

# La porina OmpD de *Salmonella Typhimurium* induce altos títulos de anticuerpos de larga duración: implicaciones en el desarrollo de vacunas contra la salmonelosis no tifoídica

Marisol Pérez-Toledo<sup>1,2</sup>, Paola A. Martínez-Amador<sup>1</sup>, Rodolfo Pastelin-Palacios<sup>3</sup>, Armando Isibasi<sup>1</sup>, Adam F. Cunningham<sup>4</sup> y Constantino López-Macías<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; <sup>3</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, México; <sup>4</sup>Institute of Immunology and Immunotherapy, College of Medicine and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham; <sup>5</sup> Department of Immunology, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

## Resumen

En el presente trabajo se reporta por primera vez la purificación de la proteína OmpD de *Salmonella Typhimurium*. Se evaluaron la integridad, la pureza y la inmunogenicidad de la proteína purificada. Asimismo, se estudió la capacidad de la porina OmpD de inducir altos títulos de anticuerpos de larga duración en ratones. Se observó que la inmunización con 10 µg de la porina OmpD purificada (sin la adición de adyuvantes) indujo altos títulos de anticuerpos de las clases IgM e IgG, que se mantuvieron por más de 260 días después de la inmunización. La inmunización con OmpD indujo la presencia de las subclases de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Además, estos anticuerpos fueron capaces de reconocer y unirse a la superficie de la bacteria. En conclusión, los resultados muestran la gran capacidad inmunogénica de la porina OmpD purificada para inducir anticuerpos de larga duración, lo que pudiera ser un importante mecanismo para inducir inmunidad. De esta forma, se propone a la porina OmpD para utilizarla en la formulación de nuevas vacunas, constituidas por antígenos proteínicos purificados y libres de adyuvante adicionado, que pudieran conferir inmunidad humoral de larga duración contra las infecciones causadas por *Salmonella*.

**PALABRAS CLAVE:** *Salmonella*. Porinas. OmpD. Inmunogenicidad. Anticuerpos.

## Abstract

In the present work, we report, for the first time, on the purification of the *Salmonella Typhimurium* OmpD porin. We assessed the integrity and purity of the protein and evaluated the immunogenicity of the protein and its ability to induce antibody without exogenous adjuvant. We observed that 10 µg OmpD induced high antibody levels of IgM and IgG, which were maintained for more than 260 days after immunization. Immunization with OmpD induced multiple IgG antibody isotypes

### Correspondencia:

\*Constantino López-Macías  
UIMI, Coordinación de Investigación en Salud, Piso 4,  
Bloque B Unidad de Congresos  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Av. Cuauhtémoc, 330  
Col. Doctores  
C.P. 06720, Ciudad de México, México  
E-mail: constantino@sminmunologia.mx;  
constantino.lopez@imss.gob.mx.

including IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 subclasses. Furthermore, these antibodies were able to recognize and bind to the bacterial surface. Our results demonstrate the high immunogenicity of *S. Typhimurium* OmpD porin, which induces long-lasting antibodies which may be an important target of the immune response against *Salmonella* infection. In conclusion, we propose the OmpD porin could be used within novel subunit vaccine formulations that do not need additional adjuvant and that confer long lasting humoral immunity against *Salmonella* infections. (Gac Med Mex. 2016;152:5-13)

**Corresponding author:** Constantino López-Macias, constantino@sminmunologia.mx; constantino.lopez@imss.gob.mx

**KEY WORDS:** *Salmonella*. Porins. OmpD. Immunogenicity. Antibody

## Introducción

El género *Salmonella* está constituido por bacilos gramnegativos anaerobios facultativos. Actualmente, el género *Salmonella* consiste de dos especies, que han sido denominadas *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. A su vez, *S. enterica* está formada por seis subespecies. Cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovariedades.

Varios ejemplares de las serovariedades de *S. enterica* subespecie *enterica* causan el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos<sup>1</sup>, también conocidas como salmonelosis. Se ha estimado que, en todo el mundo, la mortalidad por enfermedades relacionadas con *S. enterica* alcanza la cifra de un millón de muertes anuales, lo que hace a este patógeno un problema de salud global.

La salmonelosis humana puede dividirse en dos síndromes: la fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea causada por *Salmonella Typhi* y la fiebre paratifoidea causada por *Salmonella Paratyphi* A, B, o C, y la gastroenteritis o envenenamiento por alimentos, causados principalmente por las serovariedades *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, o bien *Salmonella* no tifoideas (NTS)<sup>2</sup>. Este tipo de infección es la más común y no se acompaña de una infección sistémica. Sin embargo, recientemente y cada vez con mayor frecuencia se describen brotes de infecciones sistémicas causadas por algunas de estas serovariedades<sup>3</sup>. Puede también ocurrir una invasión sistémica sin gastroenteritis, sobre todo en individuos inmunocomprometidos, como en el caso de las infecciones intrahospitalarias y los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>3</sup>. En los últimos años, *S. Typhimurium* ha cobrado relevancia por el alto índice de mortalidad en los países en vías de desarrollo, como la región de África subsahariana<sup>4</sup>. En México se han presentado cepas de *S. Typhimurium* multirresistentes a antibióticos en los pollos, los cerdos y los bovinos, que son los reservorios más

frecuentes de diferentes serovariedades de *Salmonella*<sup>5</sup>, e importantemente los casos de salmonelosis se han incrementado de manera alarmante ocasionando enfermedades graves y muerte en algunos pacientes en México<sup>2</sup>.

