

98

24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSFERENCIA CELULAR ADOPTIVA E INFECCION *in vivo* CON
Salmonella typhimurium EN DIVERSAS CEPAS MURINAS ENDOGAMICAS.

TESIS

que para obtener el titulo de:

BIOLOGO

presenta:

VICTOR MANUEL JIMENEZ FLORES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F. 1991.



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 está 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.

INDICE

I.-INTRODUCCION

A.1 .- GENERALIDADES DE.
Salmonella typhimurium.

A.2.- CONSTITUYENTES DE LA MEMBRANA EXTERNA DE
Salmonella typhimurium.

A.3.- CONTROL GENETICO DE LA SUCEPTIBILIDAD A
Salmonella typhimurium.

B.1 .- MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA *Salmonella*
typhimurium.

B.2 .- ANTICUERPOS Y COMPLEMENTO.

B.3 .- MACROFAGOS.

B.4 .- LINFOCITOS T.

II.- OBJETIVOS.

III.- MATERIALES Y METODOS.

IV.- RESULTADOS.

V.- DISCUSION.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

PRINCIPALES ABREVIATURAS.

CON-A	Concanavalina-A
c.p.m	Cuentas por minuto
DI ₅₀	Dosis invasiva al 50%
DME	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardío
H-2	Complejo de Histocompatibilidad en el ratón
Hanks'	Solución balanceada de sales.
HEPES	Acido (2-hidroxietyl) 1-piperazin-etano-sulfónico
IFN Γ	Interferón gama
IL-1, IL-2	Interleucina 1 e Interleucina 2
KDa	Kilodaltons
lps	Gene de suceptibilidad a Lipopolisacárido
Omp	Proteína de membrana externa
PME	Proteínas de membrana externa
PBS	Amortiguador de fosfatos-solución salina
RPMI	Medio McCoy's 5A modificado
SDS/PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino

RESUMEN

Para estudiar las interacciones celulares que se llevan a cabo durante la infección con *Salmonella typhi*, parásito exclusivo del hombre, es necesario crear modelos de infección; empleando el modelo murino, se correlaciona la infección por *Salmonella typhimurium*, en diversas cepas singénicas con diferentes genes Ity y H-2.

Por otra parte mediante la transferencia pasiva celular se investiga la participación de linfocitos T durante la infección con *Salmonella typhimurium*. Los resultados obtenidos en este trabajo indican una estrecha dependencia entre la infección por la bacteria y la expresión de los diferentes genes mencionados, además se sugiere una importante participación de linfocitos T en el control de la infección por *Salmonella typhimurium* en macrófagos murinos.

INTRODUCCION.

Salmonella typhi es una enterobacteria cuyo huésped es el ser humano, pertenece a la tribu Salmonelae y a la familia Enterobacteriaceae. Según la clasificación de Kauffman-White, pertenece al grupo D con antígenos somáticos 9,12; los flagelos contienen el antígeno "d" y expresa en la superficie el antígeno denominado "Vi"; por lo que la fórmula antigénica de *Salmonella typhi* es 9,12,Vi:d (47).

La fiebre tifoidea es causada por *Salmonella typhi*, y es una enfermedad infecto-contagiosa exclusiva del ser humano. La vía de entrada al organismo es oral y según Woodward y col. (1968) mil millones de bacterias enferman al 95 % de las personas que la ingieren. Este parásito puede reproducirse en la luz intestinal antes de penetrar la mucosa del intestino delgado. La salmonella no lesiona el epitelio intestinal y parece tener selectividad por las células "M" (6) que de alguna manera le permiten el paso al torrente sanguíneo.

Posteriormente se presenta la bacteremia, en la cual preferencialmente la bacteria es fagocitada por macrófagos y llevada al sistema fagocítico-mononuclear de donde posteriormente se disemina por todo el organismo, de manera que en 24 h la bacteria se localiza intracelularmente y no es accesible a algunos antibióticos.

Los mecanismos patogénicos de esta enfermedad no están totalmente esclarecidos, a pesar de que se han intentado describir

desde el siglo pasado, sin embargo se sabe que las manifestaciones clínicas están dadas por la liberación de endotoxinas y por factores solubles liberados por el macrófago (IL-1 y INF- γ) (8,9). Su estudio se ha visto limitado por que *Salmonella typhi* es un parásito exclusivo del hombre lo cual impide el establecimiento de modelos baratos y de fácil manejo. Para sortear el fenómeno de restricción hacia el huésped se ha implementado el modelo experimental que emplea como huésped al ratón y como parásito a *Salmonella typhimurium* (2,50,4,60,18), esto porque la bacteria es parásito natural del ratón y la enfermedad que produce semeja en varios aspectos a la enfermedad ocasionada por *Salmonella typhi* en humanos.

Salmonella typhimurium es un inmunógeno complejo que interactúa con el sistema inmune del huésped susceptible despertando una respuesta inmune humoral o celular a una gran variedad de antígenos ya sea de naturaleza proteica, polisacarídica o lipídica. Dentro de los antígenos proteicos están las proteínas de membrana externa (PME), de estas, las porinas, con un peso molecular de 36 a 38 KDa, se han empleado en modelos de protección contra la infección por la bacteria (79). De esta manera se ha demostrado que las porinas de *Salmonella typhimurium* inducen protección frente al reto con la bacteria homóloga en ratones (48).

Además se ha demostrado una gran homología entre las porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d y *Salmonella typhimurium* (48); por otra parte se ha observado que el suero de conejo anti-porinas de *Salmonella typhi* inducen protección pasiva en el modelo murino

frente al reto con la bacteria (37,38); más aun, el suero de pacientes convalecientes con fiebre tifoidea contiene anticuerpos de clase IgG que reconocen específicamente a las porinas (63) y la inmunización con estas proteínas a ratones NIH confiere protección activa frente al reto de 500 DL₅₀ de la bacteria (79), además, en la respuesta inmune a las porinas, se ha constatado una proliferación T específica (26).

Sin embargo, respecto a otros antígenos de la membrana externa de la bacteria, se ha demostrado que cuando *Salmonella typhimurium* es opsonizada, con anticuerpos contra LPS, puede ser eliminada fácilmente por ratones susceptibles a la infección (12,67), sin embargo se sabe que estos anticuerpos no confieren protección pasiva frente al reto con la bacteria, de ahí que la importancia que pueda tener la respuesta inmune humoral contra este tipo de antígenos todavía es controversial.

En cuanto a la vacunación contra la enfermedad se han hecho varios intentos, los cuales inician en 1897 en Alemania con Pfeiffer y Kölle utilizando por primera vez vacunas inactivadas para inmunización en humanos. En este caso por ejemplo la vacuna fue preparada en medio sólido e inactivada por calor a 56°C (24) y se utilizó en la India, Egipto, Italia y Sudáfrica con lo que se observó cierta disminución de la morbilidad y en los casos en que se presentó la enfermedad hubo atenuación de los síntomas (24).

Las vacunas antitifoídicas elaboradas con bacterias muertas siguieron utilizándose durante décadas sin demostrarse su efecto protector real, ya que se carecía de modelos animales que probaran su eficacia y, además, no se acertaba a relacionar el supuesto efecto protector con algún indicador serológico. Esto se logró hasta 1955, a partir de esta fecha bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se realizaron estudios de campo en Yugoslavia, Guayana, Polonia y la Unión Soviética, en estos lugares se investigó la eficacia de vacunas preparadas con células completas de *Salmonella typhi*, inactivadas con acetona (vacuna K) y con calor-fenol (vacuna L). Estos estudios demostraron que la vacuna K fué la mejor y se encontró que la protección era mayor cuando se aplicaban dos dosis (14,31,69,83,88).

El hecho de que las vacunas parenterales presenten efectos colaterales indeseables, motivó la búsqueda de nuevos inmunógenos protectores. Hasta la fecha se han estudiado dos vacunas que se administran por vía oral y que se elaboran con bacterias vivas. Una de ellas se prepara con una cepa de *Salmonella typhi* dependiente de estreptomycinina y la otra con una mutante deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa (Designada por Germanier como Ty21a) (23,70). Los resultados obtenidos con la vacuna hecha a base de bacterias estreptomycinina dependientes fueron contradictorios, ya que en algunos casos no hubo protección (70).

Los estudios realizados con la vacuna Germanier en Egipto

demonstraron que era capaz de proteger al 96 % de la población vacunada, según los resultados obtenidos durante un período de seguimiento que duró 36 meses cuando la vacuna se administró a niños de edad escolar en un esquema que incluía 3 dosis en una semana, previa neutralización de la acidéz gástrica, con NaHCO_3 ; sin embargo, cuando se aplicó en Chile, se encontró que con 3 dosis administradas (cápsulas con capa entérica), con intervalos de 2 a 21 días cada dosis, solo se inducía protección del 51 al 67% respectivamente (23).

En México se elabora una vacuna a base de *Salmonella typhi* inactivada por calor, la cual se aplica por vía intramuscular y requiere de dos dosis y revacunación al año, no se utiliza en menores de edad ni en grandes campañas de vacunación por los efectos colaterales que ocasiona la presencia de endotoxina, además confiere protección por corto tiempo.

