

Nº 143
2EL



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR
PROTECTORA INDUCIDA POR
PORINAS DE S. typhi.**



SECRETARÍA DE PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ELISA ROMO DE VIVAR VILLASANA

México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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

Capítulo	page
I. Resumen	9
II. Introducción	10
III. Objetivos	12
IV. Generalidades	13
1. Bacterias intracelulares y extracelulares	13
2. <i>Salmonella typhi</i>	14
3. Proteínas de membrana externa	16
4. Mecanismos inespecíficos de defensa contra la infección	20
5. Factores de virulencia	23
6. Respuesta inmune	27
V. Material y Métodos	39
1. Cepa bacteriana	39
2. Animales de experimentación	39
3. Obtención de antígeno	39
4. Determinación de proteínas	41
5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	41
6. Inmunolectrotransferencia	42

7. Esquema de inmunización	42
8. Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal	43
9. Obtención de células de bazo	43
10. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	44
11. Ensayo de activación <i>in vitro</i> con mitógenos	44
12. Ensayo de activación antígeno específica con porinas	45
13. Prueba de susceptibilidad a antibióticos	45
14. Ajuste de bacteria	46
15. Estandarización de la relación de infección	46
16. Ensayo de infección <i>in vitro</i>	47
VI. Resultados	49
1. Obtención del antígeno	49
2. Electroforesis	49
3. Inmunoelectrotransferencia	49
4. Evaluación de la respuesta inmune a porinas	52
VII. Discusión	63
VIII. Conclusiones	68
IX. Bibliografía	69

ABREVIATURAS

ADCC	citotoxicidad mediada por anticuerpos.
BHI	infusión cerebro corazón.
CPA	célula presentadora de antígeno.
DL ₅₀	dosis letal al 50%.
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco.
EDTA	sal disódica de etilen diamino tetra acético.
ELISA	ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
ER	retículo endoplásmico.
HEPES	ácido N-2-hidoxietil -N'- 2 etano sulfónico.
³ HTDr	timidina tritiada.
IL	interleucina.
INF	interferón.
Ig	inmunoglobulina.
LPS	lipopolisacárido.
MAC	complejo de ataque a la membrana.
MI	muerte inducida.
MIC	concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.
MHC	complejo principal de histocompatibilidad.
NK	células asesinas naturales.
PBS	amortiguador salino de fosfatos.
PME	proteínas de membrana externa.
PWC	papel de nitrocelulosa.
SB	suero bovino.

SDS dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
SBF suero fetal bovino.
SSI solución salina isotónica.
Tc linfocito T citotóxico.
TCR receptor de antígeno del linocito T.
Th linfocito T cooperador.
TRIS hidroximetil amino metano.
UA Unidades de absorbencia.

I. RESUMEN.

Para evaluar la capacidad que tienen las porinas de inducir respuesta de linfocitos T, capaces de activar a los macrófagos, se utilizó un ensayo de infección *in vitro*. Con ésto se determinó la cantidad de bacteria internalizada por cuenta en placa.

La inmunización con porinas de *S. typhi*, indujo tanto respuesta de anticuerpos como respuesta de proliferación celular antígeno-específica. Además, fue capaz de inducir una respuesta de linfocitos T capaces de activar a los macrófagos, de tal manera, que eliminaron alrededor del 50% de la bacteria que podría infectarlos en condiciones normales.

Estos resultados, sugieren que la inmunización de ratones con porinas de *S. typhi*, induce la activación de linfocitos T cooperadores, de modo que éstos son capaces de producir los factores solubles (como interferón gamma) necesarios para activar los sistemas microbicidas de los macrófagos.

II. INTRODUCCION

Salmonella typhi es una bacteria intracelular que posee mecanismos de evasión que la permiten sobrevivir dentro de los fagocitos mononucleares y proliferar en su interior. Esto favorece que la bacteria crezca en un microambiente, protegida de la acción de anticuerpos, complemento y algunos antibióticos.

Los fagocitos mononucleares cumplen con dos papeles fundamentales en el curso de la enfermedad, uno de ellos, es servir de células hospederas, y el otro, actuar como células efectoras. Para que este último proceso se lleve a cabo, es indispensable la participación de linfocitos T específicos, capaces de proporcionar los factores solubles necesarios para activarlos (principalmente interleucinas 4 y 6 e interferón gamma) (26). Esto se ha evidenciado en estudios con ratones que indican que por medio de transferencia pasiva de linfocitos T específicos contra antígenos de *S. typhimurium*, es posible conferir resistencia contra el reto de la bacteria homóloga (59).