Hoy en día no existe una vacuna eficiente disponible contra las NTS. Sin embargo, se han realizado estudios en ratones utilizando flagelina<sup>6,7</sup>, el antígeno O del lipopolisacárido (LPS)<sup>8</sup> y proteínas de membrana externa (OMP) de *S. Typhimurium* para evaluar el potencial de estos antígenos como vacunas. Las porinas son las principales proteínas de membrana externa de las bacterias gramnegativas. Estas proteínas funcionan como poros o filtros moleculares que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrófilas (nutrientes) al interior de la bacteria<sup>9</sup>. Poseen pesos moleculares de 36-42 kDa; por lo tanto, 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> bacterias expresan una concentración de porinas de 500 ng ml<sup>-1</sup> a 20 µg ml<sup>-1</sup> (0.02-0.8 mM)<sup>9</sup>. Por otro lado, se sabe que *S. Typhimurium* expresa tres porinas cuando se cultiva bajo condiciones normales (caldo Lennox o Luria-Bertani a 37 °C): OmpD (34-40 kDa), OmpF (35 kDa) y OmpC (36 kDa)<sup>10,11</sup>. La porina OmpD es la proteína de membrana externa más abundante en *S. Typhimurium* y representa aproximadamente el 1% de la proteína celular total. En estudios previos hemos reportado que la porina OmpD de *S. Typhimurium* es un blanco importante de la respuesta inmunitaria humoral protectora mediada por linfocitos B1b<sup>12</sup>. Adicionalmente, reportamos que las porinas son el blanco de la respuesta de anticuerpos bactericidas en pacientes infectados con *Salmonella* con y sin coinfección con VIH<sup>13</sup>. Una sola inmunización con porinas de *S. Typhimurium*, pero no de *S. Typhi*, puede contrarrestar la bacteriemia y proporcionar una protección equivalente contra *S. Typhimurium* virulenta y atenuada, tal como una vacuna de bacteria muerta, y es dependiente de los linfocitos B. Esto indica que OmpD es un blanco importante de los anticuerpos contra *S. Typhimurium*, y los anticuerpos anti-OmpD por sí solos son

suficientes para disminuir la infección por *S. Typhimurium*. Por lo tanto, esta proteína puede ser un candidato para una vacuna de subunidad contra la infección sistémica por NTS.

En este trabajo se purificó y se evaluó la inmunogenicidad de la porina OmpD de *S. Typhimurium*, así como las características de los anticuerpos inducidos por la inmunización con la porina, además de su contribución en la generación de altos títulos de anticuerpos de larga duración en un modelo de ratón. Nuestros resultados muestran la gran capacidad inmunogénica de la porina OmpD para inducir anticuerpos de larga duración, que pueden ser un importante mecanismo efector del sistema inmunitario contra *Salmonella*. Se propone a la porina OmpD como vacuna, constituida por antígenos proteicos purificados que puedan conferir inmunidad humoral de larga duración sin la necesidad de adyuvante.

## Material y métodos

### Cepas bacterianas

*S. enterica* serovar *Typhimurium* ATCC14028 (OmpC, OmpF y OmpD) y *S. enterica* serovar *Typhimurium* cepa (I<sub>2</sub>) fenotipo SL3261 aroA ΔOmpC::aph kanamicina (25 μg/ml) ΔOmpF::cat cloranfenicol (25 μg/ml). Esta cepa fue modificada genéticamente en el laboratorio del Dr. Adam Cunningham, de la Universidad de Birmingham, de tal manera que solo expresa la porina OmpD.

### Obtención de la porina OmpD de *S. Typhimurium* por el método de Nikaido modificado

De un cultivo de bacteria en fase de crecimiento logarítmico se cosechó la biomasa por centrifugación. Posteriormente, las células bacterianas se rompieron por disgregación mecánica y se obtuvo la membrana celular por centrifugación. La extracción de OMP se realizó siguiendo el método de Nikaido modificado<sup>14,15</sup>. Finalmente, la porina OmpD se purificó por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200 (YK 50/100 GE). La pureza y la integridad de las proteínas se verificaron mediante una electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) al 12% (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, EE.UU.). Se realizaron una tinción de Coomassie para visualizar las bandas de proteínas y una tinción de plata para evidenciar la presencia de hidratos de carbono reductores. La contaminación con LPS fue

determinada mediante la prueba de LAL (Pyrogent-5000, LONZA, Endosafe®, Charleston SC, EE.UU.).

### Ratones

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 7-8 semanas de edad (Harlan México), mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los procedimientos animales se realizaron conforme lo indica la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO 1999, con la aprobación del Comité de Ética del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

### Esquema de inmunización

Grupos de cinco ratones BALB/c de 7-8 semanas de edad fueron inmunizados por la vía intraperitoneal (ip.) en el día 0 y reinmunizados en el día 15 con 1, 10, 30 μg de OmpD o con 10 μg de porinas de *S. Typhimurium* (OmpC, OmpD y OmpF). Como control no inmunizado se usaron ratones a los que se administró solo el vehículo (solución salina isotónica [SSI]). Los sueros de los ratones se colectaron por punción en la vena facial los días 0, 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 260.