Por lo tanto, es necesario hacer uso de los conocimientos actuales para la elaboración de una vacuna contra fiebre tifoidea que no cause efectos secundarios, así mismo se hace necesaria la estandarización de modelos de infección bacteriana en especies animales cuya sintomatología refleje la del humano con el fin de probar dicha vacuna.

A.1.- GENERALIDADES de *Salmonella typhimurium*.

Salmonella typhimurium, es una enterobacteria gram-negativa,

contiene una envoltura celular compleja constituida por membrana citoplasmática, peptidoglicana y membrana externa; es un parásito intracelular móvil y anaerobio facultativo.

A.2.- CONSTITUYENTES DE LA MEMBRANA EXTERNA *Salmonella typhimurium*.

La envoltura celular de las bacterias gram-negativas es compleja, además de la membrana citoplasmática y la peptidoglicana, tienen una membrana exterior conocida como membrana externa. Esta membrana actúa como una barrera impidiendo la entrada a la célula de sustancias tóxicas como detergentes, y está relacionada con los procesos de conjugación, división celular y con el transporte de sustancias al interior de la célula (33).

La composición proteica de las dos membranas es completamente distinta, en la membrana citoplasmática se encuentran una gran variedad de proteínas, mientras que en la membrana externa la composición proteica es simple ya que existen pocas proteínas pero en cantidades elevadas (33).

Braun y Rehn (1968) fueron los primeros en aislar una proteína de membrana externa, de naturaleza lipoproteica que se encontraba unida covalentemente a la peptidoglicana, a la cual actualmente se le conoce con el nombre de lipoproteína de Braun (7).

Schnaitman (1970) estudio el patrón electroforético de las proteínas de membrana externa (PME) de *Escherichia coli* en geles de poliacrilamida SDS y encontró que una banda proteica principal con un peso molecular de 44000 Da, constituía el 70 % de las proteínas totales de la membrana externa, a esta proteína la llamó "proteína principal de membrana externa" (77) posteriormente demostró que la banda proteica principal estaba constituida por cuatro polipéptidos diferentes a los cuales llamó 1a, 1b, 3a, 3b (77).

Las cuatro proteínas 1a, 1b, 3a y 3b descritas por Schnaitman junto con la lipoproteína de Braun constituyen el grupo de las proteínas principales o mayores de la membrana externa de *E. coli* ya que son las más abundantes en dicha membrana.

Las PME de *S.typhimurium* son muy similares a las de *E. coli* ya que contienen cuatro proteínas principales con pesos moleculares que van de 33 a 36 KDa, tres de estas proteínas se han identificado como porinas 34, 35 y 36 KDa y la proteína de 33 KDa como la proteína modificable por el calor (59).

Osborn y Wu (1980) clasificaron la PME en principales y menores. Las proteínas principales las dividieron en tres grupos: Las proteínas matrices o porinas (1a y 1b), la proteína modificable por el calor (3a) y la lipoproteína de Braun (64).

Proteínas matrices o porinas.- se caracterizan por estar fuertemente unidas a la peptidoglicana, su composición varía dependiendo de la cepa de origen, Rosenbusch (1974) encontró que la cepa de *E. coli* B producía solo un tipo de proteína matriz, la 1a, mientras que la cepa salvaje de *E. coli* K-12 producía los dos tipos 1a y 1b.

Pugsley y Schnaitman (1978) demostraron que *E. coli* K-12 tiene la capacidad genética de producir otro tipo de proteínas matrices, las llamadas nuevas proteínas de membrana externa, estas sólo se encuentran en cepas de *E. coli* que han perdido la capacidad de sintetizar las proteínas 1a y 1b (77).

Nakae y Nikaido (1975) demostraron que la incorporación de estas proteínas a vesículas artificiales de fosfolípidos y lipopolisácarido hacían a las vesículas permeables a sacáridos de bajo peso molecular. Por los resultados anteriores se concluyó que la función de estas proteínas es la de formar "poros" de difusión pasiva, que permitieran el paso de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular a través de la membrana y por esta propiedad se les conoce como porinas (77,19).

Nakae (1976) demostró que estos poros facilitaban el transporte de compuestos tales como azúcares, aminoácidos e iones orgánicos cuyos pesos moleculares no excedían de 550 Da. Estas conclusiones están apoyadas por el hecho de que mutantes de *S.*

typhimurium y *E. coli* deficientes en estas proteínas presentan defectos en el transporte de dichas sustancias.

Las proteínas matrices se encuentran localizadas en la superficie de la membrana y actúan como receptores de fagos y colicinas. Estas proteínas matrices se arreglan en unidades triméricas, que constituyen la unidad funcional del poro; estudios de microscopía electrónica sugieren que estas unidades forman redes hexagonales en la membrana y cubren el 60 % de la superficie de la peptidoglicana (59).

Las proteínas matrices de *S. typhimurium* pesan 34, 35 y 36 KDa y tienen características químicas y funcionales similares a las proteínas 1a y 1b de *E. coli* (59).

Lee y Schnaitman (1980) hicieron una comparación desde el punto de vista genético de las PME de *E. coli* y *S. typhimurium* y encontraron una gran similitud entre los genes estructurales que las codifican, dichos autores propusieron establecer una nomenclatura única para las PME de ambas cepas ya que la posición de los genes que codifican para la síntesis de estas proteínas en el mapa genético de ambas bacterias es aproximadamente la misma. En base a esta similitud en la nomenclatura propuesta se identifican las proteínas por sus genes estructurales o por el locus genético que determina su producción; así por ejemplo la proteína OmpC es el producto del gene estructural omp C (77).

Basándonos en esta nomenclatura la cepa *E. coli* K-12 produce dos especies de porinas: la proteína OmpC (1b) y OmpF (1a) y los genes estructurales que codifican la síntesis de estas proteínas son el *omp C* y *omp F* respectivamente, la expresión de estas proteínas está regulada por un gene presente en el locus *omp B*. La cepa de *S. typhimurium* LT2 produce tres clases de porinas la OmpC (36 KD), OmpF (35 KD) y la OmpD (34 KD). La expresión de las proteínas OmpC y OmpF al igual que en *E. coli* también está regulada por un gene presente en el locus *omp B*. Finalmente los autores proponen que estas proteínas derivan de un gene ancestral común presente en las enterobacterias.

La proteína modificable por el calor es el producto del gene estructural *omp A* y se le conoce como la proteína OmpA. Está involucrada en procesos de conjugación y actúa como receptor para fagos y colicinas.

La lipoproteína de Braun está unida covalentemente a la peptidoglicana y su función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

Con respecto a las proteínas menores se ha demostrado que intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular y que están relacionadas con la división celular.

Debido a la localización de las PME sobre la superficie de las bacterias gram negativas, estas han sido consideradas como antígenos importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora, las porinas son las proteínas responsables de tal protección (67).

A.3.- CONTROL GENETICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A *Salmonella typhimurium*.

Al menos dos genes están implicados en la resistencia o susceptibilidad del ratón a *S. typhimurium* y son el gen Ity y el gen H-2 (60). El gen Ity es un gen particular, dominante, autosómico, no relacionado con el haplotipo, y los alelos que confieren resistencia o susceptibilidad se designan "r" o "s" respectivamente. Por otra parte se ha demostrado la existencia de un segundo gen autosómico que confiere susceptibilidad a *S. typhimurium* y es el locus *lps*, el cual se encuentra en el cromosoma cuatro y está involucrado en la respuesta al LPS (60).

La cepa de ratones C3H/HeJ, a diferencia de otras cepas, no responde a los efectos biológicos inducidos por este activador (LPS) (54). Esta respuesta anormal es debida a una mutación en el locus *Lps*. El alelo mutante de C3H/HeJ se ha llamado *Lps^d* y el alelo normal se denomina *Lpsⁿ*. La expresión de este gene se encuentra en linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y fibroblastos. Los macrófagos de la cepa C3H/HeJ, son incapaces de desarrollar una actividad tumoricida o bactericida cuando se tratan con una gran

variedad de agentes activadores entre ellos el LPS (60). Se ha demostrado que la inmunidad natural presentada por cepas murinas resistentes (diferentes de C3H/HeJ), se debe a la capacidad bactericida de los macrófagos Lpsⁿ. Por otra parte, en las etapas tardías de la infección murina, los anticuerpos juegan un papel relevante en el control del proceso infeccioso (79).

Recientemente se ha demostrado que la respuesta inmune celular y humoral contra las porinas y las PME varia acorde al haplotipo de la cepa murina en cuestión; el haplotipo mejor respondedor es el H-2^k y los menos respondedores a ambos antígenos son los H-2^d y H-2^b (55).

B.1.- MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA *Salmonella typhimurium*.

La salmonelosis murina igual que en el hombre se transmite por la ingestión de alimentos o agua contaminados con heces de animales infectados o portadores; después de que la infección tiene lugar por vía oral, la bacteria coloniza el intestino delgado sin causar síntomas apreciables, posteriormente, estas bacterias entran al tejido submucoso atravesando el epitelio vellosos o a través de las células M de las placas de peyer; de aquí, se diseminan por vía linfática a todo el torrente circulatorio y sistema fagocítico mononuclear, donde las bacterias son fagocitadas por macrófagos de bazo e hígado (células de Kupffer). Estas células son el principal sitio de multiplicación de la salmonela en los siguientes días de la infección y su

multiplicación se lleva a cabo en forma intracelular protegiéndose de los anticuerpos y complemento.

