A, es responsable de muchos fenómenos patológicos relacionados con infecciones por bacterias Gram negativas, como son el shock endotóxico.

Por ejemplo, el lípido A de *E. coli* está formado por un disacárido de glucosaminas bifosforiladas en las posiciones 1 y 4', unidas por un enlace β 1-6 glucosídico (GlcN II- GlcN I). Ambas glucosaminas están sustituidas en las posiciones 2,2',3,3' por ácido 3-hidroximirístico, y con sustituciones de grupos

ácidos secundarios en el grupo hidroxilo del ácido 3-hidroxi-3-fosfatidil mirístico, en posición 3' por ácido mirístico y en 2' por ácido laúrico de la GlcpN- II.⁸

Diferentes bacterias producen distintas moléculas de LPS estructuralmente hablando, que varían en el número de grupos fosfato, número de cadenas de ácidos grasos así como la composición de estos, entre otras. Estas variaciones se ven reflejadas en las actividades o efectos biológicos producidos en células del hospedero.³

Se ha observado que las variaciones en composición y estructura tridimensional del lípido A del LPS pueden activar diferencialmente vías de señalización a través de TLRs. La conformación cónica del LPS estimula células a través de TLR-4, mientras que la conformación cilíndrica del LPS desencadena producción de citocinas a través de TLR-2⁶⁹.

También se ha observado que de acuerdo con la estructura tridimensional del lípido A del LPS se puede antagonizar una respuesta a LPS con otra conformación. Una conformación cilíndrica del lípido A del LPS antagoniza una respuesta de producción de citocinas inducida por un LPS con estructura cónica⁸⁶. Los factores que influyen en la estructura o conformación tridimensional del lípido A del LPS son el número de cadenas de ácidos grasos así como el largo de éstos, la asimetría de los ácidos grasos y la distribución de cargas negativas⁸⁹.

RECONOCIMIENTO DEL LPS.

El reconocimiento del LPS ocurre a través de un complejo receptor (TLR4-MD2-CD14) que está presente en varios tipos celulares incluyendo macrófagos y células dendríticas^{65,105}.

El reconocimiento de LPS también requiere de una proteína accesoria o proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) que convierte micelas oligoméricas de LPS a monoméricas para transferirlo a CD14, que es una proteína de membrana de alta afinidad y que también se encuentra en forma soluble. Se ha observado que CD14 es de gran importancia en el reconocimiento específico de distintos tipos de LPS por el complejo receptor, estudios con macrófagos que contienen la molécula mostraron una alta especificidad para reconocer un LPS silvestre de LPS modificados con bajas dosis de estos, mientras que macrófagos deficientes de CD14 no mostraron especificidad de reconocimiento y requirieron mayores dosis para observar una respuesta²³.

CD14 concentra al LPS para unirlo al complejo TLR4-MD2. El reconocimiento de taxol por el complejo TLR4 de ratón está mediado por el componente MD2 del complejo y un residuo específico de glutamina en la región carboxi-terminal de la molécula⁵³ lo que nos habla de la importancia de la molécula MD2 dentro del complejo de reconocimiento del LPS.

Cómo el complejo reconoce al LPS y señala a través de la membrana todavía no está completamente estudiado. La importancia de TLR4-CD14-MD2 en el reconocimiento del LPS está muy estudiado en ratones knock-out para alguno de estos genes y en humanos con polimorfismos en estos mismos genes y que se observa una reducción en la magnitud de respuesta frente al LPS⁶⁵.

En recientes estudios, nuevos receptores parecen mostrar estar involucrados en el reconocimiento del LPS. Existe la posibilidad de que moléculas como integrinas, proteínas de choque térmico, CXCR4 o CD55 puedan formar parte del complejo de reconocimiento del LPS ya conocido⁹⁸.

El complejo LPS-CD14-TLR4-MD2 recluta y activa una proteína mielóide de diferenciación adaptadora denominada MyD88⁶¹. Esta a su vez recluta dos serin-treonin-cinasas denominadas receptor de IL-1 con actividad de cinasa (IRAK e IRAK2). Ambos IRAK interaccionan subsecuentemente con la molécula adaptadora denominada factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) que se une a una proteína cinasa inductora de cinasas NF- κ B (NIK). NIK activa el complejo I κ B cinasa (IKKa e IKKb) que directamente fosforila I κ B. La fosforilación de I κ B media su degradación por el complejo I κ B ubiquitinado-proteasomas y liberando y activando al factor de transcripción NF- κ B el cual induce la producción de citocinas: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- β , moléculas de adhesión: VCAM-1, ELAM-1, proteínas de fase aguda como la proteína mielóide del suero, C3, etc. Todo lo anterior conlleva a la activación de la respuesta inmune innata celular con migración y reparación celular, inflamación y al final la propia regulación de esta respuesta por medio de NF- κ B^{55,61,81,99,106}

Como se mencionó anteriormente *S. typhimurium* puede responder a estímulos dañinos presentes en el hospedero, esto lo hace a través de sistemas de detección que regulan la expresión de genes que le permiten sobrevivir a dichos estímulos. A estos sistemas de detección se les denominan sistemas reguladores de dos componentes.

SISTEMAS REGULADORES DE DOS COMPONENTES.

La patogénesis bacteriana requiere proteínas que detectan el microambiente del hospedero y responden regulando la transcripción de genes de virulencia.

El sistema de transducción de señales de dos componentes, es el principal sistema en las bacterias para detectar ambientes hostiles o dañinos para ella, y transduce información dentro de la célula. Esto fue descubierto por Hall y Silhavy en *Escherichia coli*; ellos encontraron que los genes para proteínas de membrana externa (*ompF* y *ompC*) son regulados por dos proteínas: una proteína citoplasmática (OmpR) y una proteína de membrana (EnvZ) en respuesta a cambios en la osmolaridad. Este estudio sugirió que la información del ambiente que rodea a la bacteria, puede ser detectado a través de proteínas de membrana, y producir una transducción de señales. Desde entonces muchos sistemas similares han sido descritos gracias a análisis de genómica bacteriana¹⁸. En el caso de *S. typhimurium* los sistemas reguladores de dos componentes le permiten entre otras cosas llevar a cabo modificaciones estructurales a su LPS.

MODIFICACIONES ESTRUCTURALES AL LPS DE *S. typhimurium*.

Para *S. typhimurium*, uno de sus mecanismos reguladores es el sistema PhoP/PhoQ, que actúa como sensor-cinasa y activador transcripcional^{15,27}, el cual regulará la activación de algunos genes y la represión de otros. El sistema regulador de dos componentes PhoP-PhoQ de *S. typhimurium* regula genes necesarios para sobrevivir intracelularmente y le confiere entre otras cosas resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos., además de permitirle llevar a cabo modificaciones estructurales al lípido A de su LPS.

PhoQ es una proteína integral de membrana con actividad histidina-cinasa, la cual es capaz de sensar el medio ambiente y transferir fosfatos a un residuo

conservado en la parte amino terminal de PhoP. El PhoP fosforilado se une a un promotor específico e induce o reprime la expresión de mas de 40 genes llamados phoP activados (pags) y phoP reprimidos (prgs) respectivamente³⁴.

Análisis por espectroscopia de masas reveló que modificaciones estructurales al lípido "A" reguladas por el sistema PhoP-PhoQ de *S. typhimurium* indujeron la adición de aminoarabinosa y ácido 2-hidroxi mirístico al lípido "A" del LPS. El lípido A modificado estructuralmente, alteró la expresión de la molécula de adhesión E-selectina por células endoteliales y la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por monocitos humanos³⁴

Estudios con cepas de *S. typhimurium* resistentes a polimixina mostraron que otras modificaciones al lípido A son dependientes de un segundo sistema regulador: PmrA/PmrB. La activación de PhoP-PhoQ estimula la síntesis de PmrA-PmrB que a su vez regula la expresión de pmrE, el cual codifica para una UDP glucosa deshidrogenasa (UGD). UGD y enzimas codificadas en el operón pmrHFIJKLMN están involucradas en la producción de amino-arabinosa y que al unirse al lípido A le confieren a la bacteria resistencia a algunos péptidos catiónicos y polimixina^{29,32,71,95}.