### Evaluación de la inmunogenicidad de la porina OmpD por la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Corning, NY, EE.UU.) con una solución de 10 μg/mL de los diferentes antígenos: porina OmpD de *S. Typhimurium*, porinas de *S. Typhimurium* (OmpC, OmpF y OmpD) o *S. Typhimurium* inactivada por calor  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC)/pozo, en solución amortiguadora de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio, pH 9.6). Se dejó fijando el antígeno durante 1 hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavó con solución de lavado (Tween al 0.1% en solución amortiguadora de fosfatos [PBS]). Las placas se bloquearon con 200 μL de solución de bloqueo de leche descremada Svelty al 5% en PBS (PBS-L) durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron diluciones dobles seriadas comenzando con una dilución inicial de 1:20, en solución de bloqueo. Se incubaron a 37 °C durante 1 hora y al término de ese tiempo se lavaron nuevamente con solución de lavado. Se agregó el anticuerpo secundario frente a inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen, CA, EE.UU.): IgM, IgG, IgG1,

IgG2a, IgG2b e IgG3 conjugados a peroxidasa en diluciones de 1:3,000, 1:4,000, 1:2,000, 1:2,000, 1:2,000 y 1:3,000, respectivamente, en solución de bloqueo. Se incubó durante 1 hora a 37 °C y se lavó con PBS-T. Para revelar se agregaron a cada pozo 100 µL de la solución reveladora (10 mL de solución reguladora de citratos a pH 5.6, 0.006 g de orto-fenilendiamina (Sigma, MO, EE.UU.) y 10 µL de peróxido de hidrógeno, por placa). Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos y la reacción se detuvo con 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N por pozo. Se tomaron las lecturas a 490 nm mediante un lector de microplacas (Thermo Electron Corporation, Multiskan ascent, EE.UU.). Los títulos de anticuerpos se expresaron como  $(-\log_2 \times 40)$  y se definieron como el número de diluciones seriadas antes de perder la señal de lectura, considerando el triple del valor promedio del control preinmunitario. Los datos fueron tratados con el programa de elaboración de gráficas GraphPad Prism versión 5.

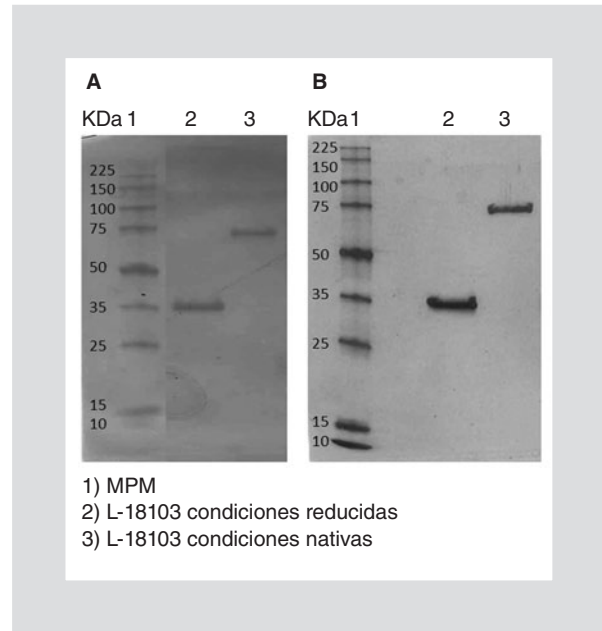
### Western blot

Se transfirieron las proteínas del gel de electroforesis a una membrana PVDF (iBlot®, EE.UU.) a 25 voltios por 20 minutos. En los siguientes pasos se utilizó la solución amortiguadora de tris-cloro (TBS). La membrana se bloqueó con una solución de TBS-leche al 5% (Tris-Cl 100 mM y NaCl al 0.9%, pH 7.5), se incubó a 37 °C durante 24 horas con agitación constante y se lavó con TBS-tween 20 al 0.05%. Como primer anticuerpo se empleó el suero problema (día 30, dosis 30 µg) diluido 1:200 en solución de TBS-leche al 5%. Se incubó a 37 °C por 2 horas, con agitación constante. Después del lavado se agregó un anticuerpo de cabra anti-IgG conjugado a peroxidasa de rábano (Anti-IgG HRP, Invitrogen, EE.UU.), diluido 1:200 con TBS-leche al 5%. Posteriormente se incubó a 37 °C, durante 1 hora, a 60 rpm. Finalmente se lavó y se reveló con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 4-cloro-alfa-naftol (Bio-rad Laboratories, EE.UU.). Se lavó con agua destilada para detener la reacción.

### Resultados

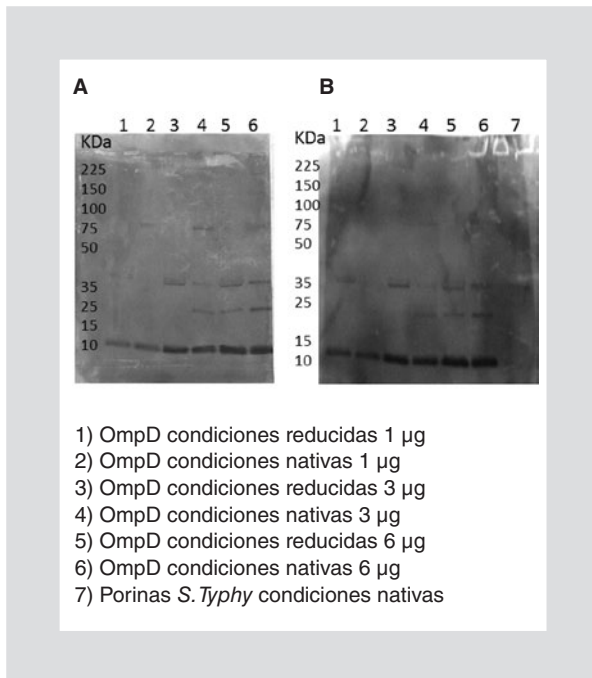
#### Extracción, purificación y caracterización de la porina OmpD de *S. Typhimurium*

