



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de las porinas de *Salmonella enterica* sobre las células presentadoras de antígeno

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Luis Alberto Ontiveros Padilla

TUTOR PRINCIPAL:

**Dr. Constantino III Roberto López Macías**

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, IMSS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**Dra. Gladis del Carmen Fragozo González**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

**Dra. Rosana Pelayo Camacho**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS

Ciudad de México. Septiembre, 2017



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.

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

**Este trabajo fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT CB-2015-256402 y por el IMSS a través del Fondo de Investigación en Salud: FIS/IMSS/PROT/G16/1607, ambos otorgados al Dr. Constantino López Macías.**

**Este proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud (CLIEIS) del IMSS con el número R-2017-3601-50.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Isibasi, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, confiar en mí desde el primer día y contribuir con sus enseñanzas en mi formación científica.

Al Dr. Constantino López, por brindarme su confianza y paciencia a lo largo del desarrollo de éste proyecto, por guiarme en el rumbo del proyecto y siempre estar disponible para cualquier vicisitud que se presentó durante todo éste tiempo.

A la Dra. Laura Bonifaz y a la Dra. Lourdes Arriaga, por permitirme colaborar con su equipo de trabajo y aprender las técnicas necesarias para llevar a cabo éste trabajo.

A la Dra. Gladis Fragoso y a la Dra. Rosana Pelayo por estar al pendiente de los avances obtenidos en el proyecto y aportar ideas importantes para el desarrollo del mismo.

Al Dr. Rodolfo Pastelin, por su apoyo durante el desarrollo del proyecto y por brindarme consejos técnicos y científicos al desarrollar mis experimentos.

Al M. en C. Alberto García Lozano, porque me permitió aprender de él las técnicas y metodología necesaria para llevar a cabo el presente trabajo, sin sus enseñanzas nada de esto hubiera sido posible.

A mis compañeros de la UIMIQ, Gustavo Aldapa, Núriban Valero, Marisol Pérez y Melissa Elizarrarás, por participar siempre en la discusión de los resultados, aportar ideas y por brindarme su apoyo incondicional.

A la Dra. Ingeborg Becker, al MVZ Daniel Sánchez, al Biol. Guillermo y a Ricardo Vargas por su apoyo durante los experimentos realizados en el bioterio de la unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el estímulo económico otorgado para mi asistencia a congresos nacionales e internacionales.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, por haber sido mi mejor ejemplo para esforzarme siempre y alcanzar mis sueños, por todo su cariño y apoyo en momentos difíciles.

A mis hermanos, Lourdes y Gerardo, por tener en ustedes a mis mejores amigos.

A mi familia, tíos, primos y abuelos por brindarme afecto cuando más lo necesité y ser mi soporte para enfrentar nuevos retos.

A mis amigos, Juan Manuel, Manuel, Armando, Ricardo, Víctor, Omar y Alejandro, por la ayuda y alegría que me han ofrecido en todo momento desde nuestra niñez.

## CONTENIDO

Relación de figuras y tablas.....	vi
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
Introducción.....	1
Células Presentadoras de Antígeno.....	1
Porinas de <i>Salmonella Typhi</i> .....	7
Justificación.....	12
Planteamiento del problema.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Particulares.....	13
Hipótesis.....	14
Diseño experimental y métodos.....	14
Modelo experimental.....	14
Animales de laboratorio.....	17
Biológicos.....	17
Activación de CPA en el sitio de inmunización.....	17
Identificación de subpoblaciones de DCs en GLD.....	19
Evaluación de la respuesta de linfocitos T.....	20
Resultados.....	22
Inmunización con porinas induce activación de CPA en el sitio de inmunización....	22
Inmunización con porinas induce activación de DCs residentes de ganglio.....	26
Inmunización con porinas induce migración y activación de DCs de la piel.....	28
Inmunización con porinas induce respuesta de linfocitos T de memoria.....	31
Discusión.....	37
Conclusiones.....	41
Perspectivas.....	42
Bibliografía.....	42

## RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Clasificación, inmunofenotipo y características de las subpoblaciones de DCs identificadas en ganglio.....	3
Figura 1. Proceso de presentación de antígeno de una CPA al linfocito T.....	6
Figura 2. Diagrama de la estructura trimérica de la porina OmpF de <i>E. coli</i> .....	8
Tabla 2. Controles de inmunización usados en para conocer la activación y migración de CPA inducida por la Inmunización con porinas.....	14
Tabla 3. Controles de inmunización usados para conocer la respuesta de células T inducida por la inmunización con porinas.....	15
Tabla 4. Panel de anticuerpos anti-ratón usados para identificar fenotipo de activación de CPA en piel por inmunofluorescencia.....	18
Tabla 5. Panel de anticuerpos anti-ratón usados para identificar subpoblaciones de DCs por citometría de flujo.....	19
Figura 3. Estrategia de análisis para identificar subpoblaciones de DCs por citometría de flujo.....	20
Tabla 6. Panel de anticuerpos anti-ratón para identificar linfocitos T CD4 de memoria en ganglio por citometría de flujo.....	21
Figura 4. Estrategía de análisis para identificar linfocitos T CD4+ de memoria por citometría de flujo.....	22
Figura 5. La inmunización con porinas aumenta la expresión de MHC-II en CPA del sitio de inmunización.....	23
Figura 6. La inmunización con porinas aumenta la cantidad de CPA CD40+ en el sitio de inmunización.....	24
Figura 7. La inmunización con porinas aumenta la expresión de CD86 en CPA del sitio de inmunización.....	25
Figura 8. La inmunización con porinas no aumenta la cantidad de células PD-L1+ ni su expresión en CPA del sitio de inmunización.....	26
Figura 9. La inmunización con porinas incrementa el número y activación de las subpoblaciones de DCs residentes de ganglio.....	27
Figura 10. La inmunización con porinas incrementa el número y activación de todas las subpoblaciones de DCs residentes de piel.....	30
Figura 11. Comparación de la cantidad y activación de las subpoblaciones de DCs presentes en GLD al inmunizar con porinas.....	31

Figura 12. Inmunización con porinas aumenta la respuesta de memoria celular contra ellas mismas y contra antígenos co-inmunizados.....32

Figura 13. Inmunización con porinas aumenta la cantidad de células T CD4+, T CD4+ de memoria central y T CD4 de memoria efectora en GLD contra antígenos co-inmunizados.....33

Figura 14. Inmunización con porinas aumenta la cantidad de células T CD4+ y T CD4+ de memoria efectora en el sitio de inmunización.....34

Figura 15. Esquema de la respuesta de DCs y linfocitos T CD4+ de memoria inducida por la inmunización con porinas.....36



## ABREVIATURAS

CPA	Célula(s) presentadora(s) de antígeno
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
GLD	Ganglio linfático drenante
DCs	Células dendríticas
rDCs	Células dendríticas residentes de ganglio linfático drenante
miDCs	Células dendríticas migratorias a ganglio linfático drenante
rDC CD8a+	Células dendríticas residentes CD8-alfa+
rDC CD8a	Células dendríticas residentes CD8-alfa-
dDC	Células dendríticas dermales
mdDC	Células dendríticas dermales derivadas de monocitos
Lang+ dDC	Células dendríticas dermales Langerina+
LC	Células de Langerhans
TCR	Receptor de células T
ME	Memoria efectora
MC	Memoria central
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos-salina
POR	Porinas de <i>Salmonella Typhi</i>
VEH	Vehículo de inmunización para porinas
PORK	Porina digerida en proteinasa K
LPS	Lipopolisacárido
CON	Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i>
CT	Toxina del cólera
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardada

## RESUMEN

La inducción de una respuesta protectora de larga duración es una característica que se desea alcanzar durante el desarrollo de una vacuna. Las porinas de *Salmonella Typhi* son un ejemplo de candidatos vacunales que inducen dicha respuesta, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que se alcanza ésta característica.

En el presente proyecto se plantea el estudio *in vivo* de los mecanismos del sistema inmune innato activados por las porinas, específicamente los efectos que tienen las porinas en las células presentadoras de antígeno en cuanto a activación, migración y función al ser inmunizadas. Para ello se inmunizaron ratones con porinas vía intradérmica, obteniendo la piel del sitio de inmunización y el ganglio linfático drenante para estudiar la expresión de moléculas de activación e identificación de diferentes tipos de células presentadoras de antígeno.

Los resultados mostraron que las células presentadoras de antígeno de la piel incrementaron su expresión de moléculas de superficie como MHC-II y CD86 y se aumentó la cantidad de células presentadoras de antígeno CD40+. El fenotipo de activación en las CPA del sitio de inmunización correlacionó con un incremento en cantidad y activación de distintas subpoblaciones de células dendríticas de piel migrantes a ganglio. De igual forma, la inmunización con porinas indujo un incremento en cantidad y activación de DCs CD8a- y CD8a+ residentes del ganglio linfático drenante. Por último se encontró, que las porinas al ser utilizadas como adyuvante, incrementan la respuesta de células T de memoria contra el antígeno coimmunizado tanto en el ganglio como en el sitio de inmunización, mientras que la respuesta de memoria contra las porinas se encontraba localizada sólo en el sitio de inmunización.

Los resultados del estudio indican que las porinas son capaces de activar a las células presentadoras de antígeno del sitio de inmunización, inducen su migración a ganglio y son capaces de activar a las células dendríticas que son residentes de ese tejido, corroborando que éstas señales de activación en células presentadoras de antígeno se tradujo en la activación de células T de memoria.

## **ABSTRACT**

The induction of a long-lasting protective response is a characteristic hard to achieve during the vaccine development. *Salmonella* Typhi porins are an example of vaccine candidates that induce this type of response, however, the mechanism by which it is achieved remains unknown.

In the present project we propose the *in vivo* study of mechanisms of innate immune activated by porins, specifically the effects of porins on antigen-presenting cells regarding activation, migration and function, when they are immunized. We immunized mice intradermally with porins, skin of the immunization site and local draining lymph nodes were obtained to study expression of activation and identification molecules in antigen-presenting cells.

The results showed that antigen presenting cells change their phenotype after recognize porins in the immunization site, increasing the expression of surface molecules such as MHC-II and CD86 and increasing the amount of antigen presenting cells CD40+. The activation phenotype on site immunization APCs correlated with an increase in amount and activation of all migratory skin DCs subsets present into the lymph node. Likewise, porins induced an exacerbated increase in cellularity and activation of CD8a- and CD8a+ lymph node resident DCs subsets. Finally it was found that porins used as adjuvants, increase the T cell memory response against the co-immunized antigen in the node and the immunization site, while the memory response against porins was located only at the immunization site.

The above results indicate that porins are capable of activate antigen-presenting cells in the immunization site, induced their migration to the lymph node and activate resident dendritic cells, also corroborating that the signals induced by the porins in the antigen-presenting cells, results in the activation of memory T cells.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Células presentadoras de antígeno**

El sistema inmune innato participa de manera muy importante en la activación y modulación de la respuesta inmune adaptativa, principalmente gracias a las células presentadoras de antígeno (CPA) [1]. Las CPA se definen como aquellas células que presentan antígenos en contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T con receptores específicos para el antígeno [2]. Las CPA se pueden dividir según su capacidad de activar a los linfocitos T, en dos grupos, las CPA profesionales y las CPA no profesionales o amateurs [3].

Las CPA no profesionales se caracterizan por presentar sólo MHC de clase I y no expresar MHC de clase II, ni moléculas de coestimulación al presentar el antígeno al linfocito T. Dentro de las CPA no profesionales encontramos prácticamente a todas las células nucleadas del organismo con excepción de las pertenecientes a las CPA profesionales [4].

Las CPA profesionales se caracterizan por presentar constitutivamente MHC-I y MHC-II y son capaces de expresar moléculas de coestimulación para activar a linfocitos T. Dentro del grupo de CPA profesionales se encuentran los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas (DCs), siendo éstas últimas las que mayor capacidad poseen para activar a los linfocitos T [4]. Recientemente, se ha descrito que algunas CPA no profesionales como los granulocitos, células epiteliales y las células linfoides innatas son capaces de expresar MHC-II y moléculas de coestimulación bajo condiciones de infección o inmunización, sin embargo, como la expresión de MHC-II es inducible, no se consideran CPA profesionales [4].

Aunque el grupo de las CPA no profesionales abarca un mayor número de estirpes celulares en el organismo, las CPA profesionales se encuentran distribuidas en todo el organismo con el fin de captar antígenos en la periferia y presentar el antígeno a los linfocitos T, ya sea en los órganos linfoides secundarios o en el mismo tejido

periférico a los linfocitos T residentes de dicho tejido. Las tres CPA profesionales se encuentran formando parte en los órganos linfoides secundarios (como el ganglio linfático), para realizar su función y asegurar el montaje la respuesta inmune [5].

Fuera de los órganos linfoides secundarios, las únicas CPA profesionales que forman parte de tejidos extra-linfáticos (excluyendo sangre y linfa) son los macrófagos y las DCs. Los macrófagos en tejidos periféricos se caracterizan por tener una función fagocítica de antígenos que llegan a dichos tejidos y presentar el antígeno principalmente a los linfocitos T residentes de tejido [6].

Por otro lado, las DCs, son las CPA profesionales que tienen una mayor capacidad de activar al linfocito T ya que presentan una mayor expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras, además de su capacidad de migrar hacia los ganglios linfáticos drenantes (GLD) desde la periferia cuando tienen contacto con un antígeno para presentar el antígeno a los linfocitos T del ganglio [7], por lo que han sido las CPA más estudiadas en el desarrollo de la respuesta inmune.

Las DCs se pueden dividir en dos grandes grupos, las DCs residentes de ganglio linfático y las DCs migratorias, que se diferencian debido a que las migratorias expresan MHC-II en mayor cantidad que las residentes (MHC-II Hi/Low), además de que algunas DCs residentes pueden expresar la cadena alfa de CD8 [8].