Los dos sistemas reguladores arriba mencionados de alguna manera tienen que estar conectados para poder funcionar simultáneamente. En recientes estudios con *S. typhimurium* han descrito una proteína PmrD que puede ser el conector necesario entre los sistemas reguladores ya mencionados, esta proteína es regulada por la activación del sistema PhoP-PhoQ, PrmD una vez sintetizada, se une a PrmA fosforilada estabilizando esta unión y permitiendo la transcripción de los genes relacionados con PmrA¹⁸.

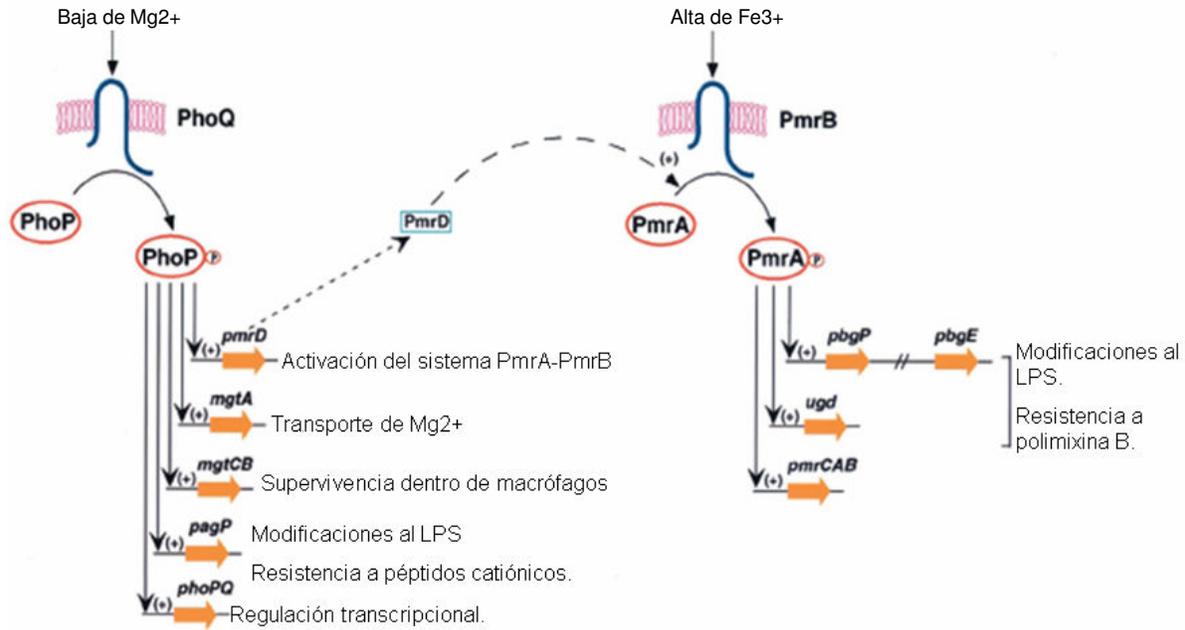


Figura 1. Sistemas reguladores de dos componentes en *S. typhimurium*. Algunas señales que controlan la expresión de los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB y la interconexión de los dos sistemas. (Imagen modificada de Groisman E.A. Journal of bacteriology 2001).

Varios estudios muestran evidencia de que mutación en genes relacionados con la biosíntesis del LPS provocan algunos cambios en éste y además su actividad biológica se ve influenciada. Una mutación en *lpxM* en *S. typhimurium* produce un LPS con lípido A pentacilado y no hexacilado como normalmente sucede, el LPS pentacilado indujo una disminución en la producción de TNF- α , IL-1 β y NOi⁵⁰.

Diferentes grados de acilación en *E. coli* y *P. gingivalis* mostraron diferentes respuestas en células T antígeno específicas, así como producción diferencial de citocinas, esto también visto en distintas subpoblaciones de células dendríticas⁸⁰. La activación de PhoP-PhoQ por su parte, induce la expresión de PagL, la cual es una 3-O deacilasa y de pagP que es una palmitoil transferasa lo que da como resultado un LPS modificado en su lípido A, esta modificación esta dada por la sustitución de un ácido 3-hidroxi mirístico por ácido palmítico. Este cambio en el lípido A del LPS induce una disminución de activación de NFκB de 200 veces en células de ratón y humanas transfectadas con TLR-4, lo que nos dice que el reconocimiento por TLR-4 esta siendo influenciado por los grados de acilación del LPS⁵².

En estudios previos se encontró que el lípido A de la cepa *S. typhimurium* silvestre WT ATCC 14028s, cambia cuando se inducen mutaciones en los operones *phoP-phoQ* o *pmrA-pmrB*³⁰. El obtuvo varias cepas, de las cuales dos son empleadas en este trabajo.

La primera de ellas es la JSG430 que es una cepa *phoP*^c *pmrA*⁻ que tiene la característica de presentar un lípido A heptacilado formado por un disacárido de D-glucosamina bifosforilado en 1 y 4', unidos entre sí por un enlace glucosídico β 1-6 (GlcN II-GlcNI). Las dos glucosaminas están sustituidas por ácido 3-hidroxi mirístico en las posiciones 2,3,2',3' y con sustituciones de grupos acilo secundarios en el hidroxilo del ácido 3-hidroxi mirístico en posición 3' por ácido hidroxi mirístico y en 2' por ácido láurico de la GlcpN II, además de una sustitución en el grupo acilo secundario con ácido palmítico en la posición 2²⁹.

La segunda cepa es la JSG-435, que es una cepa pmrA505 zid::Tn10d-cam y la diferencia con la JSG-430 es que la JSG-435 está sustituida en la posición 4' por una aminoarabinosa unida por un enlace fosfoester^{29,31,33}.

Las estructuras moleculares de los LPS utilizados en el presente trabajo se muestran enseguida.