La inmunidad celular es primordial en el control de la infección por microorganismos intracelulares incluyendo a *S. typhimurium* en ratones, y consiste de una intrincada red de interacciones celulares que inician con la captación del antígeno por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos degradan las fracciones antigénicas a péptidos y después por un proceso no bien definido expresan estos fragmentos inmunogénicos en su membrana junto con glicoproteínas de superficie codificadas por genes de clase II del sistema principal de histocompatibilidad; sólo entonces los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) reconocen el antígeno e inician una respuesta contra él. Después del reconocimiento antigénico los linfocitos T $CD4^+$ son activados y las clonas específicas contra los diferentes epítomos proliferan, como consecuencia, estas células secretan una serie de factores solubles de comunicación celular (linfocinas), entre los cuales se encuentra la interleucina 2 (IL-2) cuya función primordial es la de actuar como factor proliferativo de linfocitos T. Otra linfocina secretada por células T $CD4^+$ es el interferón gama; este factor proteico tiene varios efectos biológicos sobre algunos tipos celulares como: activación de macrófagos, efecto antiviral y activación de la expresión de diferentes genes, entre los cuales se encuentran los del sistema principal de histocompatibilidad.

Estudios sobre inmunidad humoral sugieren que ésta es insuficiente para el control de infecciones intracelulares. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra diversas fracciones antigénicas de *S. typhi* no correlacionan con el desarrollo de protección contra las recaídas o reinfecciones.

Por otra parte en un modelo murino de fiebre tifoidea Collins y Mackaness encontraron una estrecha relación entre el desarrollo de inmunidad e hipersensibilidad retardada (DTH) después de la inmunización con dosis subletales de *Salmonella* (2,15,17,42,46).

B.2.- Anticuerpos y complemento.

Cuando el organismo es invadido por agentes extraños, sabemos que se desarrolla una respuesta inmune humoral, en la que la producción de anticuerpos se activa teniendo cierta especificidad contra el antígeno invasor; además, a la formación de complejos antígeno-anticuerpo le secunda una serie de reacciones enzimáticas por un conjunto de proteínas a las que se les conoce como complemento.

El complemento puede activarse por dos vías, la vía clásica y la vía alterna o de la properdina. Existen 11 proteínas en la activación clásica del sistema del complemento que se designa con la letra C y un número C1, C2, C3...C9. En realidad la proteína C1 está integrada por un conjunto de subunidades conocidas como C1q, C1r y C1s que están unidas por enlaces no covalentes, pero el ión

Ca⁺⁺ es necesario para mantenerlas unidas (72).

B.3.- MACROFAGOS.

La fagocitosis es una función celular que se lleva a cabo por células especializadas, conocidas como células fagocíticas profesionales. Este grupo está formado esencialmente por células que se encuentran en la corriente sanguínea así como en algunos órganos, o bien son atraídas a los tejidos (18).

Las células fagocíticas profesionales se dividen en dos grandes grupos: a) las células fagocíticas polimorfonucleares: Neutrófilos, Eosinófilos y Basófilos. Estas tienen la capacidad de destruir parásitos extracelulares que en ocasiones causan infecciones agudas; sin embargo los polimorfonucleares tienen una vida media de menos de 10 horas, una vez que salen de médula ósea y entran al torrente circulatorio (8) y b) las células fagocíticas mononucleares, que tienen una vida media en circulación sanguínea larga y eliminan parásitos intracelulares (12). Se considera que la fagocitosis juega un papel importante en los fenómenos de resistencia inespecífica, además en ciertas enfermedades causadas por parásitos intracelulares el proceso fagocítico está íntimamente relacionado con la actividad de reconocimiento de los linfocitos T al parásito (46).

Ciertos parásitos evaden los mecanismos bactericidas del fagocito y se establecen dentro de él (58,65,71); este fenómeno se

presenta principalmente con los fagocitos mononucleares y algunos parásitos intracelulares, como *Mycobacterium lepra* (7,25,49,78), *Mycobacterium tuberculosis* (5), *Leshmania mexicana* (54,74), *Trypanosoma cruzi* (1), *Rickettsia tsutsugamusi* (10,11), y *Salmonella typhi* (63). Los parásitos intracelulares se han clasificado en: a) patógenos intracelulares obligados, ya que requieren vivir dentro de células y no en otro medio y b) parásitos intracelulares facultativos porque pueden vivir dentro o fuera de la célula blanco.

A principios de la década de los sesentas, sólo se conocían tres aspectos acerca de los fagocitos mononucleares: a) su actividad bactericida ; b) su susceptibilidad a ser infectados por algunos parásitos que ocasionaban enfermedades crónicas y, c) que probablemente eran los responsables de la degradación y digestión de los antígenos.

Mackness y colaboradores, relacionaron la actividad del linfocito T con la del sistema fagocítico mononuclear. Sus trabajos sugerían que el linfocito T se activaba al reconocer a los antígenos del parásito; de esta manera, la célula T secretaba factores que actuaban sobre los macrófagos activándolos y matando en forma inespecífica a otras bacterias o parásitos no relacionados (12,40,46).

Para activar un macrófago en "reposo" se requiere de dos

señales, una que sensibilice a la célula y otra que active completamente al macrófago (3,27). La señal sensibilizadora más usual es el interferon Γ , y entre las señales que activan al macrófago se encuentran: Lipopolisacárido (LPS), altas concentraciones de linfocinas, sobrenadantes de células tumorales, bacterias gram-positivas muertas por calor, y muramil dipéptido encapsulado en liposomas.

El lipopolisacárido induce dos tipos de respuesta en macrófagos: 1) Una respuesta rápida, tales como la secreción de metabolitos del ácido araquidónico, proteasas neutras e hidrolasas lisosomales en unas cuantas horas después del estímulo, 2) cambios de actividad, como por ejemplo la inducción de la actividad citotóxica hacia microbios o células tumorales, en un lapso de horas o hasta días después del estímulo.

Se ha observado que el interferón Γ induce RNAm para moléculas clase II de histocompatibilidad, y el lipopolisacárido induce la expresión del factor de necrosis tumoral. Sin embargo, el lipopolisacárido, suprime la expresión de RNAm para antígenos clase II de histocompatibilidad (27), inducido por interferón Γ de esta forma el lipopolisacárido también disminuye la capacidad de la célula de presentar antígeno (46).

Por otro lado, se encontró que la presencia del fagocito mononuclear era indispensable para que se efectuara tanto una

respuesta de tipo humoral como celular. Más tarde, se demostró que el linfocito T reconocía los antígenos parasitarios previamente transformados y asociados a antígenos de clase II del Sistema Principal de Histocompatibilidad (44) y que a su vez, el linfocito T cooperaba con linfocitos B, ocasionándose una respuesta de anticuerpos contra el antígeno manipulado. Se halló también que el fagocito mononuclear secretaba un factor proteico que inducía la maduración de linfocitos T, así como la aparición sobre la membrana de receptores para linfocinas que a su vez inducían la proliferación y diferenciación de linfocitos T. La importancia que estaba adquiriendo el fagocito mononuclear en la respuesta inmune hizo que muchos investigadores comenzaran a buscar la relación que existía entre el fagocito mononuclear y las otras células que formaban el sistema inmune (28,43,46,53).

Por otra parte, se sabía que las enfermedades ocasionadas por parásitos intracelulares presentaban las siguientes características: a) una baja respuesta de la inmunidad celular a los antígenos de los parásitos intracelulares, tanto *in vivo* como *in vitro* (6), b) una baja producción de IL-2 (29,34,53), c) una disminución en la secreción de citocinas activadoras de fagocitos mononucleares como el Interferón Γ , (9,35,40,42,57,89).

Ante estas observaciones, algunos autores comenzaron a proponer hipótesis a través de las cuales trataban de explicar la falta de respuesta a las infecciones por parásitos intracelulares;

entre éstas se encontraban las siguientes: a) el receptor de la clona T específica para el antígeno relevante, en la infección por parásitos intracelulares, no existía en las personas que adquirirían la enfermedad; sin embargo en la mayoría de estas infecciones había hipergamaglobulinemia (5), pero los anticuerpos no estaban dirigidos contra los antígenos relevantes, b) otros investigadores proponían que el defecto se hallaba a nivel de los mecanismos de inducción, ya sea por inhibición en la presentación del antígeno (1), ó bien en la secreción de monocinas; sin embargo se demostró que los mecanismos inductores no eran los afectados, c) también se pensó en la participación de factores supresores de la respuesta, ya sea secretados por un linfocito T supresor ó por macrófagos (53), sin embargo el linfocito T supresor y el papel de los macrófagos *in vivo* no está aclarado y d) la explicación más probable, es la que se refiere a que los antígenos del agente patógeno son los responsables de la inhibición de la proliferación de linfocitos T por lo que disminuyen los mecanismos bactericidas.

B.4.- LINFOCITOS T.