Con el objetivo de analizar la eficiencia de la purificación de la porina OmpD obtenida en la cromatografía de exclusión molecular y confirmar su identidad e integridad, se realizó una electroforesis. En la figura 1



**Figura 1.** Análisis electroforético de la porina OmpD de *S. Typhimurium* purificada por el método de Nikaido modificado. SDS-PAGE: en cada carril se adicionó lo equivalente a 3 µg de porina OmpD. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: porina OmpD purificada a partir de *S. Typhimurium* (I<sub>2</sub>) en su forma monomérica. Carril 3: porina OmpD en su forma nativa o de trímero. A: tinción de Coomassie para presencia de proteínas. B: tinción de plata para presencia de hidratos de carbono.

se muestran las proteínas purificadas a partir de la cepa *S. Typhimurium* (I<sub>2</sub>) que únicamente expresa la porina OmpD. Las porinas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12.0% en condiciones reductoras. Para corroborar la presencia de hidratos de carbono como LPS se realizó una tinción de plata (Fig. 1 B), y para demostrar la presencia de proteínas se realizó la tinción de Coomassie (Fig. 1 A). Los trímeros de porinas que se obtuvieron fueron hervidos en presencia de SDS para generar monómeros; está demostrado que este tratamiento no desnaturaliza a estas proteínas, únicamente ocasiona la desorganización de los trímeros en monómeros. En el carril 2 de las figuras 1 A y 1 B se observa una única banda a 34 kDa que corresponde a la porina OmpD en su forma desnaturalizada o de monómero. En el carril 3 se muestra la proteína nativa o en su forma de trímero (condiciones no desnaturalizantes), aproximadamente a la altura de 75 kDa. Otros grupos han purificado OmpD con un peso molecular de 34 kDa, mientras que otros han obtenido la misma proteína a 40 kDa. Con estos resultados podemos afirmar que la purificación de la porina OmpD fue exitosa, obteniendo una única banda de proteína sin contaminación de otras. Por otro lado, pudimos constata-



**Figura 2.** Western-blot de la porina OmpD de *S. Typhimurium* purificada por el método de Nikaido modificado. Inmunoblot de la porina OmpD de *S. Typhimurium* usando un suero policlonal específico, obtenido de grupos de ratones inmunizados únicamente con la porina de interés (pool del grupo con 30 µg de OmpD al día 30 de la primera inmunización). Se reveló con anti-IgG<sub>T</sub>. A: carril 1, porina OmpD desnaturalizada (1 µg); carril 2, porina OmpD no desnaturalizada (1 µg); carril 3, porina OmpD desnaturalizada (3 µg); carril 4, porina OmpD no desnaturalizada (3 µg); carril 5, porina OmpD desnaturalizada (6 µg); carril 6, porina OmpD no desnaturalizada (6 µg). B: carril 7, porinas de *S. Typhi* desnaturalizadas (3 µg).

tar que en la preparación no se encontró contaminación con LPS, al no obtener tinción positiva para hidratos de carbono en la tinción de plata. La ausencia de LPS fue corroborada al obtener un resultado negativo en la medición de endotoxina por Limulus (datos no mostrados).

### Western blot de la porina OmpD de *S. Typhimurium*

Para evaluar la integridad estructural y antigénica de la porina OmpD se realizó una *Western blot*. Para esto se utilizó un suero policlonal e hiperinmune anti-OmpD (1:200) de ratones previamente inmunizados con 30 µg de OmpD en el día 30 después de la primera inmunización. En la membrana de inmunotransferencia (Fig. 2) se encontró que el suero sí reconoció a la porina OmpD, tanto en su forma nativa como en la desnaturalizada. En los carriles con 3 y 6 µg de porina se observaron tres bandas en el

carril de condiciones desnaturalizadas y cuatro bandas en el carril de condiciones nativas. Esto indica que existe integridad antigénica específica para la porina OmpD, pero también la hay para otras proteínas dentro de la misma preparación, las cuales son igualmente antigénicas.

### Evaluación de la capacidad inmunogénica de la porina OmpD de *S. Typhimurium*

Los resultados de la inmunogenicidad de la porina OmpD se muestran en la figura 3, donde se observan los títulos de anticuerpos analizados hasta durante 9 meses (260 días). Se encontró que, durante la respuesta primaria, la porina OmpD induce una respuesta rápida de IgG e IgM desde los 4 días después de la inmunización y con las tres dosis probadas, siendo mayores los títulos de IgM al día 4. Posteriormente, durante la respuesta secundaria (refuerzo al día 15), los niveles de IgG alcanzaron su máximo en el lapso entre los días 30 y 90 (Fig. 3 A), mientras que los títulos de IgM presentaron el máximo incremento al día 4 (Fig. 3 B).