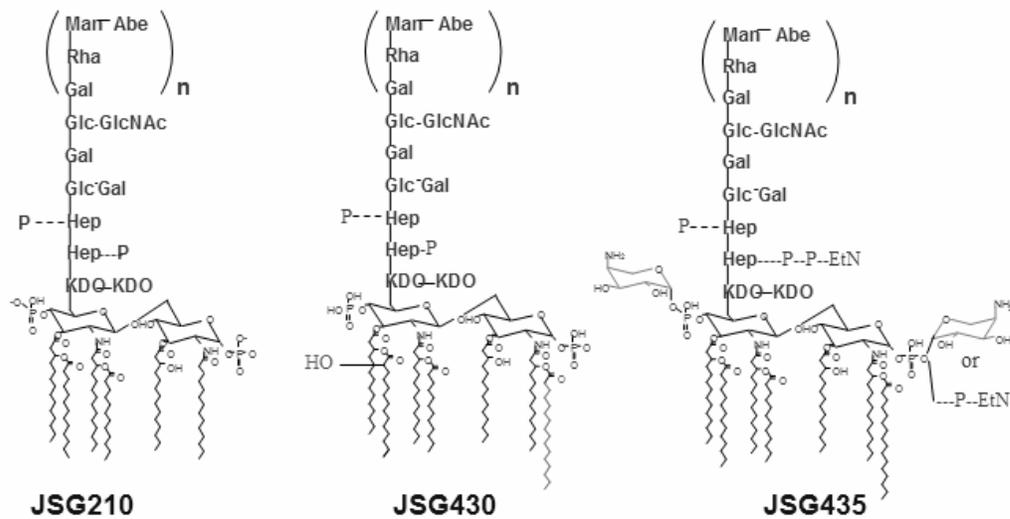


FIG.2 Esquema de los diferentes LPS expresados en las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en el presente trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante el proceso infeccioso *S. typhimurium* tiene la capacidad de detectar el ambiente peligroso para ella a través de los sistemas reguladores de dos componentes PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB y realizar modificaciones estructurales al lípido A de su lipopolisacárido que le permiten evitar la acción de péptidos antimicrobianos y algunos mecanismos innatos de defensa. Sin embargo, no se conoce si estas modificaciones en el lípido A pudieran también afectar la repuesta inmune humoral contra la bacteria ya que la respuesta inmune innata es fundamental para la activación de la respuesta inmune adaptativa.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto del lípido A de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modificado por los sistemas PhoP–PhoQ y PmrA-PmrB sobre la respuesta de anticuerpos y la capacidad de estos para mediar la opsonización y fagocitosis de la bacteria.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Estudiar la respuesta de anticuerpos contra las bacterias que expresan en forma constitutiva los LPS modificados en el lípido A por los sistemas reguladores PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB.
- Evaluar la funcionalidad de los anticuerpos producidos *in vivo* contra la bacteria mediante ensayos opsonofagocíticos.

HIPÓTESIS.

Los LPS de *Salmonella typhimurium* modificados por los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB, inducen una disminución en la respuesta de anticuerpos contra la bacteria que conlleva una disminución en la opsonización y fagocitosis de la bacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS.

CEPAS BACTERIANAS.

Se utilizó la cepa de *S. typhimurium* ATCC 14028 (WT) , así como las que presentan modificaciones estructurales en su LPS (JSG-430 y JSG435.)

Se utilizó la cepa de Salmonella typhimurium con un plásmido (pFPV25) que expresa la proteína verde fluorescente para evaluar la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos producidos frente a la bacteria.

LÍNEA CELULAR.

Se utilizó la línea celular de macrófagos de raton J774 A.1 para evaluar la capacidad fagocítica de los complejos inmunes formados por los anticuerpos anti-*S. typhimurium*-GFP.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS LPS MODIFICADOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE A LA BACTERIA.

Se emplearon ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad (Harlan) mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), las ratones se alojaron en grupos de 6 animales dentro de microaisladores. Los ratones se inmunizaron con 1×10^6 bacterias muertas por calentamiento a 70° C/ 45 minutos de las cepas JSG210, JSG430 y JSG435. Como control negativo se inyectaron ratones con SSI. Los ratones se sangraron cada cuatro días, el día 15 fueron reinmunizados con la misma dosis de antígeno y fueron sangrados el día 21 y 30 posteriores a la primera inmunización. La obtención de la muestra de sangre se

hizo con tubo capilar en el espacio retroorbital del ojo, la sangre se colectó en tubos Microtainer BD, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se congelaron a -20° C hasta la realización del ensayo inmunoenzimático. Se evaluó la respuesta humoral contra la bacteria silvestre influenciada por el lípido A de los LPS, determinando títulos de IgM, IgG y las subclases por ensayos inmunoenzimáticos.

PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS PARA EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SÓLIDA (ELISA).

Se colocó un inóculo de la bacteria a un matraz erlenmeyer conteniendo caldo Luria Bertani y se incubó a 37° C y 200 rpm en un incubador con agitación el tiempo necesario para obtener una D.O de 0.95 a una lambda de absorción de 540 nm, que equivale a 1×10^9 bacterias. Una vez obtenido el número de bacterias se procede a quitar el medio de cultivo con 4 lavados con PBS 1x . Se inactivó a la bacteria por calor, en baño maría a 70° C durante 1 hora y se siembra en cajas petri conteniendo Agar tripticasa soya para corroborar que no exista crecimiento. Se quitó el PBS de la suspensión bacteriana mediante centrifugación y decantación del sobrenadante y se resuspende el botón en amortiguador de carbonatos a pH 8.6 para la posterior sensibilización de placas.

DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS POR ELISA.

Se sensibilizaron placas de 96 pozos para inmunoensayo (Corning) con 1×10^7 bacterias por pozo y se incubaron a 37°C durante una hora y después a 4°C durante toda la noche.

Se lavaron las placas cuatro veces con solución PBS-Tween 20 y se bloquearon con $200 \mu\text{L}$ de leche descremada disuelta en PBS al 5%, incubando las placas a 37°C por 1 hora. Se lavaron las placas cuatro veces con solución PBS-Tween 20, las placas se refrigeraron hasta su empleo.

Los sueros fueron diluidos 1:40 ($5 \mu\text{L}$ en $195 \mu\text{L}$) en leche-PBS al 5% a partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas en factor de dos transfiriendo $100 \mu\text{L}$ de la dilución a otro pozo que contenga $100 \mu\text{L}$ de leche PBS hasta completar los 12 pozos de la placa de micro dilución de fondo cónico Corning, se transfirieron las diluciones a la placa para inmunoensayo sensibilizada con el antígeno correspondiente, se incubaron a 37°C por una hora, se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 y se adicionaron $100 \mu\text{L}$ por pozo del anticuerpo anti Ig respectivo marcado con peroxidasa, diluido 1:1000 en leche-PBS, se incubó por 90 minutos a 37°C , se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 y se reveló con la solución reveladora incubando en la oscuridad por 15 minutos, se detuvo la reacción adicionando $10 \mu\text{L}$ de ácido sulfúrico 2.5 N. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas (Dynex Technologies) a 480 nm . Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos y se graficó en forma logarítmica contra el día a que corresponda el suero.

ENSAYOS OPSONOFAGOCÍTICOS.

Se evaluó la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos anti-*S. typhimurium* mediante la fagocitosis de los complejos inmunes formados por estos anticuerpos y *S. typhimurium*-proteína verde fluorescente (GFP) en una línea celular de macrófagos (J774) de ratón, utilizando citometría de flujo. Para esto se ajustó la concentración de *S. typhimurium*-GFP considerando una $DO^{540nm} = 0.950 \pm 0.005$ como 1.0×10^9 UFC/mL. Se lavaron 5 mL de la suspensión bacteriana previamente ajustada a 1.0×10^9 UFC/mL con PBS. El botón de bacterias se resuspendió en 2.5 mL, se agregó en un eppendorf 100 μ L de la suspensión de bacterias y se adiciono 100 μ L de la dilución 1:50 de los sueros a evaluar. La suspensión bacteriana con el suero se incubo durante 15 minutos a 37 °C, para opsonizar la bacteria. Transcurrido el tiempo se lavo la suspensión bacteriana en dos ocasiones, para retirar el anticuerpo en exceso.

Se colocaron 1×10^6 macrófagos de la línea J774 por pozo en placas de 6 pozos en medio libre de SFB, se adicionó 50 μ L de la suspensión *S. typhimurium*-GPF que equivale a 50×10^6 bacterias. Después de 30 minutos de incubación a 37°C y 5% CO₂ se agregó 15 μ L de gentamicina (1 μ g/ μ L) para inactivar a la bacteria que no fue internalizada. Se realizaron dos lavados con PBS, y finalmente se resuspendió el botón el botón final en 500 μ L para ser leídas en el citómetro de flujo (CyAn™ ADP Dako®). Se capturaron al menos 10 000 eventos en el citómetro de flujo. Se analizaron los datos obtenidos mediante el Software Summit version 4.3.

RESULTADOS.

EL EFECTO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES AL LPS DE *S. typhimurium* INDUCEN UNA DISMINUCIÓN EN LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS FRENTE A LA BACTERIA.