Por otra parte, Isibasi y col. empleando un modelo murino, han demostrado que tanto la inmunización con porinas de *Salmonella typhi*, como la administración de suero hiperinmune contra este antígeno, son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra la infección por la bacteria homóloga (22). Estos resultados implicaban a las porinas como inmunógenos protectores y sugerían la

activación de la respuesta inmune celular.

En base a estos antecedentes, se desarrolló un modelo de infección *in vitro*, con el fin de evaluar la capacidad que tienen las porinas de *Salmonella typhi* de inducir una respuesta de linfocitos T específicos, capaces de activar a los macrófagos, de tal manera, que estos pudieran eliminar a la bacteria fagocitada.

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad que tienen las porinas de *Salmonella typhi* para despertar una respuesta de linfocitos T, capaces de activar a los macrófagos para que eliminen a la bacteria que los infecta.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar el nivel de anticuerpos anti-porinas generados después de la inmunización con el antígeno.

b) Evaluar el papel de las porinas de inducir una respuesta proliferativa antígeno-específica *in vitro* de linfocitos murinos.

c) Determinar la cantidad de bacteria internalizada por macrófagos inmunes y testigo, en un modelo murino de infección *in vitro*.

IV. GENERALIDADES.

1. BACTERIAS INTRACELULARES Y EXTRACELULARES.

Las bacterias patógenas son aquellas que pueden penetrar las defensas naturales del hospedero y desarrollar un proceso patológico en el individuo. Estas bacterias se dividen en dos categorías: las que son capaces de sobrevivir en el interior de los fagocitos del hospedero (bacterias intracelulares), y las que son rápidamente destruidas por éstos (bacterias extracelulares).

Las bacterias extracelulares como *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*, se reproducen rápidamente causando un daño a los tejidos del hospedero, sin embargo, como estas bacterias son fácilmente eliminadas por fagocitos, producen generalmente enfermedades en forma aguda y relativamente breve.

Las bacterias intracelulares, a diferencia de las anteriores, pueden evadir los mecanismos de muerte intracelular de monocitos y neutrófilos, lo que facilita su permanencia en los tejidos y la cronicidad de las enfermedades que causan, como en el caso de la tuberculosis.

Las bacterias intracelulares se dividen en dos grupos, de acuerdo a su capacidad de sobrevivencia en diferentes tipos de células: a) especializadas, aquellas que pueden vivir en fagocitos no profesionales, pero no sobreviven dentro de los macrófagos; y b)

generalizadas, las que son capaces de crecer en macrófagos y algunas veces en neutrófilos y monocitos.

Un ejemplo típico de bacteria intracelular específica, es *Shigella*, esta bacteria posee mecanismos de virulencia que le permiten crecer unicamente en las células del epitelio intestinal. En cambio, *Salmonella typhi*, se clasifica dentro de las bacterias intracelulares generalizadas. Esta bacteria es el agente etiológico de la fiebre tifoidea, una enfermedad infecciosa, contraída por la ingestión de agua o alimentos contaminados con el agente causal. Las principales manifestaciones de esta enfermedad son: fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal (19).

2. *Salmonella typhi*.

Salmonella typhi es una bacteria gram negativa, móvil, no esporulada, perteneciente al género *Salmonellae* de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria, al igual que todos los miembros de su género, no es capaz de fermentar la lactosa ni la sacarosa (7).

2.1. Estructura antigénica.

De acuerdo a su composición antigénica, *Salmonella typhi* pertenece al grupo D de la clasificación de Kauffman-White: presenta los antígenos somáticos 9 y 12, el antígeno flagelar "d" y el antígeno capsular Vi.

El antígeno "O" o somático es un lipopolisacárido (LPS) cuya especificidad está dada por la composición de azúcares (50). El antígeno Vi es un homopolisacárido, que forma parte de la membrana externa y su presencia indica virulencia (10). El antígeno "H" o flagelar es, a diferencia de los anteriores, de composición proteica (50). Además de los mencionados, existen muchos otros productos potencialmente antigénicos (69) como son las proteínas de membrana externa entre las cuales se encuentran las porinas, la lipoproteína de Braun y otras proteínas con diversas funciones que han sido muy poco estudiadas desde el punto de vista inmunológico.

2.2 Patogenia de la fiebre tifoidea.

Salmonella typhi penetra al organismo por vía oral, coloniza el intestino delgado sin causar síntomas apreciables y penetra la membrana basal intestinal a través de las células M de las placas de Peyer. De ahí, viaja por vía linfática a la circulación, donde es fagocitada por células del sistema fagocítico mononuclear, macrófagos en el bazo y células de Kupffer en el hígado. Estas células son el principal sitio de multiplicación de la *Salmonella* en esta etapa de la infección (37).