Se han descrito dos subpoblaciones de linfocitos T: los linfocitos T Cooperadores y los linfocitos T Citotóxicos. Los primeros tienen el fenotipo $CD4^+$, $CD8^-$, e intervienen en la secreción de linfoquinas y cooperación con el linfocito B; la segunda subpoblación tiene función de lisis tanto de células alogénicas como de infectadas por virus y su fenotipo es $CD4^-CD8^+$. La primera pregunta acerca de estas subpoblaciones de linfocitos

T, era sobre el papel que jugaban en los fenómenos de protección (30,51); algunos autores encontraron que la protección estaba dada por linfocitos T cooperadores (2,41,62), otros por linfocitos T citotóxicos (16,44), y un tercer grupo que no se trataba de ninguna de las dos subpoblaciones, ya que suponían que las células efectoras eran precursores de linfocitos T, los que al estar en contacto con el antígeno maduraban y daban la respuesta protectora, pues el fenotipo de las células era $CD4^+CD8^-$ (48).

Recientemente, se ha encontrado que la actividad funcional del linfocito T es en algunos casos, independiente del fenotipo; esto significa que se pueden tener subpoblaciones $CD4^+,CD8^-$ con actividad citotóxica similar a las $T CD4^+CD8^+$ (22,82). Por lo tanto para conocer la subpoblación de T involucrada en el fenómeno de protección no sólo basta determinar el fenotipo, si no que es necesario hacer otras pruebas de tipo funcional como lo son la liberación de linfocinas y la actividad lítica sobre células infectadas por el parásito.

Estudios realizados por diferentes grupos demuestran la importancia de la citotoxicidad dada por diferentes subpoblaciones de linfocitos T en tres sistemas de infecciones intracelulares. El primero utiliza como huésped el ratón y como parásitos a *Listeria monocytogenes* o *Mycobacterium bovis* BCG (16,17,44), el segundo emplea como huésped bovinos y el parásito es *Theilera parva* y, el tercer sistema es el humano y el parásito *Rickettsia prowaseki*

(10,11). En el segundo sistema se ha observado un efecto bacteriostático (16), y a este respecto, se ha propuesto que los linfocitos T citotóxicos lisan a las células infectadas con el parásito intracelular para que el patógeno sea liberado y pueda ser endocitado y destruido por fagocitos mononucleares, los cuales elevan su capacidad bactericida y metabólica al estar en contacto con IFN- γ (45,56), previamente producido por linfocitos T cooperadores. Sin embargo, podría suceder que el parásito fuera endocitado por fagocitos mononucleares no activados, y de esta manera el parásito seguiría reproduciéndose.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar los mecanismos celulares que intervienen en la respuesta inmune en diferentes cepas de ratones singénicos cuando se infectan con *Salmonella typhimurium*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Estandarizar el método para infectar macrófagos murinos *in vivo*.
- b) Correlacionar la infección por *S.typhimurium* a macrófagos murinos con el gene de susceptibilidad a la infección por *S.typhimurium* I_{ty} y los genes H-2.
- c) Investigar sobre la participación de linfocitos T en la resistencia a infección por *S. typhimurium*, usando modelos de transferencia adoptiva.

MATERIALES Y METODOS.

Cepa bacteriana. Se utilizó *Salmonella typhimurium* 1,4,5,12 en todos los experimentos de infección; esta cepa se obtuvo del Instituto Nacional de Higiene, GGBR de la Secretaría de Salud.

Ratones. Se emplearon ratones endogámicos de las siguientes cepas: BALB/cJ (H-2^d, Ity^s, LPSⁿ), C57BL/6J (H-2^b, Ity^s, LPSⁿ), C3HeB/FeJ (H-2^k, Ity^r, LPSⁿ), obtenidas de los laboratorios Jackson y mantenidas en el bioterio del Instituto Nacional de Higiene, GGBR, SS.

Cultivo de bacterias. Las bacterias empleadas para la infección de macrófagos, se crecieron durante 18 horas a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A suplementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias, en fase de crecimiento logarítmico, se cosecharon por centrifugación a 1650 x g durante 15 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes 0.01 M pH 7.4 .

Obtención de macrófagos peritoneales. Los ratones se mataron con cloroformo, se sangraron de corazón y posteriormente a cada ratón se le inyectó 5 ml de solución de Hanks' en peritoneo. Posteriormente se dió masaje en el sitio de inoculación. Se aspiró

la solución de Hanks' y las células se lavaron con 10 ml de la misma solución centrifugando a 1200 rpm, 3 minutos. Las células de exudado peritoneal se contaron y ajustaron a 2 millones de células en 0.5 ml (44).

Infección de macrófagos in vivo con *S. typhimurium*.

Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con 5×10^6 bacterias en 0.5 ml de PBS. Veinticuatro horas después se tomaron las células de exudado peritoneal como se hizo anteriormente, se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células en 0.5 ml de solución de Hanks'. Posteriormente se lavaron 3 veces centrifugando a 1200 rpm durante 5 min. con la misma solución de Hanks'; en el último lavado se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 0.4 ml de agua bidestilada estéril, se realizaron 4 diluciones seriadas 1:10 y se sembraron 50 μ l de las diluciones en placas de Agar BHI (infusión cerebro-corazón). Finalmente, se dejaron incubar las placas a 37°C por 12 horas y se contó el número de colonias por placa (44).

Determinación por inmunofluorescencia de la presencia de antígenos de *S. typhimurium* sobre la membrana de macrófagos infectados con *S. typhimurium*. Grupos de dos ratones de las siguientes cepas singénicas se utilizaron para este experimento: BALB/cJ, C57BL/6J, y C3HeB/FeJ. Cada ratón se inoculó con 5×10^6 *S. typhimurium* en 0.5 ml de PBS por vía intraperitoneal, 24 horas

después los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los macrófagos como se ha descrito previamente, las células de los animales de cada cepa se mezclaron y resuspendieron en 0.5 ml de DME-20 % SFB (DME-Suero Fetal Bovino), a continuación se colocaron 6×10^6 células del exudado peritoneal en cajas de Petri de 35x10 mm. (Falcon, Oxnard, California), en un volumen final de 1.5 ml de DME-20 % SFB suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Gentamicina (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.), y se incubaron de 2 a 3 horas a 37°C con 5% CO_2 y humedad, posteriormente las cajas se lavaron 5 veces con Hanks' y al final de los lavados se agregó DME-20%SFB se incubaron durante 48 horas adicionales en una estufa para cultivos celulares (NAPCO, Portland, Oregon). Después de la incubación anterior las células se lavaron 3 veces con Hanks' y luego del último lavado se adicionó 1.0 ml de PBS y 1.0 ml de Formaldehído al 2% en PBS, y se incubó a 37°C durante 5 minutos, pasado este tiempo las células se lavaron 5 veces con PBS y se les agregó 1.5 ml de solución de Hanks' con 10% de suero de ratón descomplementado y se incubaron a 37°C por 5 minutos, para después lavar 5 veces las células con PBS y se añadió 1.5 ml de suero de conejo anti-PME de *S. typhimurium* diluido 1:10 con PBS, y se incubó a 37°C por un período de 30 minutos. Luego las células de exudado peritoneal se lavaron 5 veces con PBS y se les adicionó un conjugado fluoresceinado anti-inmunoglobulinas de conejo diluido 1:90 con PBS y se incubó a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se lavaron las células de exudado peritoneal 5 veces con PBS; en el último lavado se eliminó todo el PBS, se añadió una gota de PBS-glicerol (50% v/v) y se colocó

encima un cubreobjetos el cual se selló con esmalte para uñas. La fluorescencia se observó en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, Alemania) con el objetivo de inmersión (100X) . Mientras las preparaciones no eran leídas se protegieron de la luz y se guardaron a 4°C. Se utilizaron los siguientes testigos: a) Macrófagos sin infectar, para determinar falsos positivos originados por el antisuero anti-PME, b) Para determinar si el conjugado fluoresceinado pudo ocasionar falsos positivos se eliminó el paso de agregar anti-PME y se añadió directamente el conjugado anti-inmunoglobulinas de conejo, se utilizaron tanto macrófagos infectados como macrófagos no infectados, y c) para determinar la especificidad del suero anti-PME, se agregó en vez de éste, suero de conejo anti-inmunoglobulinas de burro y se siguieron exactamente los mismos pasos descritos en el método anterior, se utilizaron macrófagos infectados con *S.typhimurium*.

Inmunización de animales y obtención de linfocitos T de bazo.

Se utilizaron dos grupos de ratones de las cepas C3HeB/FeJ, C57Bl/6J Y BALB/cJ , cada uno compuesto de seis animales, un grupo se inmunizó por vía intraperitoneal (i.p.), al día 0 y 7 con 0.5 ml de una suspensión de 10^6 bacterias por ml de *S.typhimurium* muerta por calor, y el segundo grupo de ratones no se inmunizan. Cinco días después de la última inmunización, de ambos grupos se obtuvieron las células del bazo y se les eliminaron eritrocitos con cloruro de amonio.

Purificación de linfocitos T. La purificación de los linfocitos se hizo modificando la técnica descrita originalmente por Julius, et al (33), en resumen: las células del bazo, exentas de eritrocitos, se resuspendieron en 1 ml de DME-SFB al 10%, y se agregaron a una columna de lana de nylon previamente equilibrada con el mismo medio. Se dejó salir el medio de la columna (por goteo) para que se depositaran las células. Posteriormente se agregó lentamente 1 ml de DME-SFB al 10% y se permitió que goteara la columna hasta que el medio llegó a la cama de ésta, se taponó la aguja de salida y se incubó la columna a 37°C, 5% CO₂ por 45 min. Luego se destapó la columna, y se esperó a que goteara lentamente sobre un tubo de centrifuga estéril de 50 ml se agregó más medio hasta que se recibieron en el tubo 25 ml de medio. Finalmente se centrifugó el tubo a 1200 rpm/10 min, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de DME-SFB al 10%, se determinó la viabilidad de los linfocitos T, que se emplearon para los ensayos que se describen posteriormente.