La primera pregunta planteada fue si las modificaciones estructurales al lípido A del LPS de *Salmonella typhimurium* pueden modificar la respuesta de anticuerpos contra la bacteria. Para contestarla se inactivaron por calor las cepas WT, JSG-430 y JSG-435 y se inocularon a grupos de ratones por vía intraperitoneal, los títulos de anticuerpos específicos fueron medidos en el suero de los ratones inmunizados por medio de ELISA como se muestra en la figura 3.

No se encontraron diferencias en los títulos de anticuerpos de clase IgM para cada una de las cepas evaluadas durante la respuesta primaria y secundaria, además de que la cinética se comportó de manera muy similar para las tres cepas. El título más alto alcanzado fue alrededor de 7.5 para las tres cepas en el día 30 (Figura 3A).

Lo que corresponde a los títulos de anticuerpos IgG total, se encontró que en respuesta primaria no hay anticuerpos IgG, pero en respuesta secundaria se observa que el mayor título lo alcanza la cepa WT y que las cepas 430 y 435 muestran menores títulos (2 veces menos) de anticuerpos que los inducidos por la WT. No se observan diferencias entre los títulos de las cepas 430 y 435 (Figura 3B).

El análisis de los anticuerpos IgG1 mostró una cinética similar al de los anticuerpos IgG totales. En la respuesta primaria no se observaron títulos de

anticuerpos, mientras que durante la respuesta secundaria la cepa WT indujo los mayores títulos. Una vez más las cepas 430 y 435 indujeron los menores títulos de anticuerpos que en el día 30 alcanzó una diferencia de 4 veces menos con respecto los títulos inducidos por la WT (Figura 3C).

El análisis de los anticuerpos IgG2a mostró que la cepa 430 indujo los títulos más elevados seguida por la cepa WT, mientras que la cepa 435 indujo el menor título de anticuerpos. La presencia de estos anticuerpos fue observada únicamente durante la respuesta secundaria (Figura 3D).

Los títulos de anticuerpos IgG2b inducidos por las cepas WT , 430 y 435 fueron similares durante el experimento. (Figura 3E).

Los títulos de anticuerpos IgG3 inducidos por las 3 cepas fueron observados únicamente durante la respuesta secundaria. Una vez más la WT indujo los mayores títulos, la cepa 430 mostró una cinética más lenta que la WT ya que hasta el día 30 alcanzó los mismos títulos que ésta. La cepa 435 indujo el menor título de anticuerpos (Figura 3F)

En la figura 6 se observa que la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos producidos por las bacterias que expresan los LPS modificados está disminuida con respecto a los inducidos por la cepa silvestre.

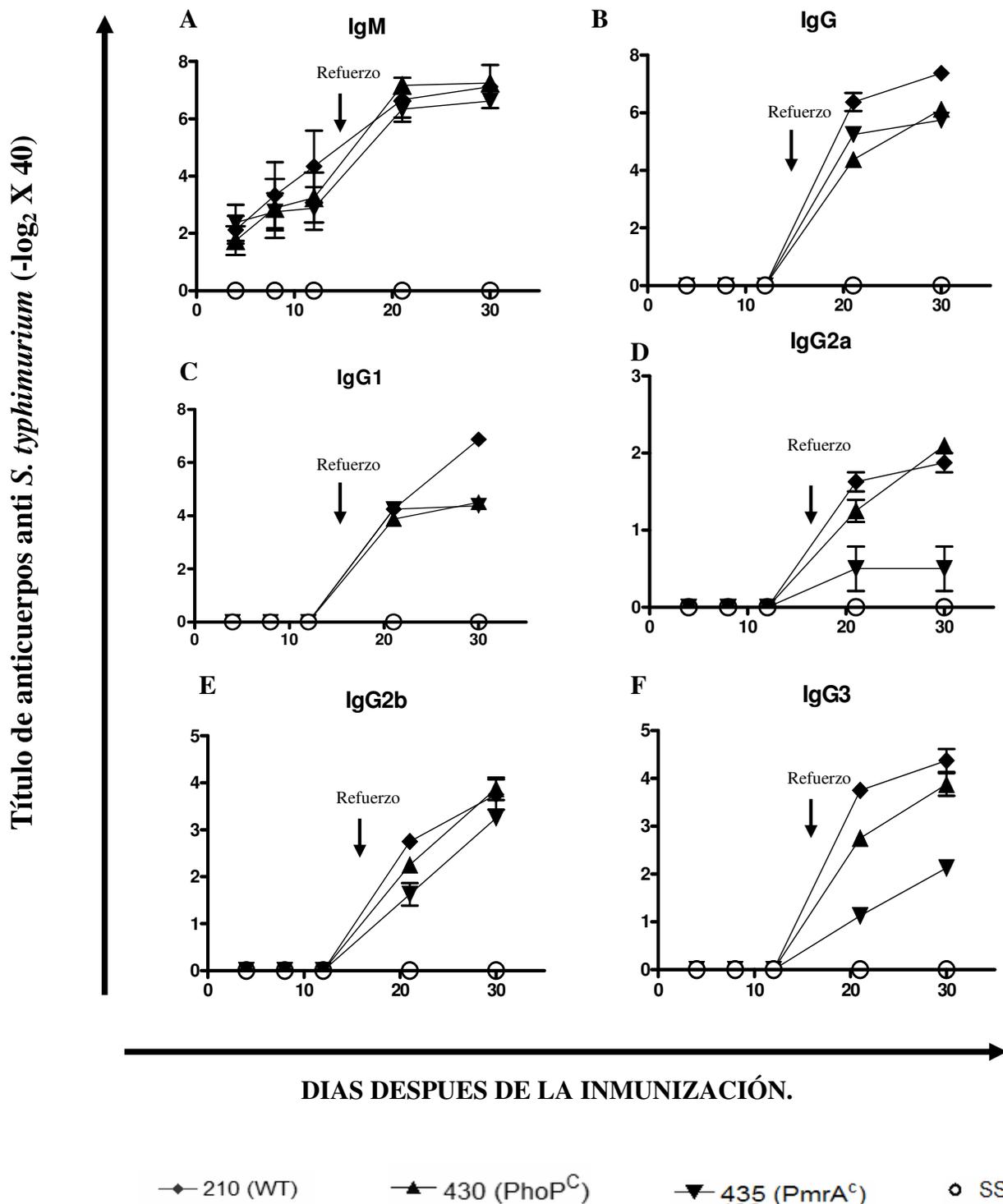


Figura 3. Las modificaciones estructurales al lípido A del LPS de las cepas 430 y 435 inducen una disminución de los títulos de anticuerpos específicos contra *S. typhimurium*. Las cepas de *S. typhimurium* expresando los LPS 430 y 435 indujeron menores títulos de anticuerpos (panel B, C y F) con excepción de IgM e IgG2b. La cepa con el LPS 435 tuvo una disminución más significativa que la cepa silvestre y la cepa 430. Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 1×10^5 bacterias de las cepas 210 o 430 o 435. Se obtuvieron muestras de sangre a los tiempos mostrados y los sueros se titularon por el método de ELISA. Los títulos mostrados están expresados en logaritmos base dos y el título es la dilución a la cual se alcanza 3 veces la absorbancia del fondo.

CARACTERIZACIÓN DE LÍNEA CELULAR J774 A.1 A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN DE CD14

Para determinar la identidad, homogeneidad y pureza de la línea celular J774 A.1 de macrófagos de ratón a utilizarse en el presente estudio, se evaluó la expresión del marcador CD14 utilizando un anticuerpo específico conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo (CyAn™ ADP Dako®) evaluando la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 y se capturaron al menos 10 000 eventos. Las células analizadas mostraron un patrón de expresión homogéneo en el 94.52 % de las células J774 A.1 (Figura 4).

9.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) EN LA BACTERIA *S. typhimurium*

Se verificó la expresión de la GFP en la bacteria *S. typhimurium* (*S. typhimurium-GFP*) mediante un citómetro de flujo (CyAn™ ADP Dako®) evaluando la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 y se capturaron al menos 10 000 eventos (Figura 5).