Adicionalmente, se pueden identificar mediante fenotipificación por citometría de flujo, subpoblaciones de DCs migratorias y residentes en GLD. Hasta el momento, dentro del grupo de DCs residentes, se han identificado dos subpoblaciones, mientras que para las DCs migratorias se han descrito cuatro subpoblaciones, tres DCs residentes en la dermis y una residente en la epidermis (células de Langerhans) [8]. Las características y fenotipo de las subpoblaciones de DCs se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.- Clasificación, inmunofenotipo y características de las subpoblaciones de DCs identificadas en ganglio [8].**

<u>Nombre de la población de DCs</u>	<u>Nombre de la subpoblación de DCs</u>	<u>Inmunofenotipo</u>	<u>Características</u>
DCs residentes (rDCs)	DCs residentes CD8- $\alpha$ + (rDC CD8 $\alpha$ +)	MHC-II Low, CD11c+, CD8 $\alpha$ +	Activación de linfocitos T CD8+
	DCs residentes CD8- $\alpha$ - (rDC CD8 $\alpha$ -)	MHC-II Low, CD11c+, CD8 $\alpha$ -	Activación de linfocitos T CD4+
DCs migratorias (miDCs)	DCs dermales (dDC)	MHC-II Hi, CD11c+, Langerina-, CD11b-	Población mayoritaria de miDCs en dermis
	DCs dermales derivadas de monocitos (mdDC)	MHC-II Hi, CD11c+, Langerina-, CD11b+	Producen un ambiente inflamatorio en dermis
	Células de Langerhans (LC)	MHC-II Hi, CD11c+, Langerina+, CD11b+, CD103-	Población mayoritaria de miDCs en epidermis.
	DCs dermales Langerina+ (Lang+ dDC)	MHC-II Hi, CD11c+, Langerina+, CD11b-, CD103+	Población que sirve de "pool" para recambio de las LC.

La forma en que migran las subpoblaciones de DCs migratorias ha sido poco estudiada, sin embargo, se pueden encontrar en GLD desde las 24 horas después del contacto con el antígeno en la periferia [8]. Algunas de ellas, como las células de Langerhans al reconocer antígenos como la toxina del cólera (CT), continúan el proceso de migración alcanzando un máximo de celularidad en GLD a las 72 horas post-estímulo y se alcanzan los niveles basales de celularidad a las 336 horas tras el estímulo [9-11].

Las células presentadoras de antígeno son esenciales para la activación de linfocitos T CD4 mediante la presentación de antígeno en contexto de MHC-II, mientras que la activación de linfocitos T CD8 ocurre en contexto de MHC-I [12]; por ello se consideran como el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, por lo que resulta importante conocer su comportamiento, ya que de ellas dependerá el tipo de respuesta inmune adaptativa que se montará.

El reconocimiento de los agentes infecciosos por parte de las CPA se lleva a cabo a través de un sistema de receptores a los que se les denomina Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs de sus siglas en inglés) que están presentes en diversas células del sistema inmune y cuyos ligandos son denominados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs de sus siglas en inglés). Ejemplos de PAMPs lo son: el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram(-), peptidoglicanos, ssRNA, etc. así como a moléculas liberadas por daño o estrés celular [13].

Existe una amplia variedad de PRR, como los Receptores Tipo Toll (TLR), Receptores Tipo RIG (RLR), Receptores Tipo NOD (NLR), Receptores Tipo AIM2 (ALR) y receptores purinérgicos, expresados principalmente en CPA como monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas [14].

La activación de las CPA a través de PRR provoca un cambio en su fenotipo, incrementando la presencia del MHC y de moléculas de coestimulación en la membrana de la célula. Además, la activación de las CPA a través de PRR induce la expresión de mediadores solubles llamadas citocinas, que junto con las moléculas descritas anteriormente, indicarán la diferenciación específica que tendrá el linfocito activado y si la respuesta inmune generada será de memoria o no [15].

En la presentación de antígeno, la CPA internaliza al antígeno por medio de vesículas y los procesa dando origen a péptidos, de entre los cuales los que tienen una longitud de aproximadamente 10-12 aminoácidos y los motivos estructurales adecuados, serán presentados a través de las moléculas de MHC-II al receptor de células T (TCR) al linfocito T. La molécula del MHC interacciona de manera antígeno-específica con un TCR preformado en una clona de linfocitos T para asegurar que se monte una respuesta inmune específica para cada antígeno o agente patógeno [12].

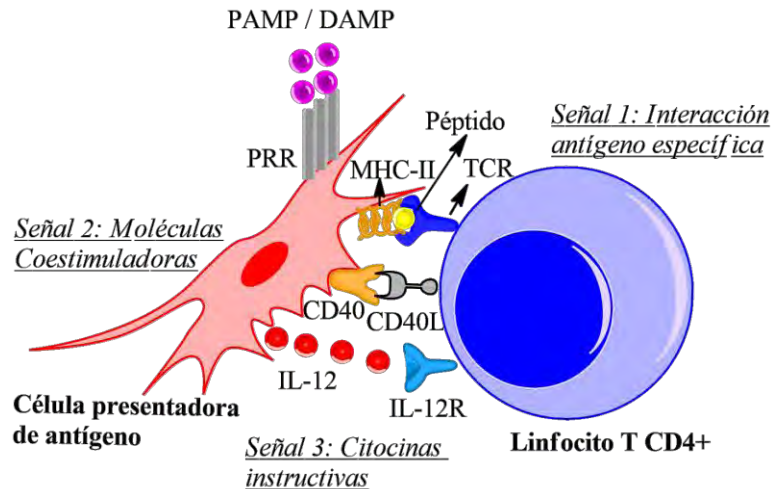
Además de la interacción antígeno-específica entre el MHC y el TCR, la presentación de antígeno tiene más interacciones entre la CPA y el linfocito T, una segunda señal se encuentra modulada por moléculas que potencian la activación de linfocitos T, éstas son llamadas moléculas coestimuladoras y entre las más estudiadas destacan CD40, CD80 y CD86 [4]. De igual forma, existe expresión de moléculas coinhibitorias en la membrana celular de las CPA que modulan negativamente la activación del linfocito T, dicha expresión ocurre únicamente después de la activación del linfocito T para detener la respuesta inducida contra el antígeno. Entre las moléculas coinhibitorias más estudiadas destacan la familia de proteínas PD-L [16].

Las moléculas coestimuladoras y coinhibitorias se han estudiado como marcadores de activación e inhibición de una CPA al reconocer y procesar un antígeno, por lo que su expresión se usa como modelo para medir la inmunogenicidad de distintas moléculas. En modelos *in vitro*, algunas moléculas, como el LPS son capaces de inducir la expresión de CD86 y CD40 en DCs *in vitro* a partir de las 6 horas post-estimulación y mantenerla por más de 48 horas después del estímulo [17].

La tercera señal que ha sido estudiada en la presentación de antígeno, consiste en la expresión de citocinas, que al encontrar a su receptor en los linfocitos T, guiarán la diferenciación específica de dicha célula y el tipo de respuesta montada (Th1, Th2, Th17, etc.) [18].

El proceso de presentación de antígeno se esquematiza en la siguiente figura:





**Figura 1.- Proceso de presentación de antígeno de una CPA al linfocito T.** La interacción de moléculas expresadas en la CPA, como MHC, CD40 e IL12, permiten la interacción con el TCR, CD40L e IL-12R del linfocito T (Modificado de [4]).

Después de la activación del linfocito T por éstas tres señales, una porción de las clonas se diferenciará en el ganglio para ser células efectoras y otra porción se diferenciarán hacia células de memoria. Tras su activación, los linfocitos T podrán migrar al sitio donde se indujo el primer contacto con el antígeno (priming inmunológico) para asegurar un montaje más rápido y eficiente de la respuesta inmune. Los linfocitos de memoria que se localizan en el sitio de contacto con el antígeno se nombran como células T de memoria efectora (ME) y se caracterizan por expresar altos niveles de CD44 y la ausencia de CD62L en ratón (fenotipo CD3+, CD4+, CD44 Hi, CD62L-) [19].

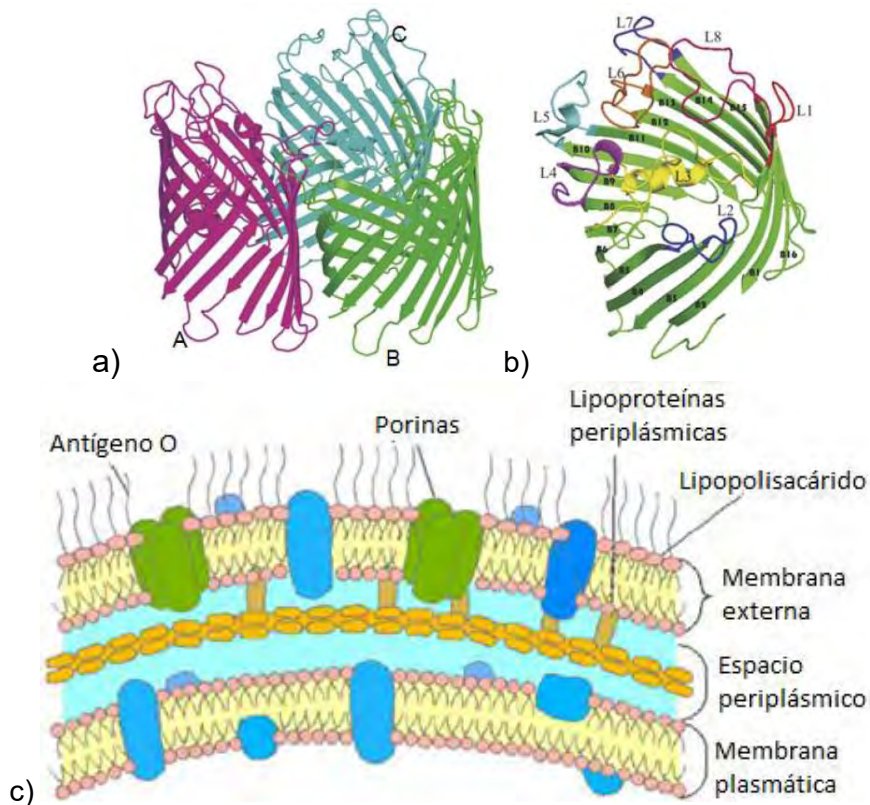
Por otra parte, las clonas que se mantienen en el ganglio para ser la fuente de células ME se nombran células T de memoria central (MC) y se caracterizan por expresar altos niveles de CD44 y CD62L (fenotipo CD3+, CD4+, CD44 Hi, CD62L+) [19]. La respuesta celular de memoria se puede medir indirectamente mediante la técnica de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH por sus siglas en inglés), en la que se inmuniza de manera intradérmica al antígeno de interés y se mide el grosor de la pápula ocasionada en el sitio de inmunización a las 24 o 48 horas post-inmunización [20].

Se ha comprobado, mediante modelos con ratones *knockout* para TLR-2 y TLR-4 y sus proteínas adaptadoras de señalización MyD88 y TRIF, que la activación de CPA a través de ambos TLR es esencial para inducir moléculas de activación en su superficie [21].

Como se ha mencionado, la presencia de las moléculas de activación o coestimulación en CPA y la migración de las células dendríticas para la activación de linfocitos T en órganos linfoides secundarios, son características cruciales para el montaje de la respuesta inmune y resulta sumamente importante el estudio de éstos fenómenos para el diseño racional de vacunas.

### **Porinas de *Salmonella Typhi*.**

Las porinas son las proteínas de membrana externa más abundantes en bacterias Gram negativas, cada bacteria expresa aproximadamente  $10^5$  moléculas en su superficie. Su principal función es facilitar el transporte de solutos hidrofílicos con un peso molecular menor a 600 Da a través de la membrana externa. Se ensamblan en trímeros compuestos por subunidades idénticas, cada subunidad consiste en 16 hojas  $\beta$ -plegadas anti-paralelas unidas por asas con  $\alpha$ -hélices intercaladas. Cada monómero expone ocho asas cortas hacia el espacio periplásmico y ocho asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. La forma cilíndrica que caracteriza a las porinas, se forma al cerrarse las estructuras  $\beta$ -plegadas de forma pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja  $\beta$ -16 y el extremo amino de la hoja  $\beta$ -1 (Fig. 1) [22].



**Figura 2.- Diagrama de la estructura trimérica de la porina OmpF de E. coli.** a) Monómeros coloreados en magenta A, verde B y azul C. b) Monómero con asas externas de diversos colores, las hojas  $\beta$  se muestran en verde [22]. c) Trimerio de porinas ensambladas en la membrana externa (en verde) [23].

En nuestro grupo de trabajo se encontró que los sueros de pacientes con fiebre tifoidea contenían altos títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos para proteínas de membrana externa (OMP) de *Salmonella Typhi*. Éstas OMPs corresponden a un peso molecular de 34 y 37 KDa y se habían descrito anteriormente como porinas. [24]

Estas proteínas fueron purificadas de *Salmonella Typhi* mediante el método de Nikaido [25], que brevemente, consiste en crecer a la bacteria en medio mínimo suplementado con glucosa, se lisa a la bacteria por presión y se centrifuga el lisado para obtener la fracción membranal. Se separa la fracción membranal, se disuelve en SDS y el extracto se eluye por cromatografía de líquidos en una columna de exclusión molecular de Sephacryl S-200 hasta recolectar la fracción correspondiente a la de porinas. Al obtener a las porinas purificadas se les realiza

una prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) para identificar la cantidad de endotoxina (LPS) asociadas a ellas, sólo los lotes que estuvieron por debajo del límite de detección de la prueba (menor a 0.02 ng de endotoxina / 10ug de proteína) fueron y serán usadas para su inmunización.

Ratones inmunizados con porinas purificadas fueron protegidos ante un reto de 500 DL<sub>50</sub> de ésta bacteria [25]. De igual forma, se inmunizaron humanos con porinas purificadas con estándares de buenas prácticas de manufactura que pasaron los exámenes de toxicidad y preclínicos y se encontró que las porinas fueron seguras, bien toleradas e indujeron proliferación de células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T productores de Interferón gamma, así como anticuerpos bactericidas [26].

### **Porinas de *Salmonella Typhi* inducen respuesta de anticuerpos de larga duración**

En los estudios preclínicos en ratones y en el estudio clínico en humanos realizados por nuestro laboratorio, se encontró que la inmunización con porinas indujo anticuerpos bactericidas y que éstos anticuerpos se mantuvieron a lo largo de toda la vida de los ratones inmunizados con dos dosis de 10 microgramos [27]. Esta respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con porinas es un comportamiento poco común ante inmunizaciones con otras proteínas bacterianas, por ejemplo, otros estudios de medición de anticuerpos tras inmunizaciones con proteínas de superficie externa (Osp) de espiroquetas como *Borrelia burgdorferi*, en los que la respuesta de anticuerpos decae antes de los 30 días después de la última inmunización [28].