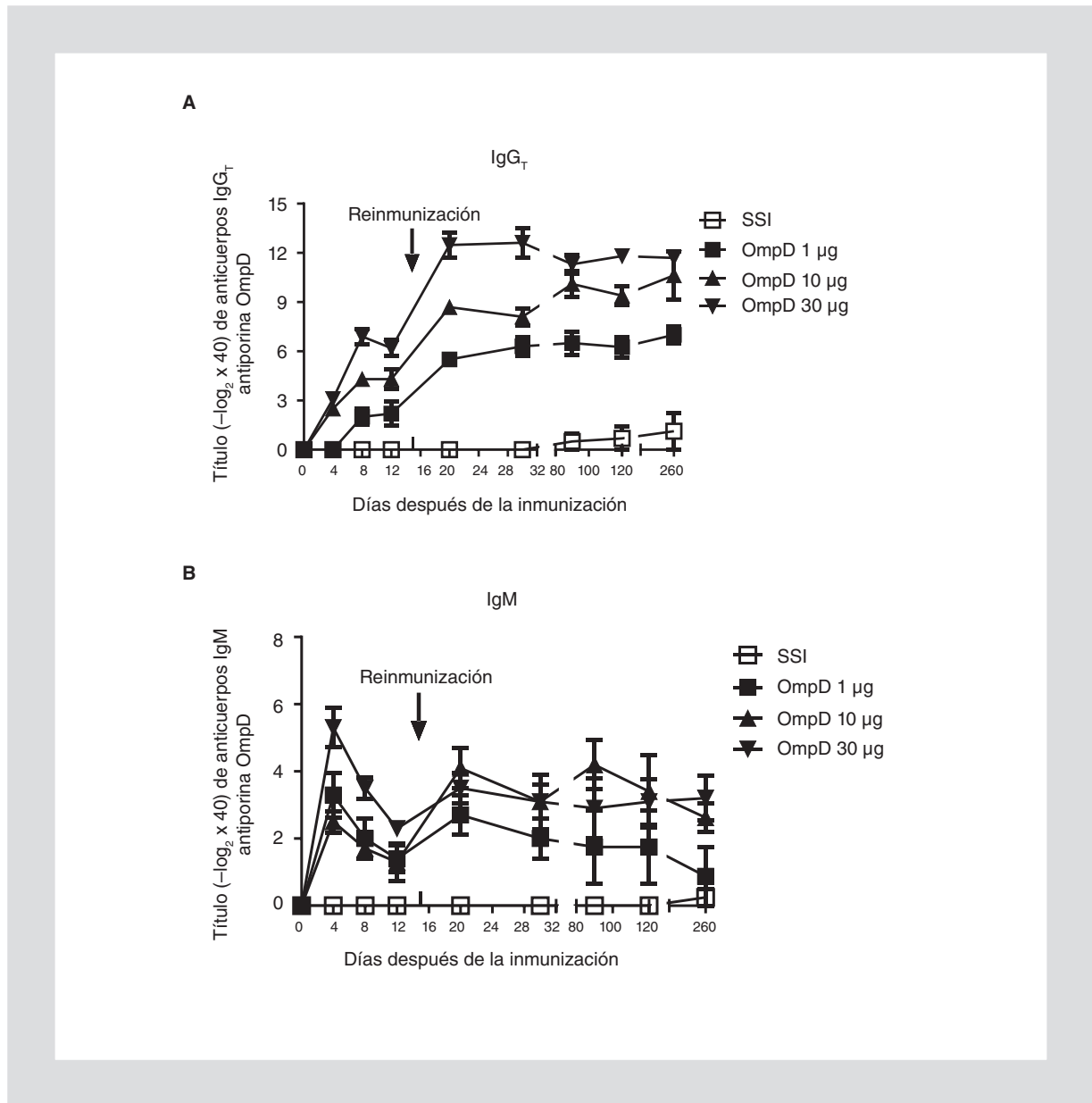
Se observó un efecto dependiente de la dosis: a mayor cantidad de OmpD inmunizada, mayor título de anticuerpos. En el caso de la IgG total, las dosis de 10 y 30 µg de porina OmpD generaron los mayores títulos. Sin embargo, no hubo grandes diferencias entre las tres dosis administradas en cuanto a los títulos de IgM (Fig. 2 B).

Asimismo, después de que se observó que la porina OmpD era inmunogénica, se evaluó si es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos de larga duración; para ello, se evaluó la producción de anticuerpos específicos durante los 260 días posteriores a la inmunización. Se observó que los títulos de IgG se mantienen constantes desde el día 90 al 260, mientras que los títulos de IgM decrecen paulatinamente (Fig. 3).

Los resultados muestran que la porina OmpD es capaz de inducir títulos de anticuerpos de larga duración, tanto IgM como IgG, y que la menor dosis a la cual observamos una buena respuesta de anticuerpos es 10 µg, por lo que se concluyó que esta dosis es la óptima.