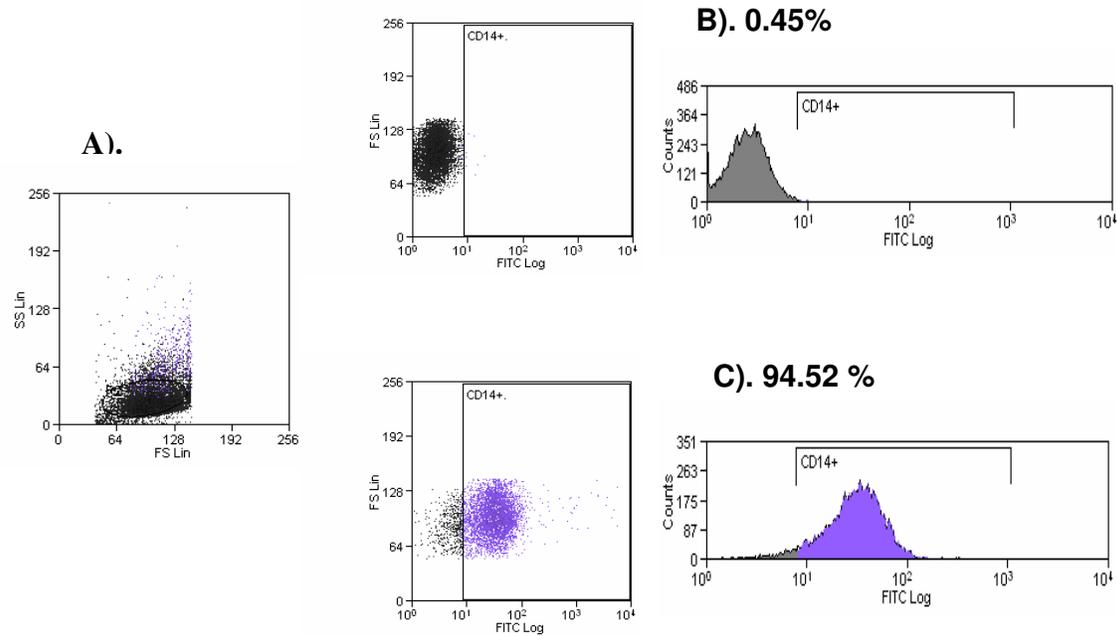


Figura 4. Expresión del marcador CD14 en la línea celular de macrófagos de ratón J774 A.1 Se incubó 1×10^6 macrófagos con un anticuerpo anti-CD14 conjugado con FITC y se analizó el porcentaje de células positivas por citometría de flujo utilizando un citómetro CyAn™ ADP Dako®. Para el análisis se capturaron al menos 10 000 eventos de la zona seleccionada. A) Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad donde se muestra la población de macrófagos B) Gráfica de puntos e Histograma de las células sin anticuerpo (autofluorescencia) C) Gráfica de puntos Histograma de las células con el anticuerpo anti-CD14 conjugado con FITC se obtuvo un 94.52 % de células positivas para la expresión de CD14

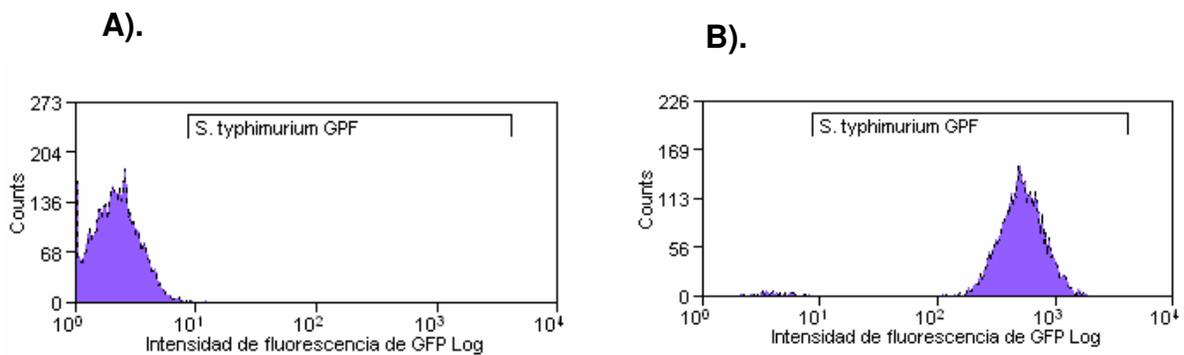


Figura 5. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) de la bacteria *S. typhimurium*. Histogramas de las bacterias *S. typhimurium* A). Sin la proteína

verde fluorescente B). Con la proteína verde fluorescente. Se verificó la expresión de la proteína verde fluorescente en la bacteria *S. typhimurium* evaluando la intensidad de fluorescencia en el canal FL1 y se capturaron al menos 10 000 eventos en el citómetro de flujo.

LAS CEPAS DE *S. typhimurium* QUE EXPRESAN LOS LPS MODIFICADOS INDUCEN UN MENOR EFECTO OPSONOFAGOCÍTICO CONTRA LA BACTERIA.

El hecho de inducir una disminución en los títulos de anticuerpos podría sugerir que *S. typhimurium* mediante las modificaciones estructurales en su LPS podría favorecer la infección. Con el fin de estudiar si la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos inducidos por las cepas 210, 430 y 435 fue modificada, *S. typhimurium* que expresa la GFP se incubó con los sueros de los ratones inmunizados y posteriormente esta mezcla se incubó con macrófagos. Mediante citometría de flujo se determinó el ingreso de las bacterias al interior de los macrófagos como medida de la capacidad opsonofagocítica de los sueros descomplementados.

En la figura 6 se observa que la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos producidos por las bacterias que expresan los LPS modificados está disminuida con respecto a los inducidos por la cepa silvestre.