Por otro lado, se evaluó la respuesta de anticuerpos en los voluntarios del ensayo clínico 11 años después de la administración de una sola dosis de 10 microgramos de porinas, y se encontró la presencia de 4 títulos de anticuerpos IgG e IgM contra la bacteria por encima de los títulos del grupo control [29].

En su conjunto, los resultados obtenidos señalan que las porinas son potentes inmunógenos capaces de inducir de manera segura anticuerpos bactericidas de larga duración. Estas propiedades son de suma relevancia para el diseño racional de nuevas vacunas y adyuvantes, ya que se buscan inmunógenos seguros que induzcan protección de larga duración. Este panorama ilustra la importancia de conocer los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la inducción de protección de larga duración, información que nos permitirá el desarrollo de mejores estrategias para la prevención y tratamiento de enfermedades.

### **Las porinas de *Salmonella Typhi* inducen respuesta celular en ratones y humanos**

Después de conocer la respuesta humoral inducida al inmunizar con porinas en ratones y humanos, se caracterizó la respuesta de los linfocitos T tras reconocer péptidos propios de las porinas, y se encontró que las porinas eran capaces de activar una respuesta T dependiente, indujeron proliferación de linfocitos CD4+ en ratones inmunizados y se observó que éstas células se encargaban de producir IFN- $\gamma$ . El mismo efecto se observó en humanos vacunados con porinas, encontrando un incremento significativo en el índice de proliferación de células mononucleares de sangre periférica caracterizada por la presencia de IFN- $\gamma$  [29].

Así mismo, se observó que en personas vacunadas con la vacuna Ty21a y en pacientes con fiebre tifoidea, se genera una respuesta proliferativa de linfocitos T al reestimularlos con porinas de *S. Typhi* mayor a la obtenida al estimular a linfocitos T de individuos no vacunados. Lo anterior indica que la respuesta inmune celular que se observa por la vacuna con bacteria inactivada, es en parte debida a los mecanismos activados por las porinas de *S. Typhi* y que éstas proteínas tienen capacidad de activar a la respuesta inmune celular en humanos [30].

## Las porinas de *Salmonella Typhi* inducen la activación de CPA *ex vivo*

La inusual capacidad inmunogénica de las porinas hace evidente la participación de la respuesta inmune innata, sin embargo los mecanismos involucrados en esto, han sido poco explorados.

Como se ha mencionado, el reconocimiento primario de un antígeno por las CPA, componentes importantes de la respuesta inmune innata, se realiza mediante PRR. Entre los PRR más estudiados se encuentran los Receptores Tipo Toll (TLR).

Para entender los mecanismos de producción de anticuerpos de larga duración inducidos por porinas y la participación de la respuesta inmune innata en éste fenómeno, se investigó si las porinas son reconocidas por el sistema inmune innato, para ello se utilizó un modelo de células HEK transfectadas con TLR2 y TLR4 humanos, las cuales, al ser estimuladas con porinas, produjeron la interleucina 8 (IL-8), que es utilizada como medida de activación del receptor. Éstos resultados indican que las porinas son ligandos de TLR2 y TLR4, lo que bioquímicamente se puede deber a que el TLR2 es capaz de reconocer péptidos acilados y el TLR4 proteínas de choque térmico (Hsp), es decir, reconocen proteínas que pueden tener dominios compartidos con las porinas de *S. enterica* [31]. Adicionalmente se inmunizaron con porinas ratones deficientes de TLR y se observó la disminución de los títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos en los ratones deficientes de TLR comparado con los ratones control [32]. Estos datos muestran la importante contribución de TLR2 y TLR4 en la producción de anticuerpos específicos contra porinas.

Al realizar estudios de activación de CPA mediante estimulaciones con porinas, se observó que la expresión de CD40 y CD86 en las células dendríticas se encontraba significativamente disminuida en los ratones deficientes de ambos TLR. Se encontró

que las porinas activan las dos vías de señalización del TLR (la vía MyD88 y la vía TRIF) lo que explica la eficiente activación de la respuesta inmune innata [32].

Los mecanismos arriba descritos participan de manera importante en la activación de la respuesta inmune innata desencadenada por los adyuvantes, en particular los de origen bacteriano, debido a esto se investigó si las porinas al ser ligandos de TLRs, pudieran tener capacidad adyuvante. Para ello, se inmunizaron ratones con el virus de influenza inactivado por calor, antígeno Vi u ovoalbúmina solos, o mezclados con porinas. Los resultados mostraron que las porinas, al ser inmunizadas, inducen un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos específica contra los antígenos coinmunizados [33].

En su conjunto estos antecedentes muestran que las porinas son potentes inmunógenos con capacidad adyuvante intrínseca, por lo que en el presente proyecto se plantea el estudio de los mecanismos de activación del sistema inmune innato inducidos por las porinas. Se pretende principalmente, conocer qué moléculas de activación son inducidas en las células presentadoras de antígeno *in vivo*, en particular en el sitio en donde son inmunizadas las porinas de *Salmonella enterica* y conocer las subpoblaciones de CPA capaces de migrar al ganglio linfático para la activación de los linfocitos T.

## **II.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

Se desconoce el fenotipo de activación *in vivo* de las CPA y las subpoblaciones de éstas que son movilizadas a los ganglios linfáticos después de la inmunización con porinas de *S. Typhi*. Este conocimiento es de fundamental importancia para entender la inusual inmunogenicidad de éstas proteínas y su capacidad de inducir una respuesta bactericida de larga duración. Estos conocimientos serán muy valiosos para el desarrollo racional de nuevas vacunas y adyuvantes.

### **III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los mecanismos de activación de la respuesta inmune innata inducidos por las porinas no se conocen, en particular los efectos que ejercen sobre las CPA. Debido a que las CPA son centrales para activar y modular la respuesta inmune adaptativa, consideramos que es de fundamental importancia el estudio de estos mecanismos, de tal forma que nos permita entender la biología de la respuesta inmune protectora inducida por las porinas.

### **IV.- OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar *in vivo* las células presentadoras de antígeno activadas por la inmunización con porinas de *Salmonella Typhi*.

### **V.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Caracterizar el perfil de activación de las células presentadoras de antígeno del sitio de inmunización con porinas, a través de la expresión de moléculas de superficie.
- 2.- Identificar el inmunofenotipo de las subpoblaciones de células dendríticas, que son reclutadas al ganglio linfático drenante (GLD) después de la inmunización con porinas de *Salmonella* en ratones.
- 3.- Caracterizar la respuesta de células T de memoria inducida por la inmunización con porinas en el sitio de inmunización y en ganglios de ratones inmunizados.



## VI.- HIPÓTESIS

La inmunización con porinas inducirá la activación de células presentadoras de antígeno desde las 12 horas en el sitio de inmunización, inducirá la migración de células dendríticas epidermales y dermales hacia los ganglios linfáticos drenantes e inducirán linfocitos T CD4+ de memoria.

## VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

### Modelo experimental

Se estudió la activación de CPA y migración de DCs inmunizando como antígeno a las porinas de *S. Typhi* y los controles descritos en la tabla 2.

**Tabla 2.- Controles de inmunización usados en para conocer la activación y migración de CPA inducidas por la inmunización con porinas.**

CONDICIÓN	ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
Vehículo	VEH	Control negativo para la activación y migración de CPA. Es un buffer Tris en el que se encuentran las porinas de <i>S. Typhi</i> al ser inmunizadas.
Porina digerida en proteínasa K	PORK	Control negativo para la activación y migración de CPA. Las porinas inmunizadas contienen trazas de lipopolisacárido, con éste control se digiere la porina con una serin-proteasa como lo es la proteínasa K. Tras la digestión de la proteína se logrará observar el efecto de la traza de LPS en la inmunización.
Lipopolisacárido de <i>Salmonella typhosa</i> (Control usado sólo para el experimento de activación de CPA)	LPS	Control positivo para el experimento de activación de CPA. El lipopolisacárido es un potente inmunógeno que induce activación de CPA al señalizar por TLR4 [13].

<b>Toxina de <i>Vibrio cholerae</i> + conidio de <i>Sporothrix schenkkii</i> (Control usado sólo para el experimento de migración de DCs)</b>	CT+C	Control positivo para el experimento de migración de DCs. La CT un potente adyuvante compuesto por dos subunidades que activa DCs. El conidio es un antígeno poco inmunogénico que al ser inmunizado con un adyuvante como la toxina induce migración de células dendríticas de piel hacia GLD [34].
<b>Porinas <i>S. Typhi</i></b>	POR	Proteína problema. OmpC y OmpF son las porinas mayoritarias expresadas en <i>S. Typhi</i> .

Para conocer la respuesta de células T inducida al inmunizar con las porinas, se usó un modelo de DTH en el que se inmunizaron a las porinas como adyuvantes y como antígenos y se midió la respuesta de memoria contra el antígeno coinmunizado o contra sí mismas. Para éste experimento se utilizó un antígeno que no indujera respuesta de memoria de células T, como lo es el conidio de *Sporothrix schenkkii* [34], además se usaron los controles de inmunización de la tabla 3.

El conidio de *S. schenkkii* es la fase vegetativa de dicho hongo y posee distintas proteínas, lípidos y carbohidratos en su membrana, sin embargo dichas moléculas no son capaces de activar eficientemente CPA, por lo que no induce gran activación de células T [34].

**Tabla 3.- Controles de inmunización usados para conocer la respuesta de células T inducidas por la inmunización con porinas.**

<b>PRIMERA INMUNIZACIÓN (PRIMING)</b>	<b>RETO ANTIGÉNICO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>ABREVIACIÓN</b>
<b>Vehículo (-) + Conidio de <i>Sporothrix schenkkii</i></b>	<b>Conidio de <i>Sporothrix schenkkii</i></b>	Control negativo usando el vehículo en el que se inmunizan las porinas en el priming inmunológico. Se añade el conidio para asegurar que por sí mismo no	VEH+C

		induce respuesta de memoria.	
<b>Porina digerida en proteinasa K + Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i> (-)</b>	<b>Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i></b>	Control negativo en el que se desea observar el efecto de las trazas de LPS presente en las porinas inmunizadas durante el priming inmunológico. Las porinas se digieren con una serin-proteasa como lo es la proteinasa K y sólo queda LPS remanente. Se añade el conidio para asegurar que por sí mismo no induce respuesta de memoria.	PORK+C
<b>Toxina de <i>Vibrio cholerae</i> + Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i> (+)</b>	<b>Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i></b>	Control positivo del experimento en el que se ha demostrado que la toxina de <i>V. cholerae</i> , usada como adyuvante, es capaz de activar CPA e inducir la activación de células T al inmunizarse con un antígeno modelo [28]. Se usa el conidio como antígeno.	CT+C
<b>Porinas S. Typhi + Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i></b>	<b>Conidio de <i>Sporothrix schenkii</i></b>	Proteína problema que se usa como adyuvante con el conidio como antígeno modelo. La eficiente activación de CPA permitirá la activación de células T de memoria contra el conidio.	POR+C
<b>Porinas S. Typhi</b>	<b>Porinas S. Typhi</b>	Proteína problema de la que se espera ver la activación de células T de memoria contra las porinas, al inmunizarla homológamente durante el priming y como antígeno modelo.	POR+POR

## **Animales de Laboratorio**

Se adquirieron ratones de la cepa C57BL6/J machos de 6-8 semanas y de la cepa C57BL6/J MHC-II-GFP (cepa que expresa a la proteína verde fluorescente o GFP como reportero de la expresión de MHC-II) de la casa comercial Envigo® y se mantuvieron durante la duración de los experimentos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM.

## **Biológicos**

Porinas purificadas por el método de Nikaido a partir de la cepa de *Salmonella* Typhi ATCC 9993, producidas en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Conidios purificados de *Sporothrix schenckii* inactivados por calor, producidos en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Lipopolisacárido de *Salmonella typhosa* SIGMA (cat. L2387; lote 072K4082)

Toxina de *Vibrio cholerae* SIGMA (cat. C8052).

## **Activación de CPA en el sitio de inmunización**

Se inmunizaron intradérmicamente en la oreja derecha, grupos de 4 ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) con 10 ug de porinas, 10 ug de PORK, 10 uL de vehículo y 1 ug de LPS, a las 12 horas post-inmunización se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajeron las epidermis de las orejas inmunizadas. Se

preparó la dilución 1:100 de los anticuerpos indicados en la tabla 4 (preparando en total 100 uL por cada oreja), cada anticuerpo se diluyó por separado en buffer de FACS®. Los 100 uL de anticuerpo diluido se depositaron en los diferentes pozos de placa de 96 pozos.

**Tabla 4.- Panel de anticuerpos anti-ratón usados para identificar fenotipo de activación de CPA en piel por inmunofluorescencia.**

<b>ANTICUERPO FLUOROCROMO</b>	<b>CLONA</b>	<b>MARCA</b>	<b>NO. CATALOGO</b>
<b>CD86 - PE</b>	GL1	Biolegend®	105008
<b>CD40 - PE</b>	3/23	Pharmlingen®	553791
<b>PD-L1 - PE</b>	10F.9G2	Biolegend®	124308

Cada epidermis se cortó delimitando el área de inmunización, se fijó en acetona y después se dividió en tres partes iguales para teñir los tres marcadores de interés (CD40, CD86 y PD-L1). Cada parte de las epidermis se sumergió en el pozo con el anticuerpo correspondiente y suero fetal bovino y se dejó teñir por 12 horas a 4°C.

Tras las 12 horas de tinción se extrajeron las epidermis del pozo y se fijaron con metanol a portaobjetos sin tratamiento, se les agregó Vectashield® como medio de montaje, se les puso un cubreobjetos encima y se sellaron con barniz.

Finalmente, las epidermis se observaron en un microscopio confocal LEICA TCS SP5®, fotografiando 10 campos por cada marcador epidermis visualizada. De cada fotografía tomada se analizó con el programa ImageJ® la celularidad positiva para cada marcador y la intensidad media de expresión del marcador para cada célula del campo, así como la expresión de MHC-II mediante la expresión de GFP. Se realizó un promedio de celularidad y de expresión del marcador para los diez campos visualizados que correspondían a cada ratón del experimento.