Eliminación de linfocitos T. Se utilizaron 10 ratones singénicos de la cepa C57Bl/6J los cuales se irradiaron con 450 rads con una bomba de cobalto, en el Hospital de la Mujer (SS México D.F.) Los ratones se colocaron en una caja de plástico exactamente debajo de la fuente de radiación de la bomba, después que se activó la fuente de cobalto los ratones permanecieron 5 minutos recibiendo la radiación.

Viabilidad de linfocitos T de ratones irradiados. Se tomaron 2×10^5 células T y se sembraron en placas de cultivo con RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, y se agregó 100 μ l de concanavalina-A (Con-A) a una concentración de 15 μ g/ml, se dejaron incubando a 37°C y 5 % de CO₂ por 54 horas, al término de este tiempo se agregó un μ Ci de Timidina tritiada en cada pozo; 18 horas después se cosecharon en un cosechador para células (mini mash II, Walkersville, Maryland), se dejaron secar y se colocaron en viales a los cuales se les agregó 3 ml de líquido de centelleo, posteriormente se leyeron en el contador de centelleo (Beckman LS 5801).

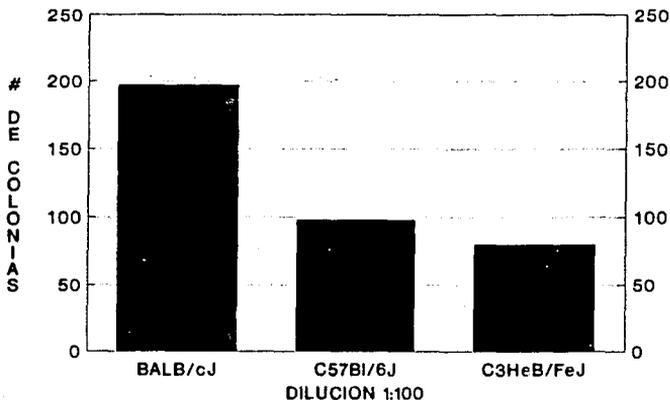
Transferencia celular adoptiva. Se utilizaron 2 grupos de ratones singénicos de las cepas C3HeB/FeJ, C57Bl/6J Y BALB/cJ, al primer grupo de ratones se le transfirieron i.v. 3×10^6 células T isogénicas inmunes y como control células no inmunes, al segundo grupo de ratones previamente irradiados (con radiación de cobalto) se le transfirieron i.v. 15×10^6 células T isogénicas inmunes y como control células no inmunes, en ambos casos las células T provenientes de bazo se inmunizaron con *S. typhimurium*, al día siguiente se inocularon i.p. con 0.5 ml de una suspensión bacteriana que tenía una concentración de 10^7 bacterias/ml de *S. typhimurium*. Posteriormente, se realizaron las lecturas del número de colonias bacterianas acorde al método de "infección in vivo de macrófagos" descrito anteriormente.

RESULTADOS

INFECCION DE MACROFAGOS *in vivo* CON *Salmonella typhimurium*.

De acuerdo al modelo de infección en macrófagos murinos el número de colonias aisladas varió en función de la cepa utilizada, así tenemos que la cepa que mejor controla la infección es C3HeB/FeJ H-2^k, Ity^r (figura 1).

FIGURA 1
INFECCION IN VIVO CON *S. typhimurium*



Se infectan ratones de 3 cepas singénicas y se evalúa la infección por conteo de UFC en macrófagos peritoneales.

La tabla A nos muestra el número de colonias de las cepas de ratones singénicos utilizados en los experimentos de infección de macrófagos peritoneales en las diferentes diluciones utilizadas (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000), en estos podemos determinar que la cepa BALB/cJ es la que más se infecta, presentando diferencias significativas con las cepas restantes en cuanto a la cantidad de colonias bacterianas. Sin embargo, las diferencias entre las cepas C57Bl/6J Y C3HeB/FeJ no es significativa.

TABLA A.- Infección con *Salmonella typhimurium* en macrófagos de diferentes cepas murinas singénicas.*

DIL	C ₃ HeB/FeJ		C57Bl/6J		BALB/cJ	
	Infectados	S/Infectar	Infectados	S/Infectar	Infectados	S/Infectar
1:10	423	0	442	0	560	0
1:100	60	0	98	0	197	0
1:1000	14	0	16	0	92	0
1:10000	3	0	1	0	5	0

* Ratones singénicos se infectan con 10⁷ bacterias intraperitonealmente, a las 24 h se obtienen macrófagos peritoneales, se lisan y se evalúa la infección por conteo de UFC en 4 diluciones.

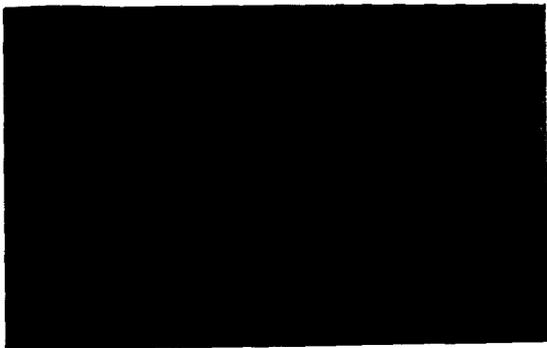
INMUNOFLUORESCENCIA. La fotografía 1 muestra macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* que tiene en su superficie antígenos bacterianos asociados que son reconocidos por anticuerpos anti-PME de conejo.

En la fotografía 2 podemos observar macrófagos sin infectar que no tienen antígenos bacterianos asociados y por lo tanto los anticuerpos anti-PME no los reconocen.

FOTOGRAFIA NUMERO 1

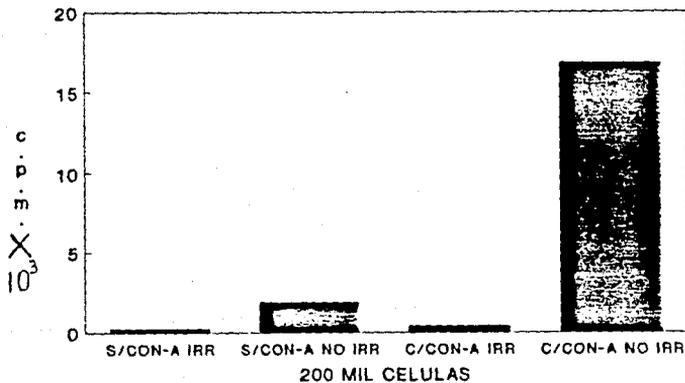


FOTOGRAFIA NUMERO 2



ELIMINACION DE LINFOCITOS T. En la gráfica de la figura 2 podemos apreciar la activación de células T (200 mil), de ratones irradiados y normales, con Con-A, podemos ver que existe mayor número de cuentas por minuto (cpm) en las células provenientes de ratones normales y por el contrario un menor número en las células provenientes de ratones irradiados, además, se incluyeron células sin Con-A de ambos grupos de ratones y se puede ver que el número de cuentas por minuto es menor que en los casos anteriores.

FIGURA 2
 ACTIVACION DE CELULAS T DE BAZO DE RATONES C57BI/6J POR CONCANAVALINA-A



DE RATONES C57BI/6J SE OBTIENEN CELULAS T SE COLOCAN 200 MIL POR POZO, SE AGREGA HT³Y SE MIDE SU INCORPORACION (c.p.m.).

Tabla B en esta observamos el número de cuentas por minuto para 200 mil células no activadas y activadas con Con-A provenientes de ratones C57Bl/6J irradiados y normales, también podemos ver que los índices de estimulación mantienen una diferencia notable y por lo tanto el coeficiente de estimulación también es relativamente grande.

TABLA B.- Activación de linfocitos T de ratones C57Bl/6J por concanavalina-A.*

	ESTIMULO	RATONES IRRADIADOS	I.E.	RATONES NO IRRADIADOS	I.E.	C.E.
200 MIL CELS	NINGUNO	226		1855		
	CONCAVALINA-A	383	1.6	16795	9.0	5.3

* Se obtienen células T de bazo provenientes de ratones C57Bl/6J y se activan con concanavalina-A, a las 54 h se -- agrega H³-al medio, se cosechan las células y se mide incorporación de H³-(c.p.m.) en un contador de centelleo.

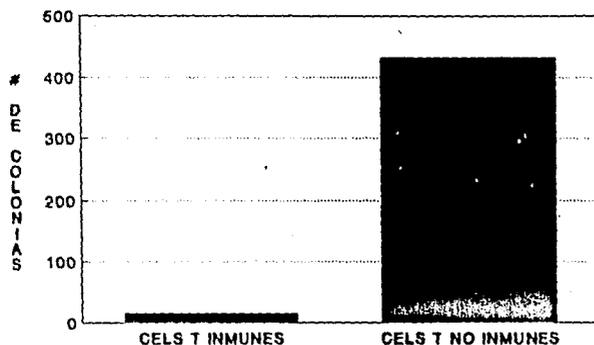
TRANSFERENCIA DE T INMUNES Y NO INMUNES EN RATONES NO DEPLETADOS DE CELULAS T. La figura 3 nos muestra las diferencias en el crecimiento del número de colonias bacterianas en macrófagos de ratone singénicos C3HeB/FeJ a los cuales se les transfirió 3×10^6 células T inmunes y 3×10^6 células T no inmunes; observándose claramente que el número de colonias es mucho mayor cuando se inocularon células T no inmunes, y cuando la inoculación se hizo con células inumunes el número de colonias disminuyó notablemente.