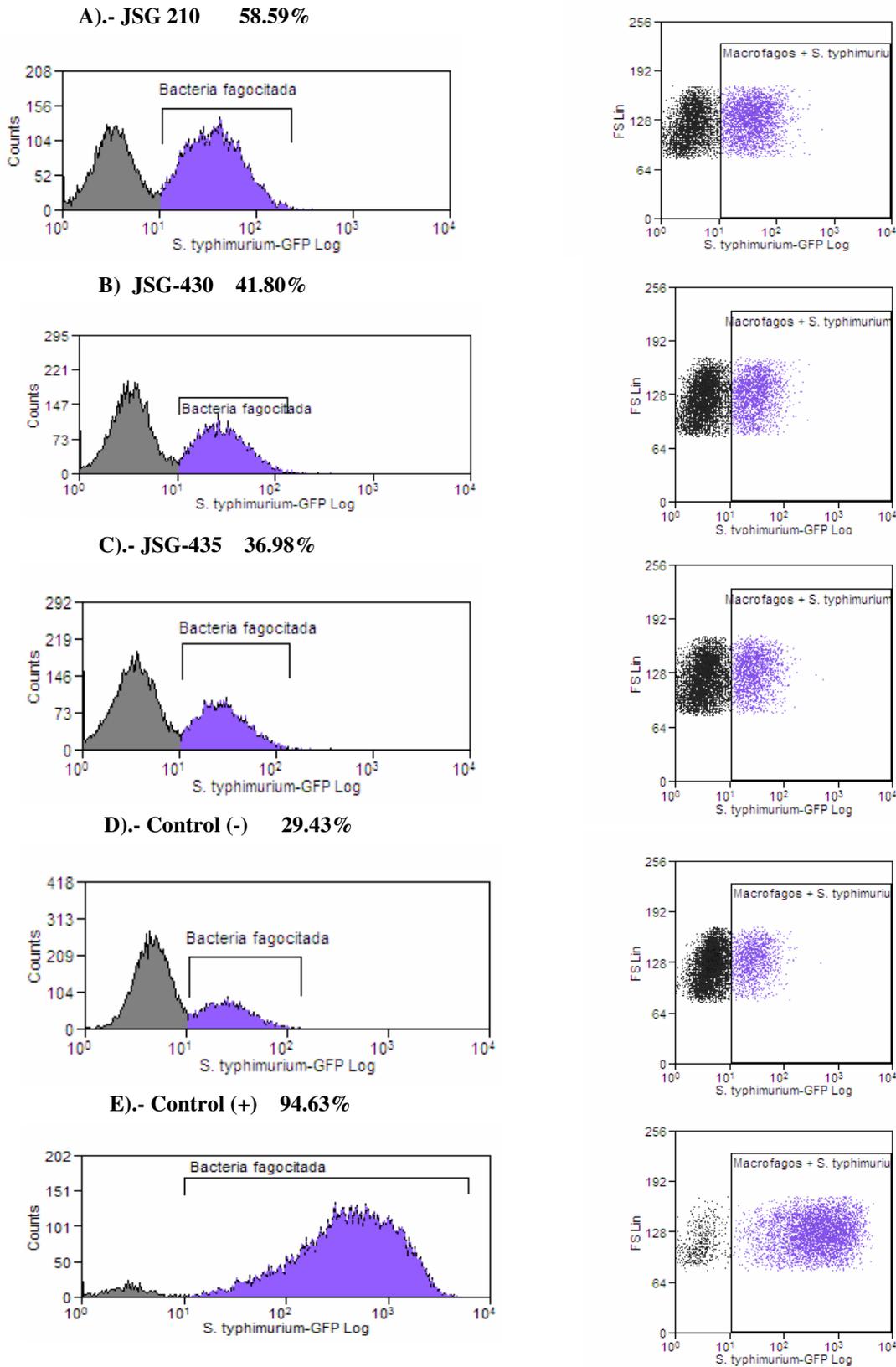


Figura 6. Los anticuerpos producidos por las cepas de *S. typhimurium* que expresan LPS con modificaciones estructurales presentan una menor capacidad opsonofagocítica

de la bacteria. A) Fagocitosis de *S. typhimurium* WT, opsonizada con anticuerpos anti-WT. B) anti-430 C) anti-435. D y E) Suero no inmune e hiperinmune fueron utilizados como controles negativo y positivo respectivamente. *S. typhimurium* WT expresando GFP se incubó en presencia de los anticuerpos anti-430 y 435, la mezcla se incubó con macrófagos de la línea celular J774 y se midió la entrada de bacterias a los macrófagos mediante citometría de flujo.

DISCUSIÓN.

Los microorganismos, en particular los patógenos, a través del tiempo han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir a ambientes peligrosos para ellos y que están presentes en los hospederos, los cuales a su vez también han desarrollado mecanismos de defensa contra éstos, de tal manera que la supervivencia de alguno de ellos estará determinada por el equilibrio entre los sistemas de defensa del hospedero y los factores de patogenicidad y virulencia del microorganismo.

Para que un patógeno pueda infectar al hospedero, se enfrenta a un sistema de defensa innato como primera línea de resistencia y que generalmente suele ser muy efectivo y por lo tanto controla o elimina al patógeno. Algunas veces la primera línea de defensa innata no es lo suficientemente efectiva para terminar con el patógeno, de tal manera que éste puede ingresar al organismo, reproducirse y causar daño. Por su parte los organismos vertebrados, como producto de la evolución, han desarrollado sistemas de defensa más específicos por ejemplo, contienen células capaces de producir anticuerpos y modificar sus receptores de antígeno de tal manera que el reconocimiento de los determinantes antigénicos de los patógenos es más efectivo y por lo tanto pueden ser eliminados eficazmente.

Dentro del género *Salmonella* existen una gran cantidad de especies, las cuales causan diversos tipos de daños en mamíferos por lo que han sido ampliamente estudiadas. Un ejemplo claro es la fiebre tifoidea en el humano, la cual ha cobrado miles de vidas a lo largo del tiempo y es causada por *S. typhi*. Por su parte *S. typhimurium* causa una enfermedad parecida a la fiebre tifoidea en el ratón y que por lo tanto suele ser un modelo de estudio de la enfermedad.

Existen muchos estudios que describen los mecanismos involucrados en la patogenicidad de *S. typhimurium* que van relacionados a cambios en la composición antigénica de la bacteria, entre los cuales se encuentran los sistemas reguladores de dos componentes PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB que están involucrados en las modificaciones estructurales al LPS, el cual es el PAMP mayormente estudiado debido a sus propiedades adyuvantes; para inducir fiebre; shock endotóxico y por participar activamente procesos inflamatorios⁸.

Debido a la heterogeneidad estructural del LPS en cada bacteria, se tienen diferentes respuestas fisiológicas. Se han descrito diversas formas estructurales en el lípido A del LPS, estas diferencias son el arreglo tridimensional y dependen del número de cadenas de ácidos grasos o número de átomos de carbono dentro de cada una y simetría de la molécula, dándoles formas cónicas o cilíndricas que determinan las respuestas inflamatorias diferenciadas entre cada molécula y por lo tanto entre cada microorganismo⁶⁹.

Se ha encontrado que *S. typhimurium*, durante la infección activa sus sistemas reguladores PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB, que le permiten realizar modificaciones estructurales a el lípido A de su LPS, confiriéndole resistencia a

péptidos catiónicos antimicrobianos y menor producción de TNF- α ^{34,35}. Esto nos hace pensar que la bacteria de alguna manera podría controlar la respuesta inmune innata y aumentar su supervivencia y por lo tanto favorecer la infección.

Tomando en cuenta los datos relacionados con las modificaciones estructurales que *S. typhimurium* realiza en su LPS y lo que éstas producen sobre la respuesta inmune innata, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de las modificaciones estructurales del lípido A de *S. typhimurium* sobre la respuesta de anticuerpos frente a ésta.

Para poder evaluar la respuesta de anticuerpos contra la bacteria, así como determinar si las modificaciones estructurales del lípido A de su LPS disminuyen los títulos frente a ésta, se inmunizaron ratones con la bacteria completa inactivada por calor, por lo tanto la respuesta de anticuerpos fue frente al total del mosaico antigénico presente en cada cepa.

Se obtuvieron los títulos de anticuerpos de cada suero frente a la cepa silvestre, tomando en cuenta que la única variación antigénica existente entre cada cepa mutante es en el lípido A del LPS.

En cuanto a la respuesta de anticuerpos de clase IgM no se observó una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos inducidos por las tres cepas evaluadas, sin embargo, en la respuesta de anticuerpos IgG total, se encontraron diferencias significativas después del refuerzo sugiriendo la participación del linfocito T en el proceso, ya que éstos pueden generar un microambiente de citocinas que contribuye a que el linfocito B lleve a cabo el cambio de isotipo. Sin embargo dentro del isotipo IgG se conocen distintas sub-clases de anticuerpos, por lo que se evaluó el título inducido de éstas.

En cuanto a las subclases de IgG se encontró que los títulos están disminuidos en las cepas JSG-430 y JSG-435 con respecto a la cepa silvestre, con excepción de la subclase IgG2b.

Actualmente se conoce el papel importante de la respuesta inmune innata sobre la regulación de la respuesta inmune adaptativa de tal manera que el reconocimiento de los LPS modificados presentes en la bacteria pueden ser reconocidos de manera diferencial por las células de la respuesta inmune innata^{69,80} a través de TLR-4, llevando a una activación de diferentes mecanismos de ésta, como son diferente patrón de secreción de citocinas, expresión de moléculas coestimuladoras, moléculas del MHC-II que puedan afectar la activación del linfocito T y por lo tanto de la respuesta adaptativa, siendo esto un posible mecanismo para explicar los resultados obtenidos en los títulos de anticuerpos.