## Identificación de subpoblaciones de DCs en GLD

Se inmunizaron intradérmicamente en la oreja derecha, grupos de 4 ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) con 10 ug de porinas, 10 ug de PORK, 10 uL de vehículo y 1 ug de CT junto a  $10^5$  conidios. A las 72 horas post-inmunización los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajeron los GLD cervicales. Los ganglios se maceraron en PBS a 4°C con ayuda de un émbolo en una placa de 24 pozos. Se realizaron 3 lavados con PBS y se filtró la suspensión celular con ayuda de tela de organza. Se hizo un conteo de las células totales con ayuda de una cámara de Neubauer y el colorante vital de azul de tripano.

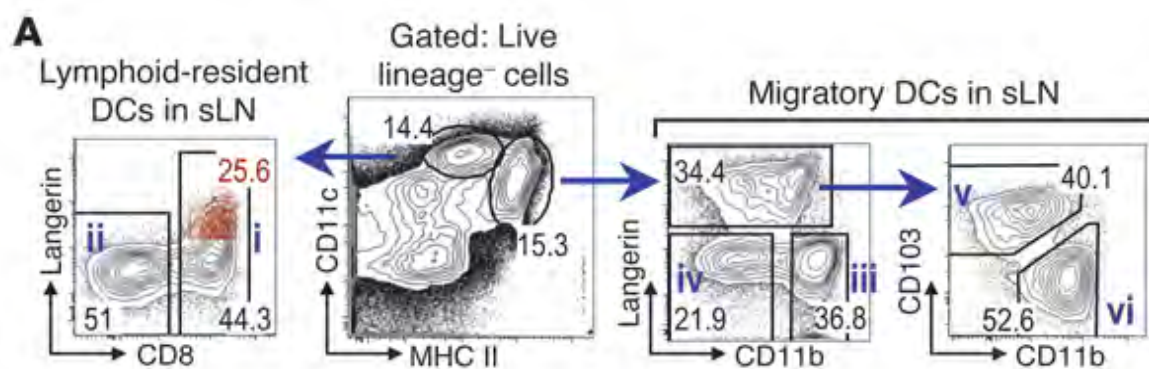
Se realizó la tinción de superficie para toda la suspensión celular con los anticuerpos de identificación de subpoblaciones de células dendríticas indicados en la tabla 5. Se incubó la cantidad correspondiente del anticuerpo para teñir un millón de células dendríticas junto con la suspensión celular por 20 minutos a 4°C.

**Tabla 5.- Panel de anticuerpos anti-ratón usados para identificar subpoblaciones de DCs por citometría de flujo.**

<b>ANTICUERPO FLUOROCROMO</b>	<b>CLONA</b>	<b>MARCA</b>	<b>NO. CATÁLOGO</b>
<b>CD86 - PE</b>	GL1	Biolegend®	105008
<b>CD103 - PECy7</b>	2E7	Biolegend®	121426
<b>Langerina - APC</b>	4C7	Biolegend®	144206
<b>CD8a – APC/Cy7</b>	53-6.7	Biolegend®	100714
<b>CD11b – Brilliant Violent 510</b>	M1/70	Biolegend®	101245
<b>CD11c – PE-CF594</b>	HL3	BD Horizon®	562454
<b>CD3 – PerCP/Cy5.5 (Linaje -)</b>	17A2	Biolegend®	100218
<b>CD19 – PerCP/Cy5.5 (Linaje -)</b>	6D5	Biolegend®	115534

<b>TER-119 PerCP/Cy5.5 (Linaje -)</b>	-	TER-119	Biolegend®	116228
<b>CD49b PerCP/Cy5.5 (Linaje -)</b>	-	DX5	Biolegend®	108916
<b>DAPI</b>		NA	Biolegend®	422801

Tras la tinción se realizaron tres lavados con PBS y se realizó la tinción intracelular con el anticuerpo anti-Langerina, con la ayuda e instrucciones del kit BD CytoFix/Cytoperm®. Se realizaron tres lavados más, ahora con buffer FACS® y se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Aria II®. La estrategia de análisis seguida para identificar a las seis subpoblaciones de DCs se muestra en la figura 3 y se realizó en el programa FlowJo®. Se adquirieron 10,000 eventos de la población CD11c+ MHC-II+ (rDCs + miDCs) y se analizó la expresión del marcador CD86 para cada subpoblación identificada. Las proporciones de cada subpoblación se extrapolaron a la proporción de todas las células contabilizadas en el ganglio.



**Figura 3.- Estrategia de análisis para identificar subpoblaciones de DCs por citometría de flujo [8]. rDCs CD8a+ (i), rDCs CD8a-(ii), mdDCs(iii), dDCs(iv), Lang+ dDCs (v), LCs (vi).**

### Evaluación de la respuesta de linfocitos T

Se inmunizaron intradérmicamente en la oreja derecha, grupos de 4 ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) con las condiciones descritas en la primera columna de derecha a izquierda de la tabla 3 (primera inmunización o priming), usando  $10^5$

conidios y 10 ug del adyuvante (dependiendo de si el grupo requirió el uso de uno u otro). A los 30 días post-inmunización se mide el grosor de la oreja de cada ratón con ayuda de un micrómetro Truper® y tras la medición se volvieron a inmunizar a los ratones en la misma oreja que en el priming, pero ahora con los antígenos correspondientes de la segunda columna de izquierda a derecha de la tabla 3 (reto antigénico).

La respuesta de memoria se realizó mediante DTH, midiendo de nuevo el incremento del grosor de la oreja a las 24 y 48 horas después hacer el reto antigénico (segunda inmunización). Al terminar de hacer la segunda medición a las 48 horas post-reto, se sacrifican a los ratones y se les extrae la oreja inmunizada y el GLD cervical derecho.

Los ganglios se prepararon para adquirirse por citometría de flujo al igual que en el experimento de **Identificación de subpoblaciones de DCs en GLD** (pág. 18), sólo que ésta vez sólo se hizo tinción de moléculas de superficie (no se hizo tinción intracelular) y se utilizaron los anticuerpos de identificación de linfocitos T CD4 de memoria (ME Y MC) que se muestran en la tabla 6.

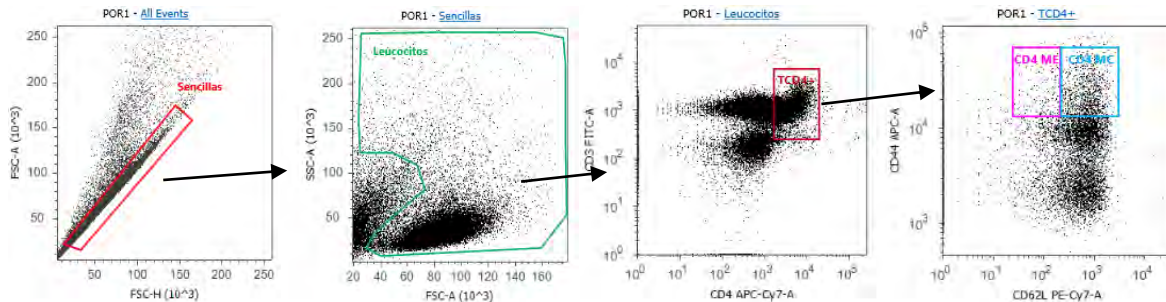
**Tabla 6.- Panel de anticuerpos anti-ratón para identificar linfocitos T CD4 de memoria en ganglio por citometría de flujo.**

<b>ANTICUERPO FLUOROCROMO</b>	<b>CLONA</b>	<b>MARCA</b>	<b>NO. CATALOGO</b>
<b>CD3 - FITC</b>	17A2	Biolegend®	100204
<b>CD4 - APC/Cy7</b>	GK1.5	BD Biosciences®	552051
<b>CD62L - PE/Cy7</b>	MEL-14	Biolegend®	104418
<b>CD44 - APC</b>	IM7	Pharmlingen®	559250

Las muestras de GLD teñidas se adquirieron en un citómetro FACSCanto®, siguiendo la estrategia de análisis de la figura 4, analizando los resultados en el programa FlowJo® y adquiriendo 10,000 eventos de la población CD3+ CD4+



(Linfocitos T CD4+). Las proporciones de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ ME y MC se extrapolaron a la proporción de todas las células contabilizadas en el ganglio.



**Figura 4.- Estrategia de análisis para identificar linfocitos T CD4+ de memoria por citometría de flujo.**

Las dermis y epidermis de las orejas inmunizadas de los ratones se colocaron en medio de cultivo RPMI por 72 horas a 37°C y los infiltrados celulares en el medio de cultivo se tiñeron para identificar linfocitos T CD4 de memoria CD45+ (MC y ME) con los mismos anticuerpos de la tabla 6.

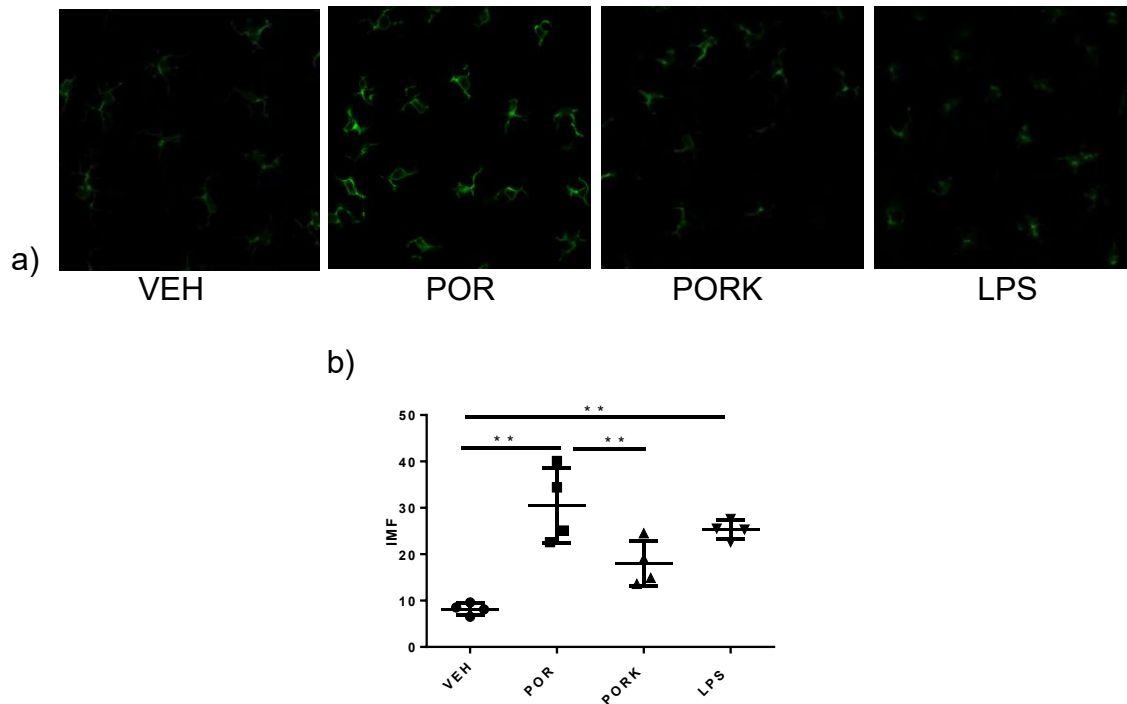
Las células de piel teñidas se adquirieron en un citómetro FACSCanto®, siguiendo la estrategia de análisis de la figura 4, excluyendo poblaciones CD45- y adquiriendo 10,000 eventos de la población CD3+ CD4+ (Linfocitos T CD4+). Las proporciones de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ ME y MC se extrapolaron a la proporción de todas las células contabilizadas en el ganglio.

## VIII.- RESULTADOS

### Inmunización con porinas induce activación de CPA en el sitio de inmunización

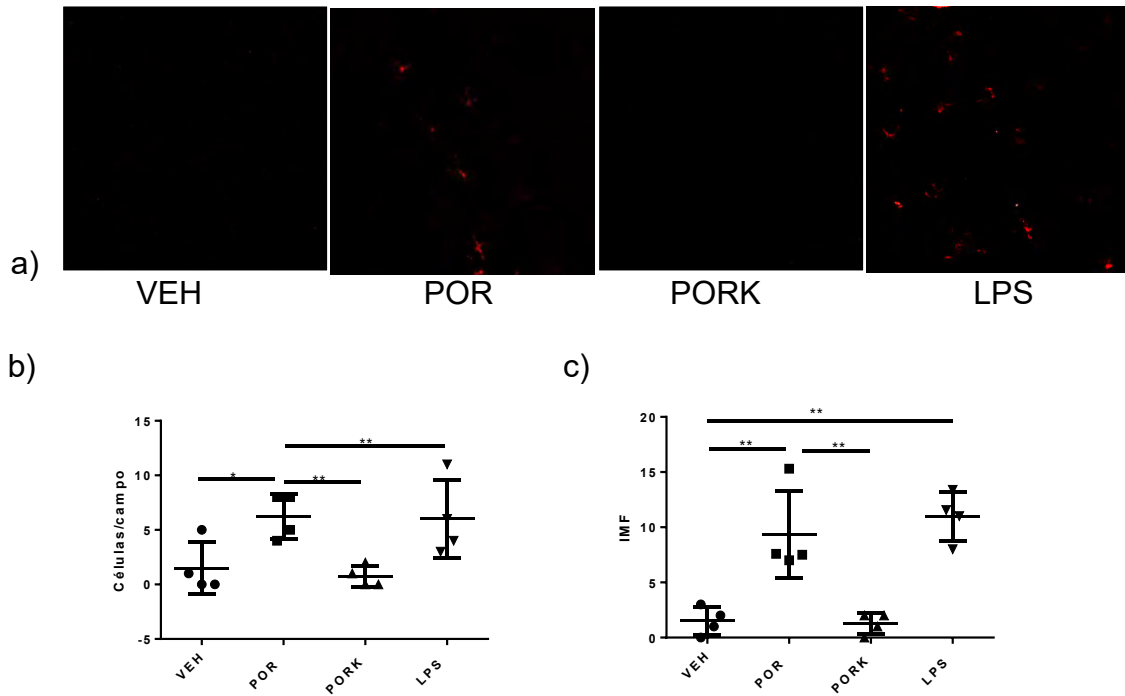
Las CPA de la piel donde se realizaron las inmunizaciones cambiaron su fenotipo al estar o no inmunizadas con las porinas. Al inmunizar con las porinas

intradérmicamente, las células de la epidermis que expresaban MHC-II incrementaron la expresión de ésta molécula (figura 5), sugiriendo que la señalización del TLR en las CPA derivó en el incremento de la expresión de ésta molécula.