Se transfirieron 3×10^6 células inmunes y 3×10^6 células no inmunes a ratones singénicos de la cepa C57Bl/6J; cuando la transferencia se hizo con células no inmunes el número de colonias bacterianas después de la infección es mucho mayor comparativamente con el número de colonias para el caso de la transferencia con células inmunes (figura 4).

En la figura 5 se puede observar el número de colonias después de la infección en ratones BALB/cJ a los cuales se transfirió 3×10^6 células inmunes y la misma cantidad de células pero no inmunes, aunque la diferencia en la cantidad de colonias bacterianas existe, ésta no es tan notable como en los ratones C3HeB/FeJ Y C57Bl/6J (figuras 3 y 4 respectivamente).

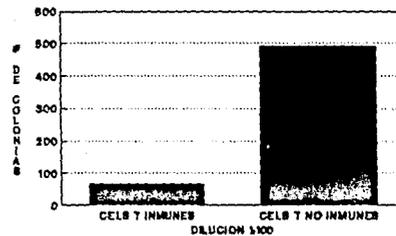
En la tabla C, en los experimentos de transferencia adoptiva celular podemos ver el número de colonias correspondiente a ratones de las cepas C3HeB/FeJ, C57Bl/6J y BALB/cJ después de la

FIGURA 3
TRANSFERENCIA CELULAR ADOPTIVA EN RA-
TONES C3HeB/FeJ



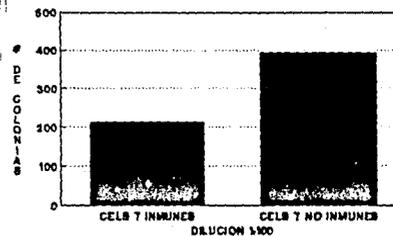
Se transfieren células T inmunes y no inmunes, se retan con 10^6 bacterias se evalúa la infección en macrófagos por UFC.

FIGURA 4
TRANSFERENCIA CELULAR ADOPTIVA EN RA-
TONES C57Bl/6J



RATONES C57Bl/6J SE TRANSFIEREN CON CELULAS T INMUNES Y NO INMUNES, SE RETAN CON 10^6 BAC Y SE MIDE LA INFECCION POR UFC.

FIGURA 5
TRANSFERENCIA CELULAR ADOPTIVA EN RA-
TONES BALB/cJ



SE TRANSFIEREN CELULAS T INMUNES Y NO INMUNES EN RATONES BALB/cJ, SE RETAN CON 10^6 BAC Y SE EVALUA LA INFECCION POR UFC.

infección con *Salmonella typhimurium*, cuando se transfirieron con células inmunes, no inmunes, cuando no se transfirieron células y cuando no se infectaron, además para cada dilución utilizada 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 se calculó un porcentaje en el cual difieren los grados de infección.

TABLA C .- Transferencia celular adoptiva en ratones de 3 cepas singénicas.*

		C ₃ HeB/FeJ	C57Bl/6J	BALB/cJ
D O N A D O R	INMUNES	14	64	213
	NO INMUNES	431	491	392
	SIN INFECTAR	0	0	0
SIN DONAR	INFECTADOS	00	90	197
DIFERENCIA %		02.5	34.6	0

* Se transfieren 3×10^6 células T inmunes y no inmunes, posteriormente se retan con 10^7 bacterias, se obtienen macrófagos peritoneales y se cuenta el número de UFC en la dilución 1:100.

TRANSFERENCIA DE CELULAS T INMUNES EN RATONES DEPLETADOS DE CELULAS T.

Tabla D observamos el número de colonias en 4 diluciones seriadas 1:10 después de transferir células T inmunes y no inmunes a ratones C57Bl/6J irradiados y no irradiados, los resultados de este experimento nos muestran, en la dilución 1:100, para ratones irradiados: con células no inmunes menor número de colonias comparativamente con los inmunes; para ratones no irradiados: en el caso de células no inmunes es mayor el número de colonias que los inmunes se, puede ver gráficamente en la figura número 6.

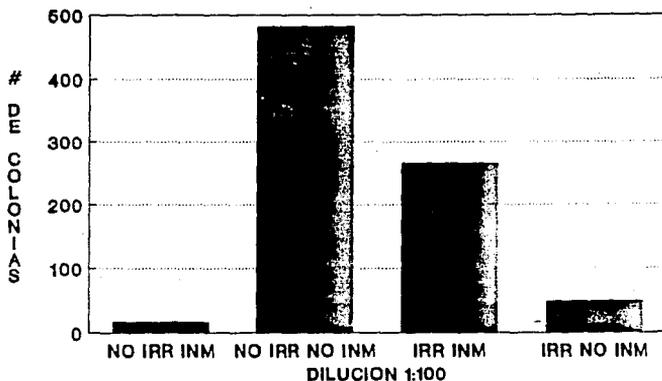
TABLA D.- Transferencia celular adoptiva e infección con *Salmonella typhimurium* a ratones C57Bl/6J irradiados.*

DIL	CELS	IRRADIADOS		NO IRRADIADOS	
		NO INMUNES	INMUNES	NO INMUNES	INMUNES
1:10		372	INCONTABLE	1000	251
1:100		48	265	483	16
1:1000		7	39	93	2
1:10000		8	8	13	8

* Se transfieren 12×10^6 células T inmunes y no inmunes a ratones singénicos irradiados C57Bl/6J, posteriormente se retan intraperitonealmente con 10^8 bacterias, se obtienen macrófagos peritoneales y se cuenta el número de UFC en cada dilución.

En el eje de las ordenadas tenemos el número de colonias y en el eje de las abscisas la dilución 1:100 de la cual se tomaron los datos del número de colonias bacterianas para ratones de la cepa C57Bl/6J irradiados y no irradiados, a los cuales se transfirieron células T inmunes y no inmunes, se puede observar que con la transferencia de células T inmunes en ratones no irradiados disminuyó el número de colonias en relación con la transferencia de células T a ratones no irradiados, sin embargo, cuando la transferencia de células T se realizó en ratones irradiados los resultados en cuanto al número de colonias, fueron contrarios al caso anterior, es decir, que con la transferencia de células T inmunes hubo mayor crecimiento bacteriano y con la transferencia de células T no inmunes el crecimiento fue menor.

FIGURA 7
TRANSFERENCIA CELULAR ADOPTIVA EN RATO-
NES C57BI/6J IRRADIADOS.



RATONES C57BI/6J IRRADIADOS CON 450 RADS
E INOCULADOS CON CELULAS T INMUNES Y NO
INMUNES SE RETAN CON 10⁸ BAC, SE MIDE UFC

DISCUSION.

Hasta el momento se ha tenido dificultad para dilucidar los mecanismos inmunológicos que se presentan durante una infección con *Salmonella typhi*, debido a que la bacteria es exclusiva del hombre. Para resolver este problema ha sido necesario usar un modelo de infección que se le parezca, éste es el modelo murino.

La infección en el ratón por *Salmonella typhimurium* es muy semejante a la que se presenta en la fiebre tifoidea.

En este trabajo se muestran las interacciones de diferentes tipos celulares que intervienen durante la infección con *Salmonella typhimurium* en el ratón y la correlación que existe con los complejos H-2 y no H-2 (Ity).

Trabajos previos han demostrado que en cepas singénicas la respuesta a porinas está controlada por el complejo H-2 y que los más respondedores son aquellos que presentan el haplotipo H-2^k, Ity^f, los que presentaron una respuesta intermedia tienen el haplotipo H-2^b, Ity^s y los menos respondedores fueron H-2^d, Ity^s (48).

Así mismo se ha encontrado que el control de la infección con *Salmonella typhimurium* en cepas singénicas es mejor en ratones que presentan el haplotipo H-2^k, Ity^f y Lpsⁿ, un control intermedio en el haplotipo H-2^b, y el H-2^d es el menos eficiente. Tomando en

consideración lo anterior podemos sugerir que el control de la infección no sólo está en función del alelo *Ity* sino también del complejo H-2.

Los resultados en los que se utilizó bacteria total, en la infección, correlacionan en buena medida con los resultados en los que se cuantificó la respuesta inmune humoral y celular a porinas (48).

Por otra parte la inmunofluorescencia indirecta sugiere la posibilidad de que en el proceso de infección por la bacteria, el macrófago digiere una parte de la misma y expresa sus proteínas en la superficie. Para verificar ésto se necesitan experimentos específicos relacionados con el procesamiento del antígeno.

En este modelo podemos observar además que las interacciones celulares durante la infección por *Salmonella typhimurium* se llevan a cabo entre los macrófagos propios de las diferentes cepas de ratones infectados y otras células inmunes que han sido transferidas de ratones singénicos; encontrándose igualmente que los ratones con haplotipo H-2^k controlan con mayor eficiencia la infección a los macrófagos.