Por otra parte la expresión de TLRs no está restringida a las células de la respuesta inmune innata sino que también se encuentran en células de la respuesta inmune adaptativa: linfocitos T y B^{6,10,49}, a su vez se ha descrito que la estimulación a través de TLRs como una tercera señal es requerida para la activación de linfocitos B⁸⁵, además de que existen datos que sugieren que este tipo de receptores pueden contribuir con señales de activación, proliferación o supervivencia de linfocitos B⁶⁷ por lo que el LPS modificado estructuralmente por la bacteria podría ser reconocido y activar de manera diferente a estas células dando otra posible explicación de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos podría deberse a la contribución tanto de la respuesta inmune innata como la adaptativa.

Estos resultados son de gran importancia, ya que de alguna manera nos pueden sugerir que la bacteria al estar dentro del hospedero y activar sus sistemas reguladores como PhoP/PhoQ o PmrA/PmrB, puede modular la respuesta de anticuerpos producidos frente a ella y favorecer la infección mediante la producción diferencial de las distintas sub-clases de anticuerpos, las cuales se sabe tienen función diferente.

Las bacterias con LPS modificado, indujeron una disminución en los títulos de anticuerpos, lo cual es de gran relevancia y sugiere que la bacteria puede regular el sistema inmune a su favor. Los títulos de anticuerpos miden de manera indirecta la cantidad de anticuerpos generados, sin embargo, no indican que estos se encuentren involucrados en la lisis bacteriana o en la inducción de fagocitosis u otros procesos involucrados en la generación de inmunidad (protección)⁸⁸. Así el estudio de la funcionalidad de los anticuerpos aporta información relevante sobre la respuesta inmune generada. Por ejemplo, se ha mostrado que *S. typhimurium* tiene la capacidad de bloquear mecanismos de presentación de antígenos por células dendríticas, de tal manera que la activación del linfocito T es baja y por lo tanto la respuesta frente a la bacteria disminuye. Cuando las bacterias se encuentran opsonizadas se favorece la internalización de éstas y la presentación de antígeno al linfocito T⁹⁷. Estos datos muestran lo relevante de medir la funcionalidad vs la cantidad de los anticuerpos.

Con base en lo arriba expuesto, analizamos la capacidad opsonización de los anticuerpos medida a través de la fagocitosis del complejo anticuerpo-bacteria en macrófagos. Los resultados muestran que las cepas que expresan los LPS modificados estructuralmente además de inducir un menor título de anticuerpos

inducen una menor opsonización y fagocitosis de la bacteria, esto pudiera *in vivo* generar oportunidades para que la bacteria evada la respuesta inmune y así incrementar su supervivencia.

S. typhimurium a través de los sistemas reguladores de dos componentes puede llevar a cabo modificaciones estructurales a un componente esencial y mayoritario en la superficie de la bacteria como lo es el LPS, esta estrategia le permitiría a la bacteria modular la respuesta inmune desde el reconocimiento por las APC hasta la producción de anticuerpos contribuyendo así a su supervivencia dentro del hospedero.

CONCLUSIÓN.

Las modificaciones estructurales del LPS que produce *S. typhimurium* por medio de los regulones phoP-phoQ y pmrA-pmrB, le permiten modificar tanto la respuesta inmune innata como la respuesta de anticuerpos del hospedero, estos efectos sobre el sistema inmune pudieran ayudar a la bacteria a evadir la respuesta inmune e incrementar sus oportunidades de supervivencia y reproducción en el hospedero.

ANEXO.

Reactivos utilizados para las determinaciones por ELISA.

Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7g

Fosfato monobásico de sodio 0.7g

Fosfato dibásico de sodio 2.7g

Disolver en 500mL de agua MilliQ, ajustar pH y llevar a volumen de 1000mL con agua MilliQ.

Solución amortiguadora de Carbonatos (SAC) pH 9.5

Pesar exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g

Carbonato de sodio 2.8 g

Disolver en 500 ml de agua MilliQ, ajustar el pH y llevar a volumen de 1000 mL con agua MilliQ.

Solución amortiguadora de citratos (SAC) pH 5.6

Pesar exactamente:

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

Disolver en 500 mL de agua MilliQ, ajustar pH y aforar con agua MilliQ a 1000mL

Solución de lavado (agua Tween 0.1%)

A cada litro de agua destilada agregar 1 mL de Tween 20 y disolver.

Solución de Bloqueo (PBS + leche 5%)

Pesar 5 g de leche descremada, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100 mL.

Nota: Esta solución debe ser utilizada el mismo día en que es preparada.

Solución de revelado.

Por cada 12 mL de SBC agregar 0.006g de OPD (SIGMA) y 10 μ L de H₂O₂ al 30% (SIGMA).

Nota: Esta solución debe utilizarse inmediatamente después de haberse preparado y debe mantenerse protegida de la luz.

Solución de H₂SO₄ 2.5 N

Medir 6.66 mL de ácido sulfúrico (98% pureza, δ 1.84) y transferir a un matraz volumétrico de 100mL con 50 mL de agua destilada, dejar enfriar y llevar al aforo con agua destilada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, A. *et al.* PhoP-induced genes within Salmonella pathogenicity island 1. *J. Bacteriol.* 188, 6889-6898 (2006).
2. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675-680 (2001).
3. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801 (2006).
4. al-Ramadi, B. K., Fernandez-Cabezudo, M. J., Ullah, A., El-Hasasna, H. & Flavell, R. A. CD154 is essential for protective immunity in experimental salmonella infection: evidence for a dual role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 176, 496-506 (2006).
5. Athman, R. & Philpott, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 25-32 (2004).
6. Bernasconi, N. L., Onai, N. & Lanzavecchia, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101, 4500-4504 (2003).

7. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845-859 (2004).
8. Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 169-176 (2003).
9. Biedzka-Sarek, M. & El, S. M. How to outwit the enemy: dendritic cells face Salmonella. *APMIS* 114, 589-600 (2006).
10. Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. & Mantovani, A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102, 956-963 (2003).
11. Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. Salmonella nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2465-2467 (2000).
12. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238-250 (2005).
13. Casadevall, A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect. Immun.* 71, 4225-4228 (2003).

14. Chattergoon, M. A., Robinson, T. M., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 160, 5707-5718 (1998).
15. Dixon, D. R. & Darveau, R. P. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J. Dent. Res.* 84, 584-595 (2005).
16. Dobrovolskaia, M. A. & Vogel, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes. Infect.* 4, 903-914 (2002).
17. Eckmann, L. & Kagnoff, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes. Infect.* 3, 1191-1200 (2001).
18. Eguchi, Y. & Utsumi, R. A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem. Sci.* 30, 70-72 (2005).
19. Fang, F. C. & Vazquez-Torres, A. Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 282, L941-L943 (2002).

20. Finlay, B. B. & Falkow, S. Salmonella interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 162, 1096-1106 (1990).
21. Gadjeva, M., Takahashi, K. & Thiel, S. Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule. *Mol. Immunol.* 41, 113-121 (2004).
22. Galan, J. E. Interaction of Salmonella with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 46-50 (1999).
23. Gangloff, S. C. *et al.* Influence of CD14 on ligand interactions between lipopolysaccharide and its receptor complex. *J. Immunol.* 175, 3940-3945 (2005).
24. Gavin, A. L. *et al.* Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 314, 1936-1938 (2006).
25. Germain, R. N. An innately interesting decade of research in immunology. *Nat. Med.* 10, 1307-1320 (2004).
26. Govoni, G. & Gros, P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.* 47, 277-284 (1998).