### La inmunización con la porina OmpD de *S. Typhimurium* induce un cambio de isotipo

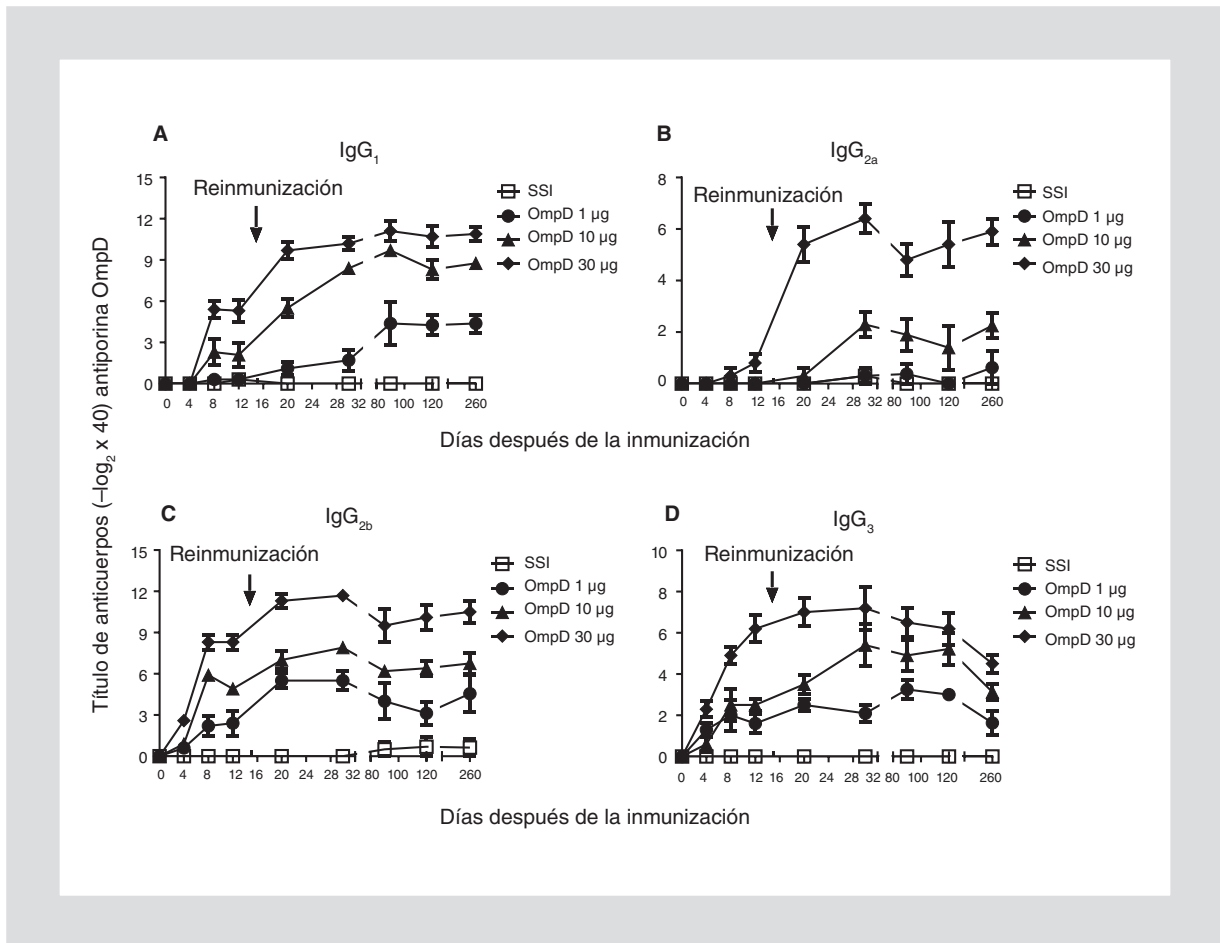
Para estudiar las características de los anticuerpos inducidos por las porinas, se analizaron las subclases



**Figura 3.** Diferentes dosis de la porina OmpD de *S. Typhimurium* inducen una respuesta de anticuerpos IgG<sub>T</sub> e IgM en un modelo murino. R ratones BALB/c de 7-8 semanas se inmunizaron ip. con 1 µg (■), 10 µg (▲), 30 µg (▼) y SSI (●) de la porina OmpD de *S. Typhimurium*, con una reinmunización al día 15. El título de anticuerpos anti-OmpD se evaluó mediante ELISA los días 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 260 después de su inmunización. A: títulos de anticuerpos anti-OmpD de clase IgG<sub>T</sub>, utilizando tres dosis diferentes de inmunización. B: títulos de anticuerpos anti-OmpD de clase IgM utilizando tres dosis diferentes de inmunización. Los resultados se expresan como la media ± SD de cinco ratones por grupo. Los datos corresponden al resultado de un experimento.

de IgG presentes en los sueros antiporina OmpD. Se observó una respuesta rápida, principalmente de IgG2b e IgG3 (Figs. 4 C y D), con títulos que mostraron un incremento al día 4 después de la primera inmunización. La presencia de IgG1 se detectó a partir del día 8 (Fig. 4 A); en el caso de la IgG2a, no hubo mayor respuesta hasta la reinmunización al día 15 (Fig. 4 B). La respuesta secundaria se caracterizó

por la presencia de todas las subclases de IgG en el siguiente orden: IgG2b >> IgG1 > IgG3 > IgG2a. Durante la respuesta de larga duración (día 260) se observaron títulos elevados de las subclases IgG2b > IgG1 > IgG2a > IgG3, que no desaparecen, manteniéndose constantes del día 90 al 260. Únicamente en el caso de la IgG3 se observó un decremento al día 260.



**Figura 4.** Diferentes dosis de la porina OmpD de *S. Typhimurium* inducen varias subclases de IgG en un modelo de ratón. Ratones BALB/c de 7-8 semanas se inmunizaron ip. con 1 µg (●), 10 µg (▲), 30 µg (◆) y SSI (□) de la porina OmpD de *S. Typhimurium* I<sub>2</sub> con una reinmunización al día 15. El título de anticuerpos anti-OmpD se evaluó mediante ELISA los días 4, 8, 12, 20, 30, 90, 120 y 242 después de su inmunización. A: títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG1. B: títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG2a. C: títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG2b. D: títulos de anticuerpos anti-OmpD subclase IgG3. Los resultados se expresan como la media ± SD de cinco ratones por grupo. Los datos corresponden al resultado de un experimento.