La cepa C3HeB/FeJ tiene este haplotipo, en el cual como puede observarse en la tabla C, presenta una disminución del 82.5 % de bacterias que están infectando al macrófago con respecto a los

ratones testigo no inmunes.

La cepa murina C3HeB/FeJ es también la que mejor controla la infección a través de la transferencia celular adoptiva y es la misma donde existe menor número de cuentas bacterianas en ausencia de transferencia de células T inmunes. Lo anterior puede explicarse al menos por dos mecanismos no excluyentes: 1) los macrófagos son infectados con las bacterias en menor grado que los de las otras cepas murinas y 2) que por la interacción de células T inmunes a proteínas de membrana externa, de otras bacterias gram-negativas, que cruzan con las de *Salmonella typhimurium* activan los macrófagos para controlar la infección.

Como experimento colateral se transfirieron células T inmunes a ratones irradiados; por los resultados obtenidos podemos sugerir que la radiación no solamente eliminó células T, sino que también interfirió en las funciones fagocíticas de los macrófagos. En este caso al transferir células T inmunes en los ratones irradiados se restableció cierta actividad celular, pero cuando se transfirieron a los ratones irradiados células T no inmunes la capacidad fagocítica del macrófago no se recuperó del todo, lo que explicaría la menor cantidad de bacteria intracelular.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Araujo, F. G. 1985. *Trypanosoma cruzi*: expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. J. Immunol. 135: 4149-4154.
- 2.-Attridge, S. R., y Kotlarski, I. 1985. Local transfer Delayed-Type Hypersensitivity after Salmonella infection in mice. Infect. Immun. 50: 807-812.
- 3.-Beller, I.D., Kiely, JM. y Unanue, R.E. 1980. Regulation of macrophage populations. J. Immunol. 124: 1426-1432.
- 4.-Benjamin, W.H.JR.; Turnbough, C.L.; Posey, B.S. and Brilles, D.E. 1986. "Salmonella typhimurium virulence genes necessary to exploit the Ity^{S/S} genotype of the mouse." Infection and Immunity. Vol:51 No.3 p.872-878.
- 5.-Bhatnagar, R., Malaviya, A. N., Narayanan, S., Rajagopaladan, P., Kumar, R. y Bharadwaj, O. P. 1977. Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 115: 207-212.
- 6.-Bloom, B. R. 1986. Presidential address. Learning from leprosy: a perspective on immunology and the Third World. J. Immunol. 137: i-x.
- 7.-Braun, V. 1975. "Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*". Biochem. Biophys. Acta. 415:335-377.
- 8.-Boggs, D. R. 1967. The kinetics of neutrophil leukocytes in health and in disease. Sem. Hemat. 4, 359-386.
- 9.-Buchmeier, N. y Schreiber, R. D. 1985. Requirement of endogenous Interferon- Γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7404-7408.
- 10.-Carl, M. y Dasch, G. A. 1986. Characterization of human cytotoxic lymphocytes directed against cells infected with Typhus group Rickettsiae: evidence for lymphokine activation of effectors. J. Immunol. 136, 2654-2661.
- 11.-Carl, M., Robbins, F., Hartzman, R. J. y Dasch, G. A. 1987. Lysis of cells infected with Typhus group Rickettsiae by human cytotoxic T cell clone. J. Immunol. 139, 4203-4207.
- 12.-Cohn, Z. A. y Benson, B. 1965. The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry. J. exp. Med. 121, 153-169.
- 13.-Colwell, D., Michalek, S., Briles, D. E., Jirillo, E. y McGhee, J.R. 1984. Monoclonal antibodies to Salmonella lipopolysaccharide: anti-O-polysaccharide antibodies protect C3H mice against challenge with virulent Salmonella typhimurium. J. Immunol. 133, 950-957.
- 14.-Cvjetanovic, B. and Vemun, K. 1965. The present status of field an laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. Bull WHO. 32:29-36.
- 15.-David, J.R. y David, R.N. 1972. Cellular hypersensitivity and immunity. Prog. Allergy. 16: 300.
- 16.-De Libero, G., Flesch, I. y Kaufmann, S. H. E. 1988. Mycobacteria-reactive Lyt-2⁺ T cell lines. Eur. J. Immunol. 18, 59-66.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 17.-De Libero, G. y Kaufmann, S. H. E.1986. Antigen-specific Lyt-2⁺ cytolytic T lymphocytes from mice infected with the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. J. Immuno. 137, 2688-2694.
- 18.-Densen, P. y Mandell, G. L..1980. Phagocyte strategy vs. microbial tactics. Rev. Inf. Dis. 2, 817-838.
- 19.-Di Rienzo, I., Nakamura, K. and Inouye, Y. 1978. The outer membrane protein of gram-negative bacteria: Biosintesis assembly and funtions. Anna. Rev. Biochem. 47: 481-532.
- 20.-Eisenstein, T. K., Killar, L. M., Stocker, B. A. D., y sultzer, B.M.. 1984. Cellular Immunity induced by avirulent *Salmonella* in Lps-defective C3H/HeJ mice. J. Immunol. 133, 958-961.
- 21.-Finlay B., Heffron, F. y Falkow, S.,1988. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacte-adherence and invasion. Science. 243, 940-943.
- 22.-Flomenberg, N., Duffy, E., Naito, K. y Dupont, B..1983. Allogeneic T cell clones. Both Leu2⁺,3⁺, and Leu2⁻,3⁺ T cells recognize class I histocompatibility antigens. Eur. J. Immunol.11, 905.
- 23.-Germanier, R. and Furer, E.1975. Isolation and characterization of *Salmonella typhi* gal E mutant Ty 21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. J. Infec. Dis. 141:553-558.
- 24.-Germanier, R. 1984. Typhoid fever. in Bacterial vaccines.Germanier, R. (Ed) Academic Press. pp. 137-165.
- 25.-Gaylord, H., y Brennan, P. J..1987. Leprosy and the leprosy bacillus: Recent developments in characterization of antigens and Immunology of disease. Ann. Rev. Microbiol. 41, 645-675 .
- 26.-Gonzalez, B.CR., Respuesta proliferativa in vitro inducida por porinas de *Salmonella* en un modelo murino. Tesis UNAM. Fac. Medicina. 1991.
- 27.-Hamilton, T. A. y Adams; D. O.. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. Immunol. Today 8, 151-158.
- 28.-Handa, T., Matsuyama, M., Watanabe, Y., Koga, T., y Nomoto, K..1987. A significant role of the macrophage accumulation induced by MCF in the protection of mice against *Listeria monocytogenes* in Vivo .Cell. Immunol. 106, 330-342 .
- 29.-Haregewoin, A., Godal, T., Mustafa, A. S., Belehu, A., y Yemaneberhan, T..1983. T-cell conditioned media reverse T-cell unresponsiveness in lepromatous leprosy..Nature 303, 342-344 .
- 30.-Hauser, W. E., y Tsai, V.. 1986. Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in Vitro. J. Immunol. 1, 313-319 .
- 31.- Hejfec, L.B. et al. 1966. A Controlled field trial and laboratory study of live typhoid vaccines in the USSR.Bull WHO 30:321-339.
- 32.- Hernández, C.MA. Respuesta in vitro por linfocitos de ratones inmunizados con *Salmonella typhimurium*. Tesis UNAM. FES Cuautitlan.1990.
- 33.- Hernández, V.RM. Proteínas de la membrana externa de las

bacterias gram negativas. Tesis IPN. E.N.C.B. 1981.

34.-Hoffenbach, A., Lagrange, P. H., y Bach, M. A..1985. Strain variation of lymphokine production and specific antibody secretion in mice infected with *Mycobacterium lepraemurium*. Cell. Immunol. 91, 1-11 .

35.-Horwitz, M. A., Levis, W. R., y Cohn, Z. A..1984. Defective production of monocyte-activating cytokines in lepromatous leprosy. J. Exp. Med. 159, 666-678 .

36.-HSU., H.S. 1989. Pathogenesis and immunity in murine Salmonellosis. Micr. Rev. 53: 390-406.

37.-Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., González, C., Moreno, J., y Kumate, J..1988. Protection against Salmonella typhi infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, d, Vi. Inf. Immun. 56, 2953-2959 .

38.- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Téllez-Girón, J., Paniagua, J. y Kumate, J. 1988. Papel de las proteínas de membrana externa de *Salmonella typhi* en la inducción de protección contra fiebre tifoidea en un modelo murino. Gaceta Médica de Mexico 124, 92-97.

39.-Julius, M. H., Simpson, E. y Herzenberg, L. A..1973. A rapid method for the isolation of functional Thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. 3, 645.

40.-Kaplan, G., Weinstein, D. E., Steinman, R. M., Levis, W. R., Elvers, U., Patarroyo, M., y Cohn, Z. A..1985. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. J. Exp. Med. 162, 917-929 .

41.-Kaufmann, S. H. E., Simon, M. M., Hahn, H.. 1979. Specific Lyt 123 T cells are involved in protection against *Listeria monocytogenes* and in Delayed-Type Hypersensitivity to Listerial antigens. J. Exp. Med. 150, 1033-1038 .