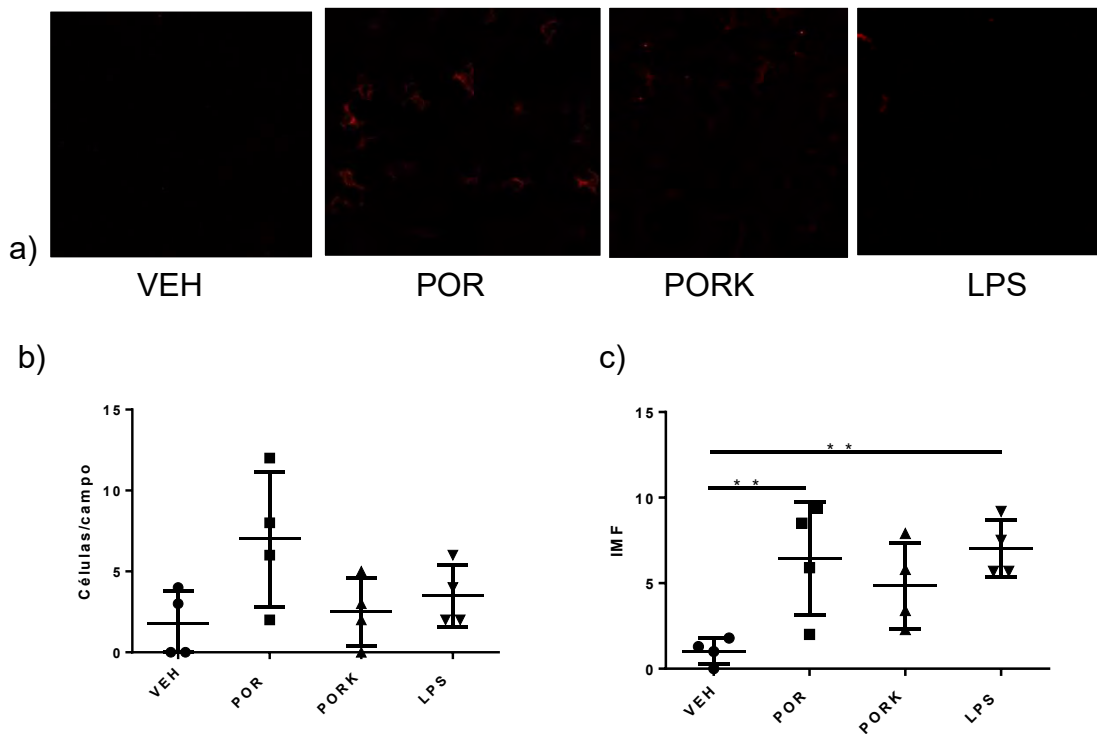
**Figura 5.- La inmunización con porinas aumenta la expresión de MHC-II en CPA del sitio de inmunización.** Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo, 10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de LPS. a) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la epidermis del sitio de inmunización a las 12h post-inmunización. b) Gráfica de la expresión de MHC-II en células de piel de ratones inmunizados (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.05$ ).

Además del incremento de expresión de MHC-II, se encontró que las porinas incrementaron la cantidad de células CD40+ en el sitio de inmunización (ver figura 6), lo que indica que la inmunización con porinas indujo mayor cantidad de CPA activadas en el sitio de inmunización y éstas expresaban CD40 en su superficie al reconocer a las porinas.



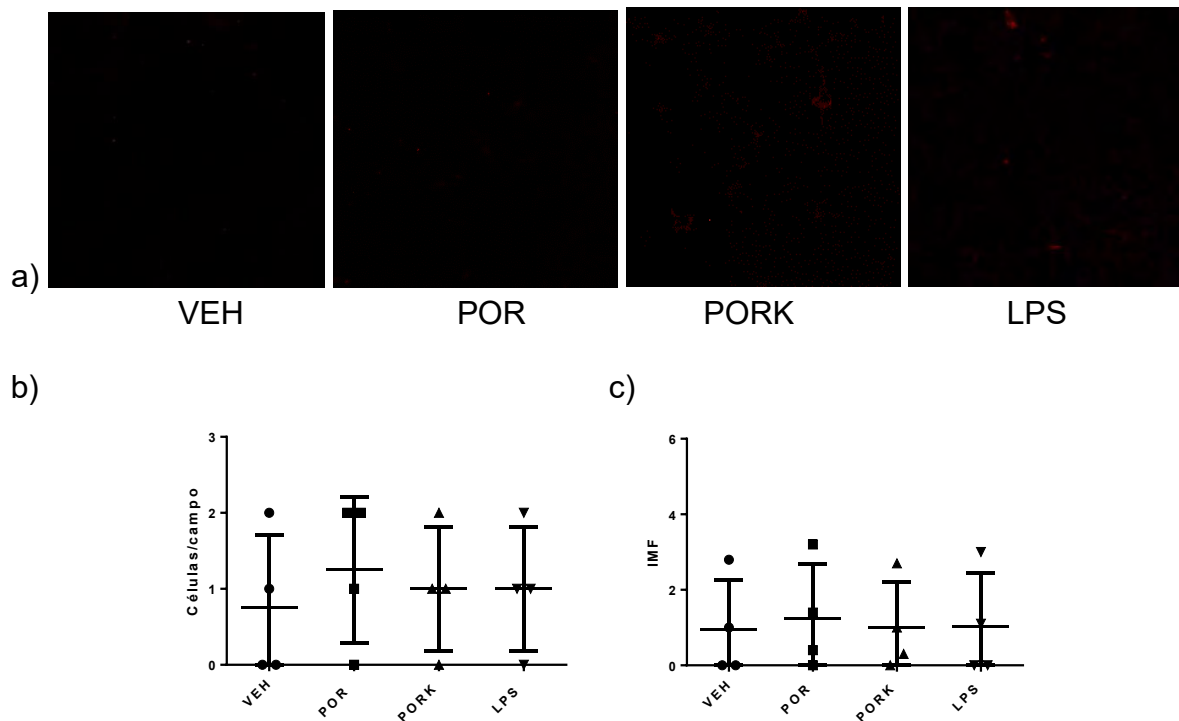
**Figura 6.- La inmunización con porinas aumenta la cantidad de CPA CD40+ en el sitio de inmunización.** Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo, 10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de LPS. a) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de epidermis teñidas con anti CD40-PE a las 12h post-inmunización. b) Gráfica del número de células CD40+ por campo de piel analizada. c) Gráfica de la expresión de CD40 en células de piel de ratones inmunizados (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.05$  )(\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.1$ ).

Se encontró también que las porinas incrementaron la expresión de CD86 en CPA el sitio de inmunización (ver figura 7). Este hallazgo indica que las porinas fueron reconocidas por CPA del sitio de inmunización y ello indujo el incremento de CD86 en su superficie.



**Figura 7.- La inmunización con porinas aumenta la expresión de CD86 en CPA del sitio de inmunización.** Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo, 10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de LPS. a) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de epidermis teñidas con anti CD86-PE a las 12h post-inmunización. b) Gráfica del número de células CD86+ por campo de piel analizada. c) Gráfica de la expresión de CD86 en células de piel de ratones inmunizados (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.05$ ).

Por último, se encontró que las porinas no incrementaron ni la expresión de PD-L1 en las CPA del sitio de inmunización, ni la cantidad de células PD-L1+ en el mismo sitio (ver figura 8). Esto significa que las CPA a las 12 horas post-inmunización con porinas, no completaron la activación de los linfocitos y por eso no expresan marcadores de coinhibición como PD-L1.

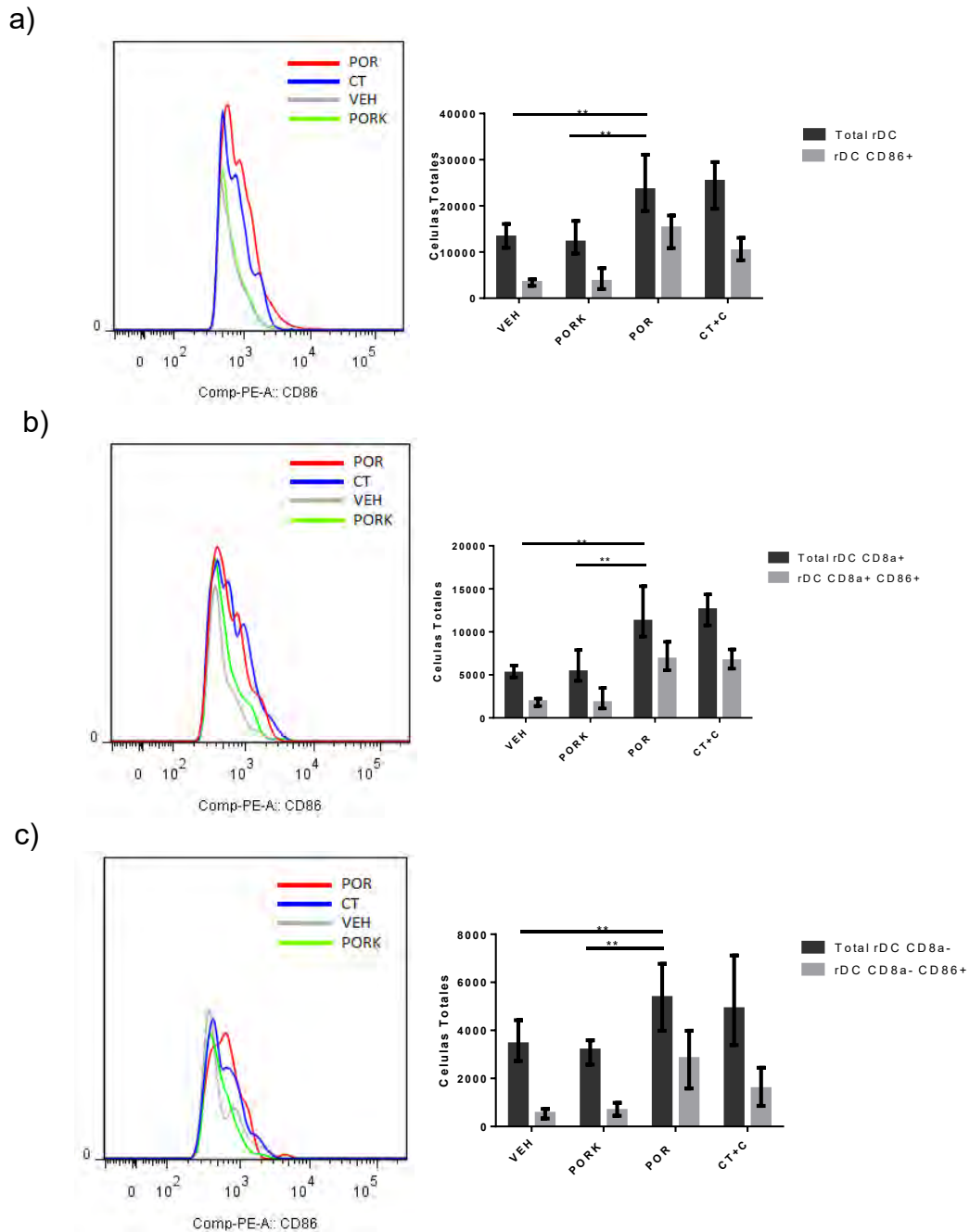


**Figura 8.- La inmunización con porinas no aumenta la cantidad de células PD-L1+ ni su expresión en CPA del sitio de inmunización.** Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo, 10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de LPS. a) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de epidermis teñidas con anti PD-L1-PE a las 12h post-inmunización. b) Gráfica del número de células PD-L1+ por campo de piel analizada. c) Gráfica de la expresión de PD-L1 en células de piel de ratones inmunizados (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn p=0.05).

### Inmunización con porinas induce activación de DCs residentes de ganglio

Las DCs residentes de GLD, tanto la subpoblación CD8a+ como la CD8a- (ver características y nomenclatura en tabla 1), resultaron estar aumentadas cuando el ratón fue inmunizado con porinas, además de que la cantidad de éstas células activadas en GLD también se vió aumentada (figura 9). Éste hallazgo sugiere que las porinas lograron activar a las rDCs porque llegaron de forma soluble al GLD

mediante circulación linfática. Además la activación de ambas subpoblaciones de rDCs sugiere que el antígeno está siendo presentado tanto a linfocitos T CD4+ como a CD8+.



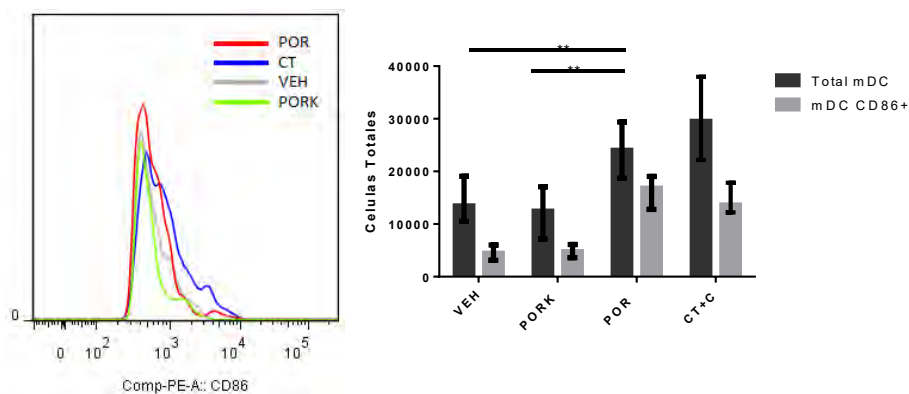
**Figura 9.- La inmunización con porinas incrementa el número y activación de las subpoblaciones de DCs residentes de ganglio. Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo,**

10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de CT más  $10^5$  conidios de *S. schenkii*, a las 72h post-inmunización se extrajo el GLD y se identificaron subpoblaciones de DCs residentes. a) Histograma comparativo de expresión de CD86 en rDCs con gráfica de cantidad total de rDCs y rDCs que expresan el marcador de activación CD86. b) Histograma comparativo de expresión de CD86 en rDCs CD8a+ con gráfica de cantidad total de rDCs CD8a+ y rDCs CD8a+ que expresan el marcador de activación CD86. c) Histograma comparativo de expresión de CD86 en rDCs CD8a- con gráfica de Cantidad total de rDCs CD8a- y cantidad de rDCs CD8a- que expresan el marcador de activación CD86 (\*\*Diferencia significativa para la prueba ANOVA no paramétrica de dos vías con comparación múltiple de Tukey  $p=0.05$ ).