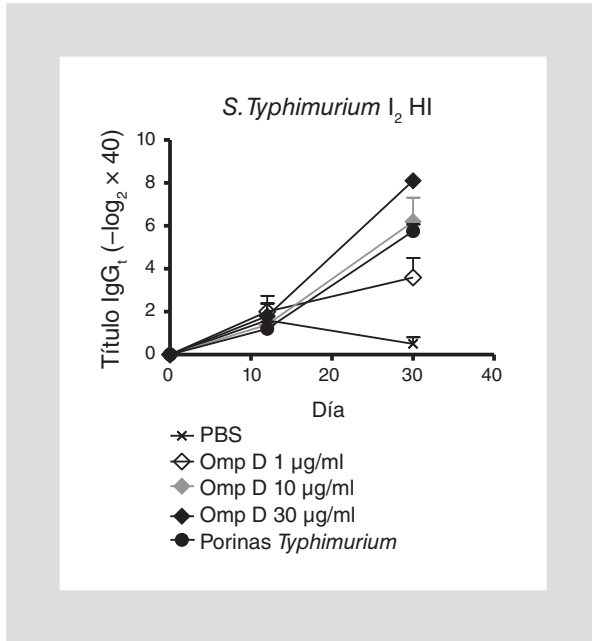
### Los anticuerpos inducidos por OmpD reconocen a la bacteria completa

Para evaluar si los anticuerpos anti-OmpD generados por la inmunización con la proteína purificada reconocen a la porina nativa en la superficie bacteriana, se procedió al análisis de la capacidad de unión a la superficie de *S. Typhimurium*. Mediante ELISA se evaluó si estos anticuerpos podían reconocer de manera directa a la bacteria completa. La bacteria *S. Typhimurium* cepa I<sub>2</sub> se incubó junto con los sueros de la respuesta primaria (día 12) y de la respuesta secundaria (día 30). Se encontró que la rápida respuesta de IgG (Fig. 5) era capaz de reconocer a la bacteria. Esta capacidad se incrementa utilizando el suero de los ratones inmunizados al día 30, donde se

observa en cada dosis administrada la máxima unión en diferente intensidad, siendo el reconocimiento en el siguiente orden: respuesta secundaria > respuesta primaria. Estos resultados muestran que los anticuerpos IgG contenidos en los sueros antiporinas poseen la capacidad de unirse directamente a la superficie de la bacteria, lo que sugiere que reconocen epítopos accesibles y expuestos de la porina OmpD en la superficie de la bacteria.

### Discusión

En este trabajo reportamos por primera vez la purificación la porina OmpD mediante el método de Nikaido modificado. Los resultados obtenidos son muy similares a los reportados con otros métodos en los que



**Figura 5.** Diferentes dosis de la porina OmpD de *S. Typhimurium* inducen anticuerpos capaces de reconocer y unirse a la superficie de la bacteria *S. Typhimurium*. Ratones BALB/c de 7-8 semanas se inmunizaron ip. con 1 µg (◇), 10 µg (◆) y 30 µg (♦) de la porina OmpD de *S. Typhimurium*, PBS (x) y 10 µg de porinas de *S. Typhimurium* (●), con una reinmunización al día 15. Se determinó por medio de ELISA el título de anticuerpos anti-OmpD de clase IgG<sub>1</sub> capaces de unirse a la superficie de la bacteria. Fueron evaluados al día 12 (antes de la reinmunización) y al día 30 (después de la reinmunización). Los resultados se expresan como la media ± SD de cinco ratones por grupo. Los datos corresponden al resultado de un experimento.

se purifican las porinas mayoritarias de *S. Typhimurium*<sup>10,11,16</sup>. La contribución del LPS contaminante en la respuesta de anticuerpos puede ser excluida, ya que se ha reportado que la inmunización con 2 µg de LPS no ejerce efectos sobre la respuesta de anticuerpos antiporinas<sup>17</sup>. Satisfactoriamente, en el lote obtenido se reportó 0.16 ng de endotoxina por cada 10 µg de proteína, por lo cual puede descartarse el papel del LPS en la respuesta de anticuerpos observada. La integridad de la proteína se observó por un gel de SDS-PAGE, en el cual no se observó degradación de las porinas ni de otras proteínas contaminantes. De estos datos se concluyó que la purificación de la porina OmpD fue exitosa, ya que la única banda obtenida descarta la presencia de otras posibles porinas, como OmpC (36 kDa), OmpF (34 kDa), OmpS1 (41 kDa) u OmpS2 (41 kDa), obteniendo así, por vez primera, un lote puro de OmpD<sup>18</sup>.

La identidad de la proteína OmpD se corroboró por *Western-blot*. Sin embargo, la presencia de otras bandas de proteína de menor peso molecular parece

indicar que se encuentran fragmentos de la proteína OmpD, los cuales podrían contener epítopos lineales u ocultos que resultan ser más inmunogénicos que los epítopos conformacionales de la misma porina en su forma de trímero o monómero. Nos encontramos investigando más a fondo la naturaleza y el origen de estos fragmentos de proteína contenidos en la preparación.

En este estudio se demostró que la porina OmpD de *S. Typhimurium* es altamente inmunogénica, capaz de generar una respuesta de anticuerpos de clase IgM y de subclases de IgG que se mantiene durante 260 días tras la inmunización. La respuesta de anticuerpos de larga duración se define como la presencia durante años de inmunoglobulinas a nivel sistémico o local en los individuos inmunizados, que puede conferir inmunidad contra reinfecciones. Sin embargo, en muchos casos la presencia de altos títulos de anticuerpos no implica que cuenten con una actividad biológica. Por ello, es necesario estudiar algunos parámetros muy importantes de los anticuerpos, como lo son su especificidad, isotipo, subclase y concentración, los cuales van a determinar su función efectora: neutralización, opsonización, fagocitosis y capacidad de activar al complemento<sup>19-21</sup>.