42.-Kaufmann, S. H. E., Hahn, H., Berger, R., y Kirchner, H..1983. Interferon- γ production by *Listeria monocytogenes* specific T cells active in cellular antibacterial immunity. Eur. J. Immunol. 13, 265-268 .

43.-Kaufmann, S. H. E., y Brinkmann, V..1984. Attempts to characterize the T-cell population involved in the activation of macrophage oxygen metabolism in Murine Listeriosis. Cell. Immunol. 88, 545-550 .

44.-Kaufmann, S. H. E., Hug, E., Vath, U., y De Libero, G..1987. Specific lysis of *Listeria monocytogenes* infected macrophages by class II-restricted L3T4+ T cells. Eur. J. Immunol. 17, 237-242 .

45.-Kaufmann, S. H. E..1989. In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. Rev. Inf. Dis. 2, 448-454 .

46.-Krahenbuhl, J. L. y Remington, J. S..1971. In Vitro induction of non-specific resistance in macrophages by specifically sensitized lymphocytes. Inf. Immun. 4, 337-343.

47.-Kumate, J.1980. "Tifoidea". En Kumate, J. y Gutierrez G. Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México.

- 48.-Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H. y Makela, P. H..1981. Immunization with Major Outer Membrane Protein (Porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Inf. Immun.* 34, 328-332.
- 49.-Longley, J., Haregewoin, A., Yemaneberhan, T., van Diepen, T., Nsibami, T. W., Knowles, J., Smith, K. A., y Godal, T. 1985. *In Vivo* responses to *Mycobacterium leprae*: antigen presentation, Interleukin-2 production, and Immune cell phenotypes in naturally occurring leprosy lesions. *Int. J. Lepr.* 53, 385-394 .
- 50.-Makela, P. H., Hovi, M., Saxen, H., Valtonen, N. y Valtonen, V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. *Immunol. letters* 19, 217-222.
- 51.-Marchal, G., y Milon, G..1986. Control of hemopoiesis in mice by sensitized L3T4+ Lyt2-lymphocytes during infection with bacillus Calmete-Guerin. *J. Immunol.* 83, 3977-3981 .
- 52.-Mayrhofer, G., Holt, P. G. y Papadimitriou, G. M..1986. Functional characteristics of the Veiled cells in afferent lymph from the rat intestine. *Immunology* 58, 379-387.
- 53.-McKanness, G.B. 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells and macrophage activity *in vivo*. *J. Exp. Med.* 129: 973.
- 54.-Mc Elrath, M. J., Kaplan, G., Nusrat, A., y Cohn, Z. A..1987. Cutaneous leishmaniasis. The defect in the T cell influx in BALB/c mice. *J. Exp. Med.* 165, 546-559 .
- 55.-Mejia, M.M.V. Susceptibilidad de cepas singénicas murinas a porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Tesis UNAM. Fac. Medicina. 1990.
- 56.- Murray, H. W., Spitalny, G. L., y Nathan, C. F..1985. Activation of mouse peritoneal macrophages *In Vitro* and *In Vivo* by Interferon- Γ . *J. Immunol.* 134, 1619-1622 .
- 57.-Murray, H. W., Stern, J. J., Welte, K., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., y Nathan, C. F..1987. Experimental visceral leishmaniasis: production of Interleukin-2 and Interferon- Γ tissue immune reaction, and response to treatment with Interleukin-2 and Interferon- Γ . 138, 2290-2297 .
- 58.-Neill, M. y Klebanoff, S..1988. The effect of Phenolic Glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. Exp. Med.* 167, 30-42.
- 59.-Nikaido, H..1983. Proteins large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes : porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzimol.* 97, 85-100.
- 60.-O'Brien, A., Rosenstreich, D. L., Scher, I., Campbell, G.H., MacDermott, R. y Formal, S..1980. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the Lps gene. *J. Immunol.* 124, 20-24.
- 61.-Ofek, I. y Sharon, N., 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugar and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Inf. Immun.* 56, 539-547.
- 62.-Orme, I. M., y Collins, F. M..1984. Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis* infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and

those that transfer Delayed-Type Hypersensitivity to tuberculin. Cell. Immunol. 84, 113-120.

63.- Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia Ortigoza, E., y Kumate, E. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27,1640-54.

64.-Osborn, M. J. and Wu, H.C.1980. "Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria". Annu. Rev. Microbiol. 34:369-422.

65.-Pabst, M., Gross, J., Brozna, J. y Goren, M..1988. Inhibition of macrophage priming by Sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 140, 634-640.

66.-Paniagua, S. JF. Aislamiento y caracterización de porinas de *Salmonella typhi* capaces de inducir inmunidad protectora en un modelo murino. Tesis UNAM.Fac. Medicina. 1990.

67.-Parish, C. L. y Müllbacher, A..1983. Automated colorimetric assay T cell cytotoxicity. J. Immunol. Methods. 58, 225-237.

68.- Pollack, C., Straley, S. C., y Klempner, M. S..1986. Probing the phagolysosomal environment of human macrophages with a Ca²⁺-responsive operon fusion in *Yersinia pestis*. Nature 322, 834-836 .

69.-Polish Typhoid Committee. 1965. Evaluation of the typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. Bull WHO 32:15-27.

70.-Reitman, M. 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa* J. Infect. Dis. 117:101-107.

71.-Rajagopalan, P., Dournon, E., Vildé, J. L. y Pocardalo, J.J..1987. Direct activation of human monocyte-derived macrophages by a bacterial glycoprotein extract inhibits the intracellular multiplication of virulent *Legionella pneumophila* serogroup 1. Inf. Immun. 55, 2234-2239.

72.-Rcitt, I.M..1989. Immunology. Ed the C.U. Mosby company. 13.1-13.6.

73.-Romano, M., De Magistris, M. T., Villa, L., Nuti, S., De Leo, V., Boraschi, D., Nencioni, L., y Tagliague, A..1989. Natural antibacterial activity against *Salmonella typhi* in human cord blood. J. Immunol. 142, 2513-2518 .

74.-Russell, D. y Talamas-Rohana, P..1989. *Leishmania* and the macrophage: and marriage of inconvenience. Immunol. Today 10, 328-333.

75.- Saito, H., Tomuoka, H., Sato K. y Watanabe, T. 1986. Abilities of human Oligodendroglial cells and mouse Schwann cells to phagocytose *Mycobacterium leprae* and other *Mycobacteria*. Infect. Immun. 51, 157-162.

76.- Schafer, R., Nacy, C. y Eisenstein, T. K..1988. Induction of activated macrophages in C3H/HeJ mice by avirulent *Salmonella*. J. Immunol. 140, 1638-1644.

77.- Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of

Escherichia coli by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriology. 104:882-887.

78.-Simpson, E. y Chandler, P..1986. Analysis of cytotoxic T cell responses. En Cellular Immunology-2. Editado por Weir, M. p. 68.5-68.6. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

79.-Small, P. M. C., Isberg, R. R., y Falkow, S..1987. Comparison of the ability of Enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEP-2 cells. Infect. Immun. 55, 1674-1679.

80.-Spits, H., Yssel, H., Terhorst, C. y de Vries, J. E..1982. Establishment of human T lymphocyte clones highly cytotoxic for an EBV transformed B cell line in serum-free medium: isolation of clones that differ in phenotype and specificity. J. Immunol. 128, 95.

81.-Svenson, S. B., Nurminen, M. y Lindberg, A. A..1979. Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 25, 863-872.

82.-Swain, S. L., Dennert, G., Worsley, S. y Dutton, R. W..1981. The Lyt phenotype of a long-term allospecific T cell line. Both helper and killer activities to IA are mediated by Ly-1 cells. Eur. J. Immunol. 11, 1981.

83.-Typhoid Panel, U.K. Department of technical cooperation.1964. A controlled field trial of acetone-died and inactivated and heat-phenol inactivated typhoid vaccines in British Guiana. Bull WHO 30:631-634.

84.-Turcotte, R., y Legault, D..1986. Mechanisms underlying the depressed production of Interleukin-2 in Spleen and Lymph Node cell cultures of mice infected with *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 51, 826-831.

85.-Udhayacumar, V. y Muthukkaruppan, V. R..1987. Protective immunity induced by Outer Membrane Proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. 55, 816-821.

86.-Wirth, J. J., Kierszenbaum, F., Sonnenfeld, G., y Zlotnik, A. 1985. Enhancing effects of Gamma Interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 49, 61-66.

87.-Wood, P. R., Spanidis, Frangos, K., y Cheers, C..1986. The *in Vitro* bactericidal activity of peritoneal and spleen cells from *Listeria*-resistant and -susceptible mouse strains. Cell. Immunol. 99, 160-169.

88.-Yugoslav Typhoid Commission. 1964. A Controlled field trial of the effectiveness of acetone-died and inactivated and heat-phenol inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. Bull WHO 30:623-630.

89.-Ziegler, K. y Unanue, R.E.,1981. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. J. Immunol. 127, 1869-1875.

90.-Zinkernagel, R. M., Althage, B., Alder, L., Blanden, W. Davidson, U., Kees, M., Lunlop, C. y Shreffler, C.. 1977. H-2

restriction of cell-mediated immunity to and intracellular bacterium. Effector T cells are specific for *Listeria* antigen in association with H-2 I region-coded self-markers. J. Exp. Med. 145.1353.