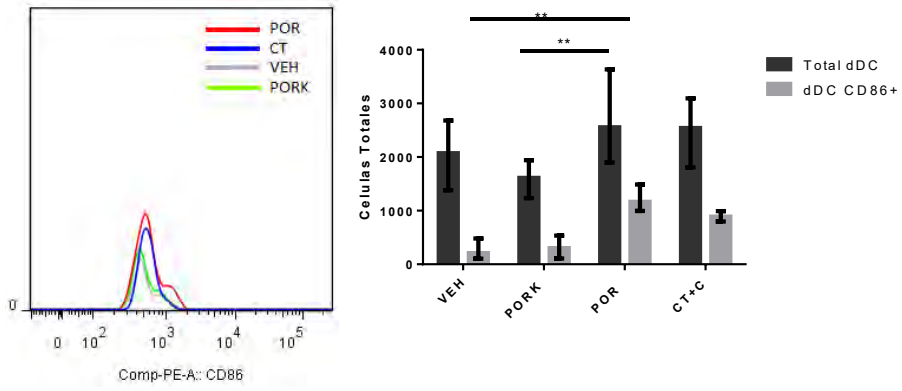
### Inmunización con porinas induce migración y activación de DCs de la piel

Todas las subpoblaciones de DCs migrantes a GLD desde piel (ver tabla 1) se encontraron incrementadas a las 72 horas después de inmunizar con las porinas en los ratones. Lo anterior significa que todas las DCs de la dermis y epidermis fueron capaces de captar a las porinas en el sitio de inmunización y presentar el antígeno a los linfocitos T al GLD, lo que correlacionó con un aumento de CD86 también en todas las subpoblaciones de DCs migrantes, demostrando que éstas células llegaban a GLD con un fenotipo de activación (figura 10).

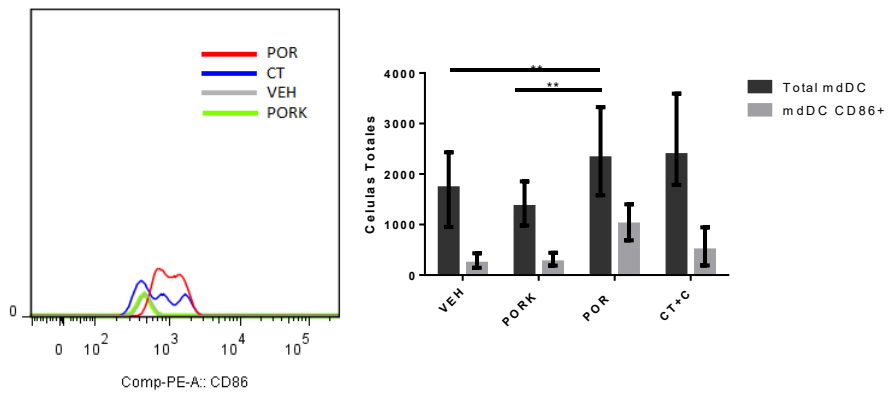
a)



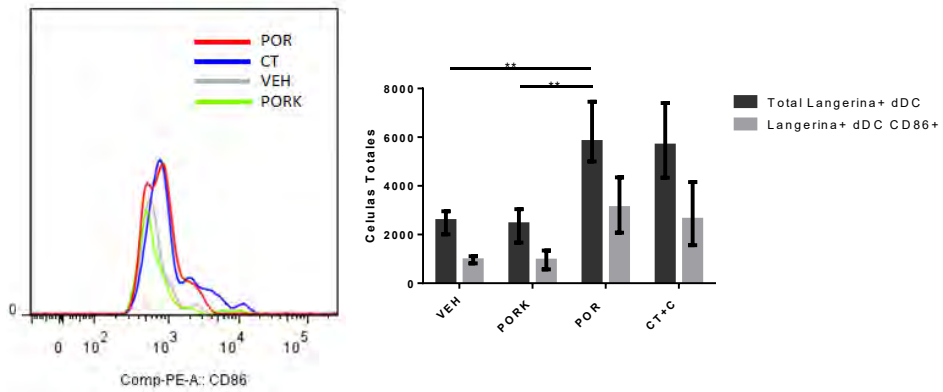
b)



c)

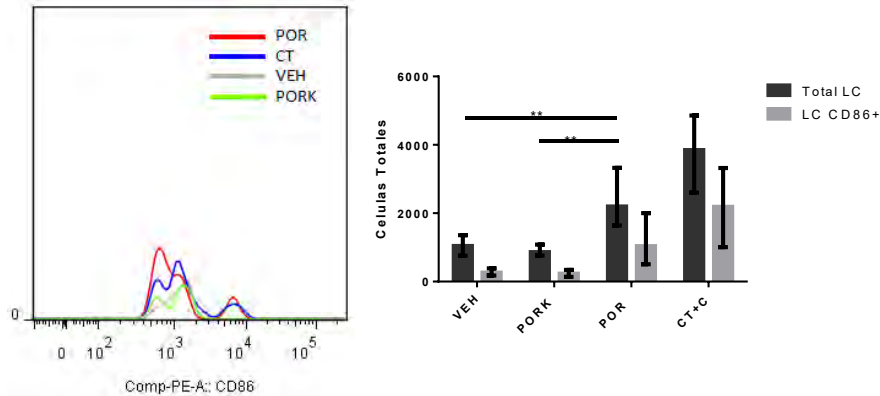


d)





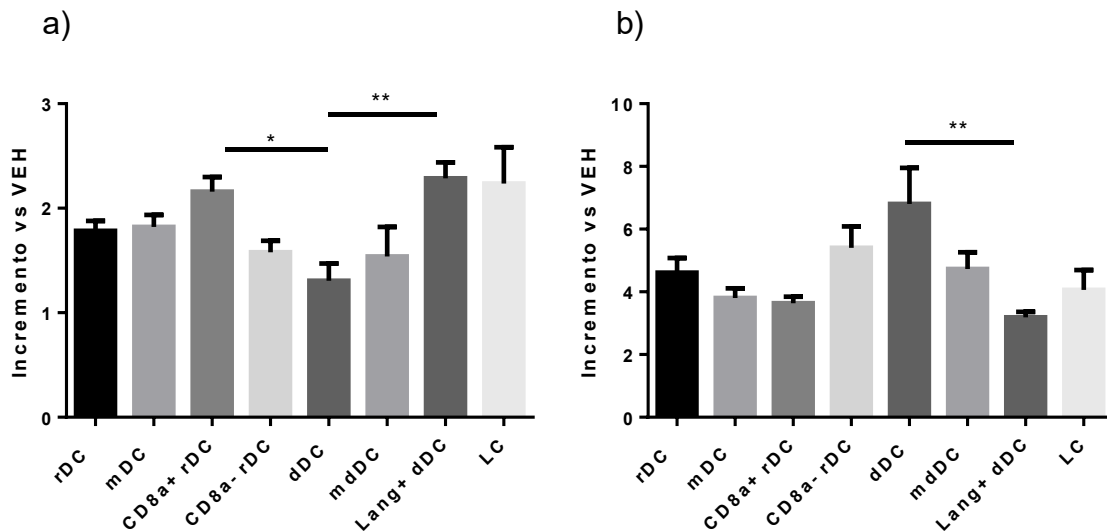
e)



**Figura 10.- La inmunización con porinas incrementa el número y activación de todas las subpoblaciones de DCs residentes de piel.** Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo, 10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de CT más  $10^5$  conidios de *S. schenkii*, a las 72h post-inmunización se extrajo el GLD y se identificaron subpoblaciones de DCs migratorias. a) Histograma comparativo de expresión de CD86 en miDCs con gráfica de cantidad total de miDCs y cantidad de miDCs que expresan el marcador de activación CD86. b) Histograma comparativo de expresión de CD86 en dDCs con gráfica de cantidad total de dDCs y cantidad de dDCs que expresan el marcador de activación CD86. c) Histograma comparativo de expresión de CD86 en mdDCs con gráfica de cantidad total de mdDCs y cantidad de mdDCs que expresan el marcador de activación CD86. d) Histograma comparativo de expresión de CD86 en dDCs langerina+ con gráfica de cantidad total de dDCs langerina+ y cantidad de dDCs langerina+ que expresan el marcador de activación CD86. e) Histograma comparativo de expresión de CD86 en LCs con gráfica de cantidad total de LCs y cantidad de LCs que expresan el marcador de activación CD86 (\*\*Diferencia significativa para la prueba ANOVA no paramétrica de dos vías con comparación múltiple de Tukey  $p=0.05$ ).

Haciendo una comparación de la cantidad de DCs migratorias y residentes inducida por la inmunización con porinas respecto al grupo inmunizado con vehículo, se observó que las dmiDCs y las dDCs son las subpoblaciones que arribaron en menor medida a GLD pero al llegar tenían un fenotipo de activación, mientras que las

subpoblaciones de LCs y Lang+ dDCs llegaban en mayor cantidad pero gran parte de ellas arribaban sin el fenotipo de activación (figura 11).

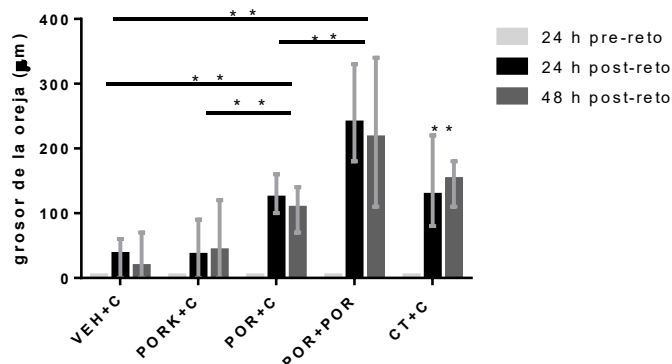


**Figura 11.- Comparación de la cantidad y activación de las subpoblaciones de DCs presentes en GLD al inmunizar con porinas.** Ratones C57BL6/J MHC-II-GFP (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja con 10 uL de vehículo, 10 ug de porinas, 10 ug de PORK y 1 ug de CT más  $10^5$  conidios de *S. schenkii*. A las 72h post-inmunización se extrajo el GLD y se identificó el aumento del número de células de las subpoblaciones de DCs del grupo de ratones inmunizado con porinas respecto al grupo inmunizado con vehículo. Incremento total de DCs en GLD (a) e incremento de células CD86+ en GLD (b) (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.05$ ).

### **Inmunización con porinas induce respuesta de linfocitos T de memoria**

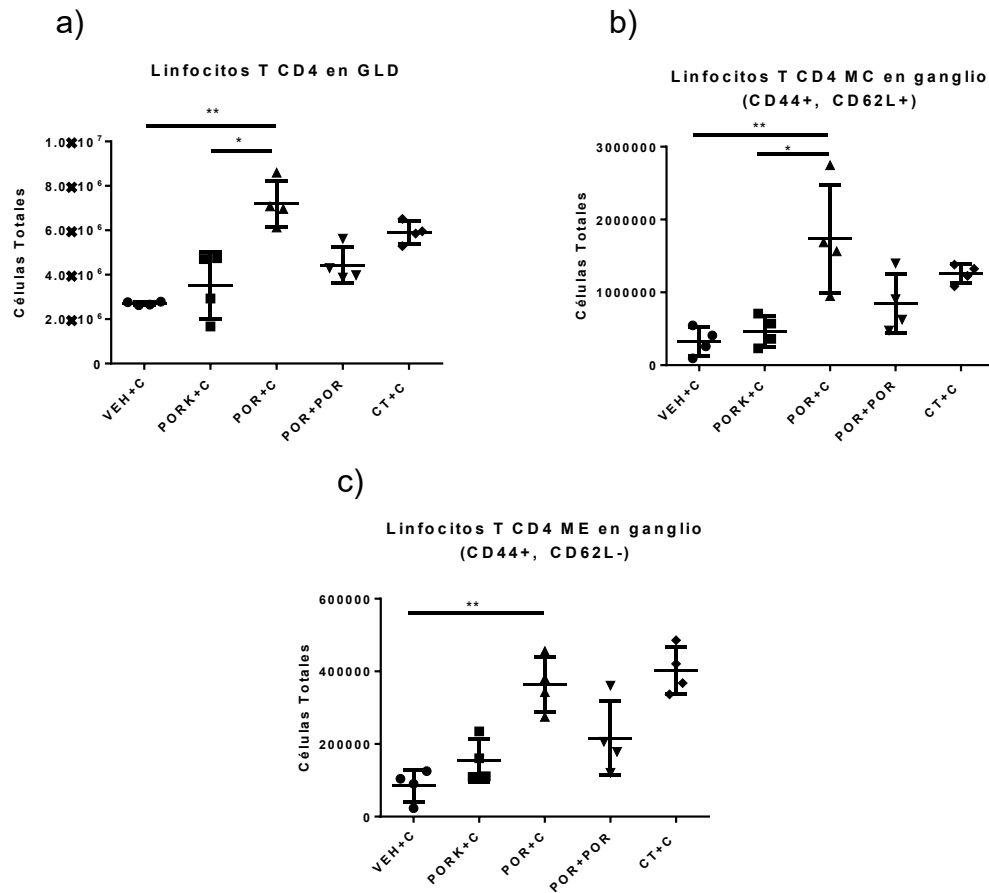
La activación y migración de CPA inducida al inmunizar con las porinas se tradujo en una respuesta de memoria celular, encontrándose una respuesta de tipo DTH (o de memoria) al usar a la porina como adyuvante contra antígenos coimmunizados como el conidio de *S. schenkii*. Además, con el mismo modelo de DTH, se observó que también las porinas logran inducir respuesta celular de memoria al incrementar

la respuesta celular de memoria contra sí mismas al inmunizarlas tanto en el priming inmunológico como en el reto antigénico, y observando un incremento en el grosor de la piel inmunizada (figura 12).