Como una forma de aproximarnos a la identificación de las funciones efectoras de los anticuerpos anti-OmpD en la defensa contra *Salmonella*, se evaluó si las IgG presentes en los sueros anti-OmpD reconocen de manera directa a la bacteria intacta, ya que el reconocimiento de epítopos expuestos es el primer paso para la activación de los componentes del complemento y de otros mecanismos efectoras. Los resultados demuestran que los sueros anti-OmpD poseen la capacidad de reconocer a la bacteria *S. Typhimurium*. En el ratón, las subclases que mejor fijan el complemento son IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub>. Por lo tanto, los altos niveles de IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>2a</sub> anti-OmpD de larga duración sugieren que estas subclases podrían inducir efecto bactericida. Por otra parte, se demostró previamente que la presencia de anticuerpos bactericidas es necesaria para la respuesta protectora contra *Salmonella*<sup>22</sup>. Además, la presencia de las otras subclases, como IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-OmpD, sugiere la existencia de otras funciones biológicas no bactericidas de los anticuerpos presentes en los sueros antiporinas, como son la neutralización de la bacteria y la fagocitosis mediada por receptores Fc.

La porina OmpD es una proteína mayoritaria de *S. Typhimurium* que expresa la bacteria abundantemente. En el caso de las porinas mayoritarias de



*S. Typhi*, se ha demostrado que son un blanco específico de la respuesta inmunitaria, induciendo altos títulos de anticuerpos de larga duración con actividad bactericida y opsonofagocítica que explican su capacidad de conferir protección frente al reto con la bacteria. El presente trabajo demostró que la porina OmpD de *S. Typhimurium* se comporta como un antígeno altamente inmunogénico, capaz de inducir anticuerpos de larga duración que probablemente estén implicados en la protección contra la infección por *S. Typhimurium*. Estos resultados muestran características importantes de la porina OmpD que abren la posibilidad para que sea considerada como un antígeno candidato para el desarrollo de una vacuna capaz de inducir protección de larga duración frente a la infección con *S. Typhimurium*, y posiblemente para prevenir la NTS inducida por estas y otras *Salmonellas*, o bien para su uso como marcador diagnóstico.

## Bibliografía

- Swearingen MC, Porwollik S, Desai PT, McClelland M, Ahmer BM. Virulence of 32 *Salmonella* strains in mice. *PLoS One*. 2012;7:e36043.
- Calva E. *Salmonella Typhi* la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. En: Martínez Romero E, Martínez Romero JC, editores. *Microbios en línea*. Instituto de Biotecnología, UNAM; 2002.
- Morpeth SC, Ramadhani HO, Crump JA. Invasive non-typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clin Infect Dis*. 2009;49:606-11.
- Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*. 2012;379:2489-99.
- Zaidi MB, Macias CL, Calva E. [Mexican studies on *Salmonella*: epidemiology, vaccines and molecular biology]. *Rev Latinoam Microbiol*. 2006;48:121-5.
- Kodama C, Matsui H. *Salmonella* flagellin is not a dominant protective antigen in oral immunization with attenuated live vaccine strains. *Infect Immun*. 2004;72:2449-51.
- Bobat S, Flores-Langarica A, Hitchcock J, et al. Soluble flagellin, FliC, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of *Salmonella Typhimurium* infection. *Eur J Immunol*. 2011;41:1606-18.
- Svenson SB, Lindberg AA. Artificial *Salmonella* vaccines: *Salmonella Typhimurium* O-antigen-specific oligosaccharide-protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. *Infect Immun*. 1981;32:490-6.
- Tamm LK, Arora A, Kleinschmidt JH. Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins. *J Biol Chem*. 2001;276:32399-402.
- Frohlich KS, Papenfort K, Berger AA, Vogel J. A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:3623-40.
- Meyer PN, Wilmes-Riesenberg MR, Stathopoulos C, Curtiss R, 3rd. Virulence of a *Salmonella Typhimurium* OmpD mutant. *Infect Immun*. 1998;66:387-90.
- Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, et al. The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9803-8.
- MacLennan CA, Gilchrist JJ, Gordon MA, et al. Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal *Salmonella* in HIV-infected African adults. *Science*. 2010;328:508-12.
- Nikaído H. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol*. 1983;97:85-100.
- Salazar-Gonzalez RM, Maldonado-Bernal C, Ramirez-Cruz NE, et al. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar Typhibactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett*. 2004;93:115-22.
- Bentley AT, Klebba PE. Effect of lipopolysaccharide structure on reactivity of antiporin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface. *J Bacteriol*. 1988;170:1063-8.
- Secundino I, Lopez-Macias C, Cervantes-Barragan L, et al. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology*. 2006;117:59-70.
- Santiviago CA, Toro CS, Hidalgo AA, Youderian P, Mora GC. Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium major porin, OmpD. *J Bacteriol*. 2003;185:5901-5.
- Gavin AL, Barnes N, Dijstelbloem HM, Hogarth PM. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 1998;160:20-3.
- Hazenbos WL, Heijnen IA, Meyer D, et al. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol*. 1998;161:3026-32.
- Biburger M, Aschermann S, Schwab I, et al. Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. *Immunity*. 2011;35:932-44.
- Siggins MK, Cunningham AF, Marshall JL, Chamberlain JL, Henderson IR, MacLennan CA. Absent bactericidal activity of mouse serum against invasive African nontyphoidal *Salmonella* results from impaired complement function but not a lack of antibody. *J Immunol*. 2011;186:2365-71.