27. Groisman, E. A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* 183, 1835-1842 (2001).
28. Gronow, S. & Brade, H. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J. Endotoxin. Res.* 7, 3-23 (2001).
29. Gunn, J. S., Belden, W. J. & Miller, S. I. Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb. Pathog.* 25, 77-90 (1998).
30. Gunn, J. S., Ernst, R. K., McCoy, A. J. & Miller, S. I. Constitutive mutations of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transcriptional virulence regulator phoP. *Infect. Immun.* 68, 3758-3762 (2000).
31. Gunn, J. S. *et al.* PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* 27, 1171-1182 (1998).
32. Gunn, J. S. & Miller, S. I. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* 178, 6857-6864 (1996).

33. Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.* 68, 6139-6146 (2000).
34. Guo, L. *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* 276, 250-253 (1997).
35. Guo, L. *et al.* Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95, 189-198 (1998).
36. Henneke, P. & Golenbock, D. T. Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity. *J. Exp. Med.* 199, 1-4 (2004).
37. Hensel, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36, 1015-1023 (2000).
38. Hersh, D. *et al.* The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2396-2401 (1999).
39. Heyzer-Williams, M. G. B cells as effectors. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 354-361 (2003).

40. Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5, 971-974 (2004).
41. Hopkins, S. A., Niedergang, F., Corthesy-Theulaz, I. E. & Kraehenbuhl, J. P. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2, 59-68 (2000).
42. Imhof, B. A. & Urrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 432-444 (2004).
43. Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216 (2002).
44. Jang, M. H. *et al.* Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6110-6115 (2004).
45. Jantsch, J. *et al.* Intracellular activities of *Salmonella enterica* in murine dendritic cells. *Cell Microbiol.* 5, 933-945 (2003).
46. Jepson, M. A. & Clark, M. A. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes. Infect.* 3, 1183-1190 (2001).

47. Jones, B. D., Ghori, N. & Falkow, S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180, 15-23 (1994).
48. Joshi, T., Butchar, J. P. & Tridandapani, S. Fcγ receptor signaling in phagocytes. *Int. J. Hematol.* 84, 210-216 (2006).
49. Kabelitz, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 39-45 (2007).
50. Kalupahana, R., Emilianus, A. R., Maskell, D. & Blacklaws, B. Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing mutant lipid A with decreased endotoxicity causes maturation of murine dendritic cells. *Infect. Immun.* 71, 6132-6140 (2003).
51. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death. Differ.* 13, 816-825 (2006).
52. Kawasaki, K., Ernst, R. K. & Miller, S. I. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of Salmonella typhimurium, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 279, 20044-20048 (2004).

53. Kawasaki, K., Gomi, K. & Nishijima, M. Cutting edge: Gln22 of mouse MD-2 is essential for species-specific lipopolysaccharide mimetic action of taxol. *J. Immunol.* 166, 11-14 (2001).
54. Kelsall, B. L. & Strober, W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.* 183, 237-247 (1996).
55. Kopp, E. B. & Medzhitov, R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 13-18 (1999).
56. Latz, E. *et al.* The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *J. Endotoxin. Res.* 9, 375-380 (2003).
57. Linehan, S. A. & Holden, D. W. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunol. Lett.* 85, 183-192 (2003).
58. Mastroeni, P. & Menager, N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* 52, 453-459 (2003).
59. Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikachoen, T. & Yoshikai, Y. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and

4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* 95, 1378-1385 (2000).

60. McGreal, E. P., Martinez-Pomares, L. & Gordon, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.* 41, 1109-1121 (2004).
61. Medzhitov, R. *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258 (1998).
62. Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M. C. Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1, 379-385 (2000).
63. Michetti, P. *et al.* Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella typhimurium*. *Gastroenterology* 107, 915-923 (1994).
64. Miller, S. I. PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol. Microbiol.* 5, 2073-2078 (1991).
65. Miller, S. I., Ernst, R. K. & Bader, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 36-46 (2005).

66. Mittrucker, H. W. & Kaufmann, S. H. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* 67, 457-463 (2000).
67. Morse, H. C., III *et al.* Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia. *Leuk. Res.* 25, 169-178 (2001).
68. Munford, R. S. Detoxifying endotoxin: time, place and person. *J. Endotoxin. Res.* 11, 69-84 (2005).
69. Netea, M. G., van, D. M., Kullberg, B. J., Cavillon, J. M. & van der Meer, J. W. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* 23, 135-139 (2002).
70. Niess, J. H. *et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258 (2005).
71. Noland, B. W. *et al.* Structural studies of *Salmonella typhimurium* ArnB (PmrH) aminotransferase: a 4-amino-4-deoxy-L-arabinose lipopolysaccharide-modifying enzyme. *Structure.* 10, 1569-1580 (2002).
72. Oh, Y. K. *et al.* Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 64, 3877-3883 (1996).

73. Ohl, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 21, 279-288 (2004).
74. Peschel, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 10, 179-186 (2002).
75. Philpott, D. J. & Girardin, S. E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.* 41, 1099-1108 (2004).
76. Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124, 715-727 (2006).
77. Alpuche Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W. P. & Miller, S. I. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10079-10083 (1992).
78. Alpuche-Aranda, C. M., Berthiaume, E. P., Mock, B., Swanson, J. A. & Miller, S. I. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect. Immun.* 63, 4456-4462 (1995).

79. Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A. & Miller, S. I. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* 179, 601-608 (1994).
80. Pulendran, B. *et al.* Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 167, 5067-5076 (2001).
81. Raetz, C. R. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700 (2002).
82. Raupach, B. & Kaufmann, S. H. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 417-428 (2001).
83. Rescigno, M. *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361-367 (2001).
84. Romero Cabello, R. *Microbiología y Parasitología Humana.*, pp. 298-305 Editorial Médica Panamericana México, 1999.
85. Ruprecht, C. R. & Lanzavecchia, A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 810-816 (2006).

86. Schromm, A. B. *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267, 2008-2013 (2000).
87. Schwarz, K. *et al.* Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 1465-1470 (2003).
88. Secundino, I. *et al.* Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 117, 59-70 (2006).
89. Seydel, U., Schromm, A. B., Blunck, R. & Brandenburg, K. Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins. *Chem. Immunol.* 74, 5-24 (2000).
90. Shea, J. E., Beuzon, C. R., Gleeson, C., Mundy, R. & Holden, D. W. Influence of the Salmonella typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect. Immun.* 67, 213-219 (1999).
91. Shih, T. A., Meffre, E., Roederer, M. & Nussenzweig, M. C. Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 570-575 (2002).

92. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142-1162 (1973).
93. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
94. Takeuchi, O. & Akira, S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes. Infect.* 4, 887-895 (2002).
95. Tamayo, R., Ryan, S. S., McCoy, A. J. & Gunn, J. S. Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.* 70, 6770-6778 (2002).
96. Teixeira, M. M., Almeida, I. C. & Gazzinelli, R. T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes. Infect.* 4, 883-886 (2002).
97. Tobar, J. A., Gonzalez, P. A. & Kalergis, A. M. Salmonella escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fc gamma receptors on dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 4058-4065 (2004).

98. Triantafilou, M. & Triantafilou, K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin. Res.* 11, 5-11 (2005).
99. Underhill, D. M. Toll-like receptors: networking for success. *Eur. J. Immunol.* 33, 1767-1775 (2003).
100. Uppington, H. *et al.* Effect of immune serum and role of individual Fcγ receptors on the intracellular distribution and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages. *Immunology* 119, 147-158 (2006).
101. Waterman, S. R. & Holden, D. W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* 5, 501-511 (2003).
102. Wijburg, O. L. *et al.* Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J. Exp. Med.* 203, 21-26 (2006).
103. Worley, M. J., Nieman, G. S., Geddes, K. & Heffron, F. *Salmonella typhimurium* disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 17915-17920 (2006).

104. Wright, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 58-68 (2005).
105. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433 (1990).
106. Yang, R. B. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395, 284-288 (1998).
107. Zhang, S. *et al.* Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* 71, 1-12 (2003).