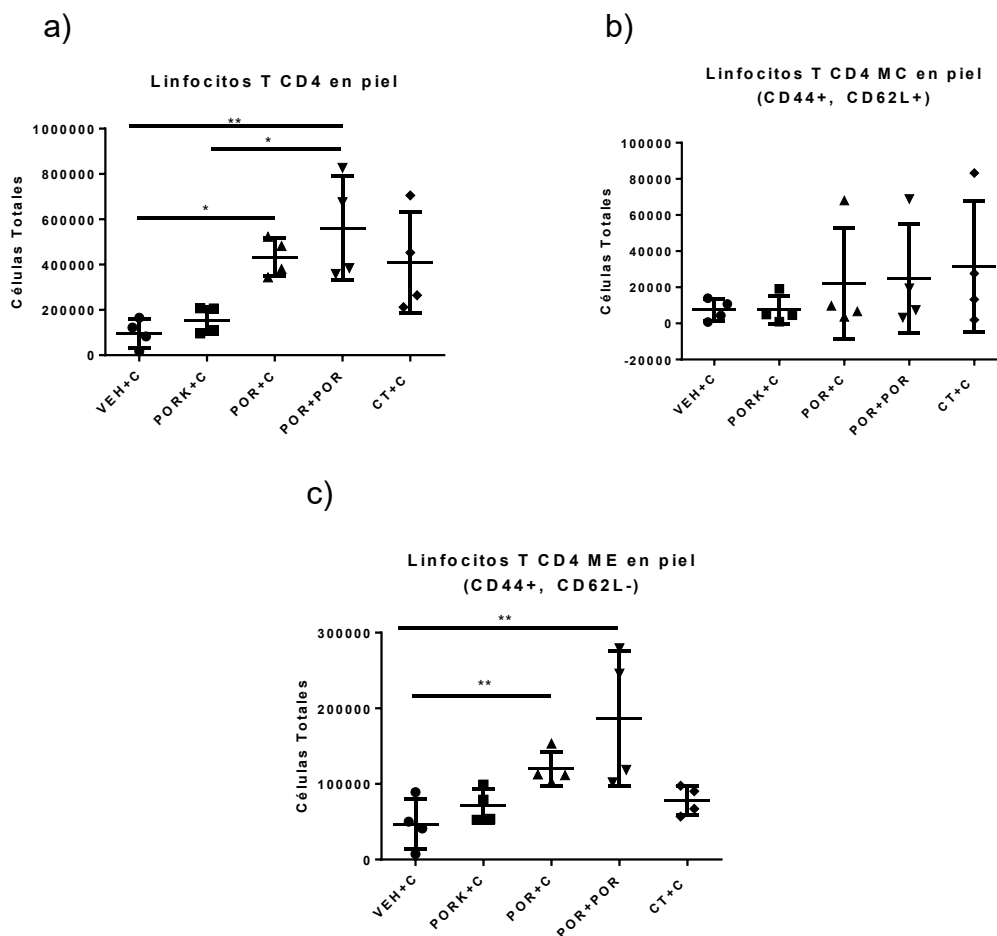
**Figura 12.- Inmunización con porinas aumenta la respuesta de memoria celular contra ellas mismas y contra antígenos co-inmunizados.** Ratones C57BL6/J (n=7) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja en el priming inmunológico y en el reto antigénico (30 días después) con las diferentes condiciones mostradas en la tabla 3: Vehículo+Conidio – Conidio (10 ug c/u), PorK+Conidio – conidio (10 ug c/u), Porinas+Conidio – Conidio (10 ug c/u), Porinas – Porinas (10 ug c/u), Toxina del cólera+Conidio – Conidio (10 ug c/u). En la gráfica se muestran las mediciones del grosor del sitio de inmunización a las 24h pre-reto, 24h post-reto y 48h post-reto (\*\*Diferencia significativa para la prueba ANOVA no paramétrica de dos vías con comparación múltiple de Tukey  $p=0.05$ ).

Al realizar la cuantificación directa de las células T CD4 totales y de memoria en GLD, se encontró que existe una mayor cantidad de linfocitos T CD4 totales cuando se usan a las porinas como adyuvante del conidio, además de que la cantidad de éstas células se mantenía basal al usar a las porinas como antígeno (respuesta de memoria contra las porinas) (figura 13a). El mismo efecto de celularidad se observó para la cantidad de linfocitos T CD4 MC y para los linfocitos T CD4 ME en GLD (figura 13 b y c, respectivamente).



**Figura 13.- Inmunización con porinas aumenta la cantidad de células T CD4+, T CD4+ de memoria central y T CD4+ de memoria efectora en GLD contra antígenos co-inmunizados.** Ratones C57BL6/J (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja en el priming inmunológico y en el reto antigénico (30 días después) con las diferentes condiciones mostradas en la tabla 3: Vehículo+Conidio – Conidio (10 ug c/u), PorK+Conidio – conidio (10 ug c/u), Porinas+Conidio – Conidio (10 ug c/u), Porinas – Porinas (10 ug c/u), Toxina del cólera+Conidio – Conidio (10 ug c/u). a) Gráfica representativa de la cantidad de linfocitos T CD4 totales en GLD a las 48h post-reto. b) Gráfica representativa de la cantidad de linfocitos T CD4 de memoria central (CD3+, CD4+, CD44Hi, CD62L+) en GLD a las 48h post-reto. c) Gráfica representativa de la cantidad de linfocitos T CD4 de memoria efectora (CD3+, CD4+, CD44Hi, CD62L-) en GLD a las 48h post-reto (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn p=0.05) (\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn p=0.1).

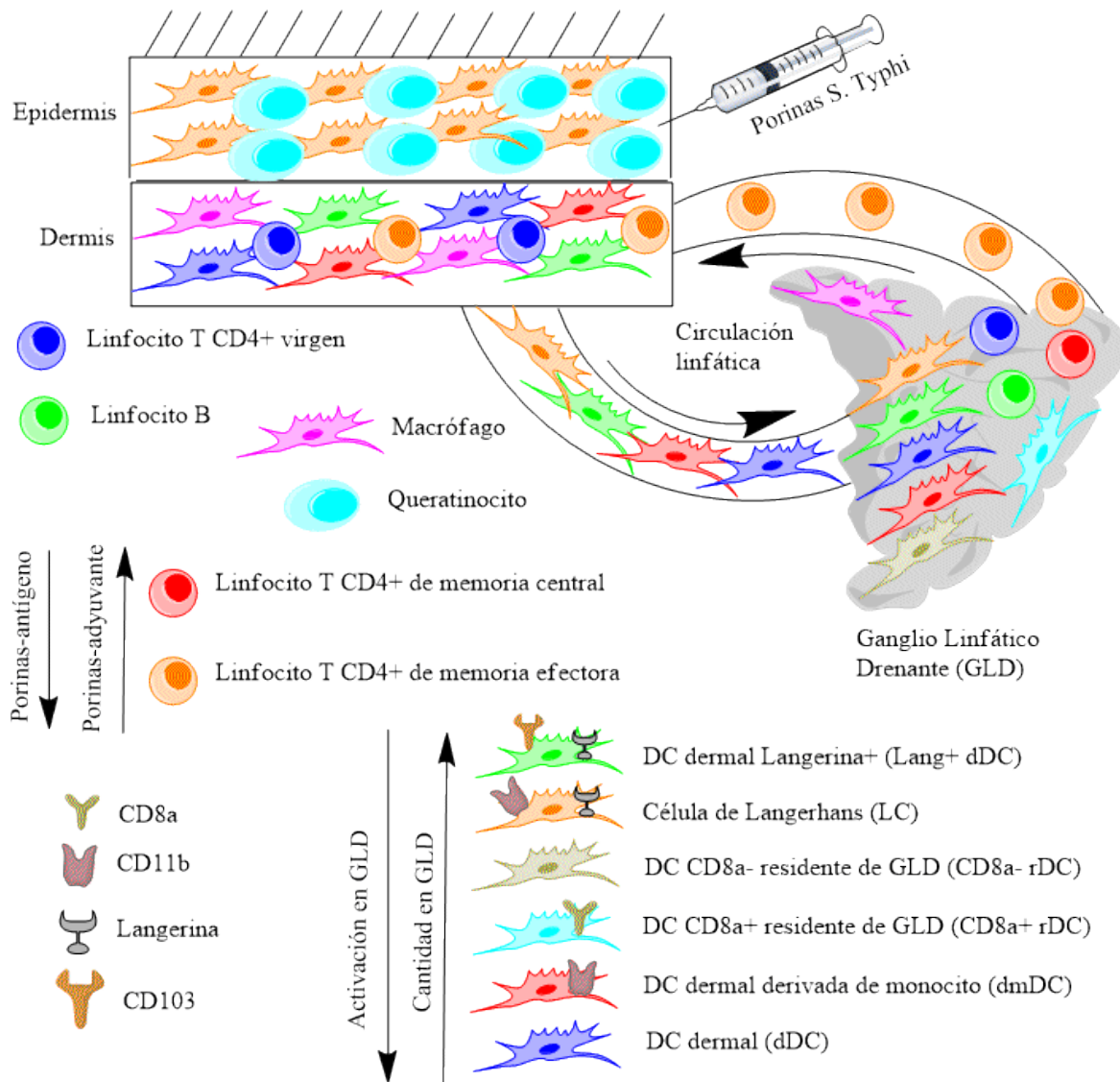
La cuantificación del infiltrado de linfocitos T CD4+ en el sitio de inmunización arrojó que la cantidad de éstas células sólo se veía aumentada cuando se realizaba el reto antigénico con las porinas (respuesta de memoria contra las porinas), no así cuando los ratones fueron inmunizados con las porinas como adyuvante para conocer la respuesta de memoria contra el antígeno coinmunizado (figura 14). Éste hallazgo indica que las porinas como adyuvantes inducen una respuesta de memoria celular localizada en GLD, mientras que la respuesta de memoria celular contra ellas mismas se encuentra localizada en el sitio de inmunización.



**Figura 14.- Inmunización con porinas aumenta la cantidad de células T CD4+ y T CD4+ de memoria efectora en el sitio de inmunización.** Ratones C57BL6/J (n=4) fueron inmunizados vía intradérmica en la oreja en el priming inmunológico y

en el reto antigénico (30 días después) con las diferentes condiciones mostradas en la tabla 3: Vehículo+Conidio – Conidio (10 ug c/u), PorK+Conidio – conidio (10 ug c/u), Porinas+Conidio – Conidio (10 ug c/u), Porinas – Porinas (10 ug c/u), Toxina del cólera+Conidio – Conidio (10 ug c/u). a) Gráfica representativa de la cantidad de linfocitos T CD4 totales en piel a las 48h post-reto. b) Gráfica representativa de la cantidad de linfocitos T CD4 de memoria central (CD3+, CD4+, CD44Hi, CD62L+) en piel a las 48h post-reto. c) Gráfica representativa de la cantidad de linfocitos T CD4 de memoria efectora (CD3+, CD4+, CD44Hi, CD62L-) en piel a las 48h post-reto (\*\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.05$ ) (\*Diferencia significativa para la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn  $p=0.1$ ).

Finalmente, en la figura 15 se esquematiza el fenómeno observado con las subpoblaciones de DCs y linfocitos T CD4+ al inmunizar intradérmicamente a las porinas en los ratones.



**Figura 15.- Esquema de la respuesta de DCs y linfocitos T CD4+ de memoria inducida por la inmunización con porinas.** La inmunización intradérmica con porinas induce un aumento en la cantidad de DCs migratorias de piel y en la cantidad de DCs residentes de GLD, las dmiDCs y las dDCs son las subpoblaciones que arribaron en menor medida a GLD pero al llegar tenían un fenotipo de activación, mientras que las subpoblaciones de LCs y Lang+ dDCs llegaban en mayor cantidad pero gran parte de ellas arribaban sin el fenotipo de activación. Al usar a las porinas como modelo antigénico inducen una respuesta más elevada de linfocitos T CD4+ de memoria efectiva (en piel) mientras que la respuesta de linfocitos T CD4+ de memoria central se vio aumentada al usarlas como adyuvante.

## IX.- DISCUSIÓN

El incremento en la expresión de MHC-II y CD86 en CPA y el aumento de CPA CD40+ del sitio de inmunización, sugiere que tras el reconocimiento de las porinas, las CPA residentes de la piel señalaron vía TLR2 y TLR4 para expresar éstas moléculas de activación en su superficie y procesaron el antígeno para presentarlo en contexto de MHC-II. Además se indujo incremento en la cantidad de CPA activadas en el sitio de inmunización debido a que las porinas lograron ser reconocidas por un mayor número de células en la piel al ser inmunizadas, sin embargo éstas células se activaron diferencialmente ya que expresaban CD40 en su superficie más no CD86. Es importante resaltar que las CPA no pueden realizar correctamente la función de presentación de antígeno si no expresan éstos marcadores de activación, ya que si no se expresan, se favorecería una respuesta anérgica o tolerogénica del linfocito T [35]. De igual forma, resulta interesante que las CPA del sitio de inmunización se encuentren activadas ya que las DCs no pueden migrar al GLD sin antes reconocer al antígeno y expresar las moléculas de activación antes mencionadas [36]. Éste fenómeno se había reportado *in vitro* al estimular CPA con porinas de *S. Typhi* [32], sin embargo era necesario ponerlo en un contexto biológico más completo para armar el mecanismo de inmunidad inducido por las porinas y conocer si el papel de las CPA *in vivo* es fundamental para dicho proceso. La falta de aumento en la expresión de PD-L1 en CPA del sitio de inmunización se puede explicar debido a que ésta proteína se empieza a producir después de la activación del linfocito T para su activación en el GLD [37] y a las 12 horas post-inmunización las DCs aún no arriban al GLD a presentar el antígeno [11].

Éste tipo de activación de CPA en el sitio de inmunización se había visto *in vivo* con otros antígenos modelo como la CT, que también logra incrementar la expresión de CD86 en éstas células a las 24 horas post-inmunización [36], por otro lado, otras proteínas bacterianas como las proteínas de choque térmico *E. coli* también logran



aumentar la expresión de CD40 y CD86 en DCs *in vitro* debido que actúan como ligandos de TLR 2 y 4 [38].

El aumento en la expresión de moléculas que indican un fenotipo de activación (CD86 y CD40 como moléculas de coestimulación) inducido por las porinas, y el hecho de que no incrementen la expresión de PD-L1 (molécula de coinhibición) sugiere que existe una potente activación de las CPA de la epidermis a tiempos muy tempranos post-inmunización (12h). La presencia de éste fenotipo en las CPA indica que la activación temprana le permitirá iniciar el montaje de la respuesta inmune de una manera eficiente.

Algunos patógenos incrementan la expresión de PD-L1 para inhibir la activación de linfocitos T específicos y pasar desapercibidos para evitar que se monte una respuesta inmune contra ellos, un claro ejemplo es el del virus de influenza AH1N1 (tanto vivo como inactivado), que induce la expresión de PD-L1 en CPA incluso a tiempos tempranos después de ser reconocido por la CPA (18h) [39-40]. Por lo mencionado en éste párrafo, la ausencia de dicha molécula en la activación de CPA por porinas, es una de las características que las hace excelentes candidatos vacunales para proteger contra la infección por *Salmonella Typhi*, ya que asegura un montaje eficiente de la respuesta inmune.

Se comprobó que la activación de las CPA observada al inmunizar porinas se traducía en un fenómeno migratorio de todas las subpoblaciones de células dendríticas del sitio de inmunización hasta el GLD y que además, éstas células mantenían su fenotipo de activación 72 horas después de la inmunización, ello corrobora que se mantiene el montaje de la respuesta inmune tras un largo periodo post-inmunización, contrario a los que se ha observado con otras proteínas bacterianas como CT que a las 72 horas post-inmunización empieza un declive en la expresión de éstos marcadores de activación [37].

El aumento en la cantidad de rDCs de GLD inducida por las porinas, que se puede explicar debido a que existe una diferenciación acelerada del progenitor mielóide, indica que las porinas llegan de forma soluble al ganglio y éstas al llegar activan a las rDCs, o bien, llega de forma nativa por vesículas intracelulares y se libera en el GLD para activar a las rDCs [41]. Otro dato importante es que se aumenta la cantidad y activación de ambas subpoblaciones de rDCs (CD8a+ y CD8a-), lo que supone que el antígeno no solo está siendo presentado a linfocitos T CD4 sino también a los linfocitos T CD8 [42].

Éste tipo de comportamiento en el que se observa un incremento en GLD en el número de DCs residentes de GLD (población CD8a+) y DCs residentes de piel (LC), se había descrito anteriormente al inmunizar otras proteínas bacterianas como la toxina de *Vibrio cholerae*, la cual tiene un efecto activador directo en DCs al unirse a gangliósidos GM1 de su membrana [36].

Un hallazgo interesante radicó en que la cantidad de LCs y Lang+ dDCs fueron poblaciones migratorias que se presentaban en mayor cantidad en GLD al inmunizar porinas, sin embargo muchas de esas células no presentaban un fenotipo de activación. Caso contrario ocurrió con las subpoblaciones de dDCs y mdDCs, que llegaron en menor cantidad a GLD pero casi la totalidad de ellas presentaba un fenotipo de activación (señal de que habían reconocido a la porina). Sin duda alguna, éste hallazgo sugiere que las células que expresan langerina tienen mayor capacidad de migración al ganglio aunque no hayan reconocido a un PAMP, mientras que las células dermales que no expresan langerina (dDCs y mdDCs) tienen poca capacidad de migración, y sólo lo hacen cuando reconocen un PAMP, como lo son las porinas. Hasta la fecha no se conoce si las dDCs y mdDCs expresan mayor cantidad de PRRs que las LCs y Lang+ dDCs, sin embargo, ya se ha descrito que las LCs es la subpoblación de DCs de piel que mayor capacidad de migración posee, incluso lo hacen sin necesidad de estar siendo activadas por PAMPs lo que explicaría su alta presencia en GLD sin estar siendo activadas [43].

De acuerdo a los resultados obtenidos, la activación de subpoblaciones de DCs dermales Langerina- (dDCs y mdDCs) juega un papel importante en la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4+, ya que la inmunización con porinas induce una muy buena activación de linfocitos T CD4+ en el sitio de inmunización sin embargo queda la incertidumbre de saber si la respuesta inmune iniciada por éstas subpoblaciones de DCs deriva en una respuesta protectora contra el patógeno.

Se comprobó además, que la activación de las CPA observada en el priming inmunológico, se traduce en una respuesta de activación de células T, mediante el uso de la porina como un adyuvante y la obtención en GLD de células T CD4 de memoria contra el antígeno coinmunizado. Éste hallazgo corrobora que las porinas mantienen las señales de activación en CPA hasta que ocurre la presentación de antígeno y la activación de los linfocitos T específicos para el antígeno, lo que se traduce en una respuesta de tipo celular.

La respuesta celular de memoria en el sitio de inmunización medida por DTH, demostró que las porinas como adyuvante y como inmunógeno, logran incrementar este tipo de respuesta al tener capacidad adyuvante intrínseca [33], sin embargo, el incrementó exacerbado en la respuesta de memoria montada contra sí misma sugiere que la respuesta de memoria inmunológica que se ha observado al inmunizarlas, deriva desde los inicios de la respuesta inmune que es inducida, activando la respuesta inmune innata, específicamente activando de manera eficiente a las CPA.

Un descubrimiento similar se realizó al inmunizar con la toxina de *V. cholerae* como adyuvante para activar una respuesta de memoria para un antígeno modelo que no lo logra por sí mismo (lisozima de huevo) y crea linfocitos T de memoria específicos contra el antígeno que fue co-inmunizado [36].

Otro descubrimiento importante radicó en que las porinas administradas como antígeno no indujeran un aumento de células T de memoria central en GLD como

lo hacen las porinas usadas como adyuvante y como ocurre en la mayoría de infecciones por patógenos como VIH [44]. Ello se podría explicar debido a que se midió la respuesta de células T de memoria en tiempos muy cortos después del reto antigénico, pudiendo ocurrir que el pool de células de memoria central se diferenciara a células de memoria efectora para migrar al sitio de inmunización y quedarse residentes en el tejido para ejercer su función ante otro posible contacto con el antígeno [19,45].

El fenómeno explicado anteriormente indicaría que la respuesta de memoria contra las porinas se centra más en el montaje de una respuesta inmune local en el sitio de inmunización, mientras que el efecto de adyuvancia de las porinas se centra en un efecto localizado en los órganos linfoides. La hipótesis mencionada anteriormente se corroboró al identificar que, la cantidad de linfocitos T CD4 totales y CD4 ME en piel estaba incrementada en el grupo de ratones en los que se midió la respuesta de memoria contra porinas.

En el presente trabajo se ha demostrado que las porinas logran activar a las CPA del sitio de inmunización a tiempos tempranos post-inmunización, que las CPA activadas conservan su fenotipo de activación hasta migrar a GLD (para el caso de las cuatro subpoblaciones de DCs migratorias) y una parte de la activación de las CPA ocurre en GLD ya que las DCs residentes de GLD también se presentan un fenotipo de activación a los mismos tiempos y además se encuentran incrementadas en número. Por último, se observó que las señales inducidas en las CPA activadas, generan los linfocitos T CD4+ de memoria.

## **X.- CONCLUSIONES**

La inmunización con porinas induce un fenotipo de activación en las CPA del sitio de inmunización, ello se traduce en un incremento en celularidad y activación de todas las subpoblaciones de DCs, tanto migratorias de piel como residentes de

GLD, indicando que las porinas llegan a dicho órgano linfoide cargadas en DCs de la piel y en forma nativa. Las DCs dermales Langerina- juegan un papel importante en la activación de linfocitos T del GLD ya que fueron las poblaciones mayormente activadas por las porinas. Finalmente, la activación de las subpoblaciones de DCs en GLD deriva en una respuesta de células T CD4+ de memoria contra ellas mismas y contra antígenos coimmunizados, demostrando que las señales inducidas por porinas en las CPA cumplen su función al activar a los linfocitos T.

## **XI.- PERSPECTIVAS**

Se plantea hacer una cinética de activación de CPA tanto en el sitio de inmunización como en GLD a las 24, 48 y 72h post-inmunización para conocer los tiempos de migración de las distintas subpoblaciones de DCs estudiadas. Para evaluar si los mecanismos activados por las porinas en CPA y linfocitos T se traducen en una respuesta protectora sistémica, se realizará un reto con *S. Typhi* vía intraperitoneal empleando el mismo modelo de inmunizaciones intradérmicas.

## **XII.- BIBLIOGRAFIA**

1. Vias JM., et al., The known unknowns of antigen processing and presentation., *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**: 607-618.
2. M. den Haan J. and Arens R., van Zelm M., The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells, *Immunology Letters.*, 2014. **162**: 103-112.
3. Sprent J., Antigen-presenting cells: Professionals and amateurs, *Current Biology.*, 1995. **5**(10): 1095-97.
4. Kambayashi T., Laufer TM., Atypical MHC class II- expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?., *Nat Rev Immunol*, 2014. 1-12.

5. Heath RW. And Carbone FR., Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces., *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): 1237-44.
6. Malissen B. et al., The origins and functions of dendritic cells and macrophage in the skin., *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**: 417-28.
7. Thery C. et al., The cell biology of antigen presentation in dendritic cells., *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(1): 45-51.
8. Idoyaga J. et al., Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction., *J Clin Invest*, 2013. **123**(2): 844-54.
9. Belyakov IM. et al., Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells., *J Clin Invest*, 2004. **113**(7): 998-1007.
10. Van Wilsem EJ. et al., Antigen-bearing Langerhans cells in skin draining lymph nodes: Phenotype and kinetics of migration., *J Invest Dermatol*, 1994. **103**(2): 217-20.
11. Kaplan H., *In vivo* function of Langerhans cells and dermal dendritic cells., *Trends in Immunology*, 2010. **31**(12): 446-51.
12. Artyomov MN. et al., CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery., *PNAS*, 2010. **107**(39): 16916-21.
13. Suresh, R. and Mosser DM., Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ*, 2013. **37**(4): p. 284-91.
14. Takeuchi O. and Shizuo A., Pattern Recognition Receptors and Inflammation, *Cell Rev*, 2010; **140**: 805-820.
15. Barr TA. et al. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells, *Eur J Immunol*, 2007. **37**: 3020-53.
16. Driessens G. et al., Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity, *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): 126-44.
17. Sheng KC., et al., Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells., *Immunology*, 2006; **118**: 372-83.
18. Bailey SR. et al., Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis., *Front Immunol*, 2014. **5**: 103-112.

19. Di Meglio P. et al., The multitasking organ: recent insights into skin immune function, *Immunity*, 2011. **35**(6):857-69.
20. Askenase PW. et al., Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses, *JEM*, 1975. **141**: 697-702.
21. Watts C., et al., TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells., *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(1): 124–30.
22. Nikaido H., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited., *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003; **67**(4): 593-656.
23. Salmi C., et al., Squalamine: An appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant Gram-negative bacteria?., *Plos One*, 2008; **3**(7): e2765.
24. Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E. & Kumate, J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol* 27, 1640–1645 (1989)
25. Isibasi A., et al., Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine*, 1992; **10**(12): 811-3.
26. Salazar-González RM., et al., Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunizations with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunology Letters*, 2004. **93**: 115–122.
27. Secundino I., et al., *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific antibody memory response. *Immunology*, 2005. **117**: 59-70.
28. Padilla M., et al., Characterization of the protective Borrelial antibody response in humans and hamsters after vaccination with a *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Protein A vaccine, *J Infect Dis*, 1996. **174**: 59-70.
29. Pérez-Shibayama.C., et al., IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote generation of protective Germinal Center-Derived IgM+ B cell memory against *Salmonella Typhi*, *J Immunol*, 2014. **192**(11): 5192-200.
30. Blanco F., et al., Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella Typhi*., *Scand J Infect Dis*, 1993. **25**: 73-80.

31. Pérez-Toledo M., et al., *Salmonella* Typhi porins OmpC and OmpF are potent adjuvants for T-Dependent and T-Independent antigens. *Front Immunol*, 2017. **8**: 1–10.
32. Cervantes L., et al., TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to *Salmonella typhi* antigens. *Eur J Immunol*, 2009. **39**: 126–135.
33. Moreno A., et al., *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology*, 2013. **139**: 459-471.
34. García-Lozano A. et al., Manuscrito en preparación.
35. Chan CY., et al., Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection. *Immunity*, 2013. **38**(2): 349-59.
36. Meza-Sánchez D., et al., Intradermal immunization in the ear with cholera toxin and its non-toxic b subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs. *Eur J Immunol*, 2011. **41**: 2894-2904.
37. Ostrand Rosenberg S., et al., The programmed Death-1 suppressive pathway: Barrier to anti-tumor immunity. *J Immunol*, 2014. **193**(8): 3835-41.
38. Ashtekar AR., et al., TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(6): 1434-46.
39. Valero-Pacheco N., et al., PD-L1 Expression Induced by the 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Impairs the Human T Cell Response. *Clin Dev Immunol*, 2013. Article ID: 989673.
40. Athale S., et al., Influenza vaccines differentially regulate the interferon response in human dendritic cell subsets. *Sci Transl Med*, 2017. **9**: eaaf9194.
41. Harwood NE., et al., Antigen presentation to B cells. *Biol Rep*, 2010. **2**: 87-91.
42. Den Haan JMM., et al., CD8+ but not CD8- dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*, 2000. **192**(12): 1685-96.



43. Hemmi H., et al., Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-B1-dependent cells. *International Immunology*, 2001. **13**(5): 695-704.
44. Potter SJ., et al., Preserved Central Memory and Activated Effector Memory CD4+ T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Controllers: an ANRS EP36 Study. *J Virol*, 2007. **81**(24): 13904-15.
45. Aakansksha J., et al., Innate control of adaptive immunity: Beyond the three-signal paradigm. *J Immunol*, 2017. **198**: 3791-3800.