La invasión en el sistema hepático facilita la entrada de la bacteria al sistema biliar, donde se multiplica en forma masiva debido a su resistencia a las sales biliares. De ahí, las bacterias pasan al sistema digestivo y son eliminadas en las heces, lo cual facilita la diseminación de la enfermedad.

Gran parte de las manifestaciones clínicas son provocadas por la liberación de endotoxina; entre otros efectos se ha comprobado que induce fiebre, hipotensión arterial, leucopenia y estimulación policlonal de linfocitos B (19).

3. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA.

La membrana externa de las bacterias gram negativas difiere de la membrana citoplasmática por contener un componente lipopolisacárido y menor cantidad de fosfolípidos y proteínas. A pesar de que la variedad de proteínas presentes en la membrana externa es escasa, parece que éstas son las responsables de la mayoría de las funciones de la membrana, además de jugar un papel importante en la relación huésped-parásito (50).

En la década de los años 70, la separación de las proteínas de membrana externa (PME) fue optimizada por Osborn (57) y Schnaitman (67), lo que permitió un estudio sistemático de las mismas.

Actualmente, se sabe que el número de las PME varía dependiendo de la información genética de la bacteria y su expresión puede verse afectada por factores como condiciones de cultivo, temperatura, mutaciones, etc. (49).

Las PME se clasifican de acuerdo a su abundancia en la membrana en proteínas principales y proteínas menores (56). Las primeras, son las proteínas más abundantes de la membrana; hasta

ahora, se han descrito alrededor de 10, aunque generalmente solo se expresan 5 de ellas en una misma bacteria, con más de 100 000 copias por célula. Cabe mencionar, que algunas proteínas menores bajo ciertas condiciones de cultivo llegan a expresarse en cantidades tan altas como las proteínas mayores.

Dentro de las proteínas mayores se encuentran las proteínas matrices o porinas, la proteína modificable por el calor y la lipoproteína de Braun.

3.1 Proteínas matrices o porinas.

Estas proteínas se caracterizan por estar asociadas en forma firme, pero no covalente, con la peptidoglicana, por lo que se les llamó proteínas matrices (8). La composición de estas proteínas, así como su número y movilidad electroforética, varía dependiendo de la cepa de origen. Además, reciben el nombre de porinas, por formar canales que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas (50, 36).

Nakae demostró en 1976 (46, 47), que las porinas forman canales de difusión, al recostituir estas proteínas purificadas con fosfolípidos y LPS en vesículas, las cuales resultaron ser permeables a moléculas de bajo peso molecular e impermeables a oligo y polisacáridos de peso molecular mayor a 700 Da.

Las porinas se arreglan en forma regular en la superficie de

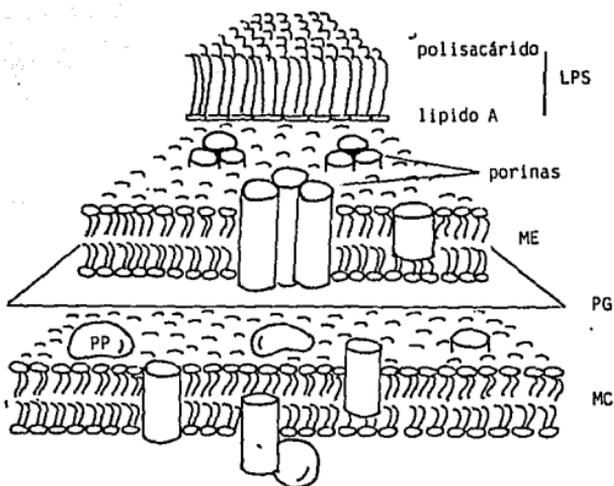


FIGURA 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido; ME: membrana externa; PG:peptidoglicana; MC: membrana citoplasmática; PP: proteínas periplásmicas.

la membrana externa (fig. 1), formando estructuras triangulares constituidas por homotrimeros (50, 62).

En *Salmonella typhimurium*, las porinas están codificadas por los genes *ompF*, *ompC* y *ompD*, y su expresión se encuentra regulada principalmente por la actividad osmótica del medio y la temperatura (50).

La síntesis de la proteína OmpF, a diferencia de OmpC, es reprimida por un aumento en la osmolaridad del medio y la temperatura.

3.2 Antigenicidad de las porinas.

Algunos estudios indican que las porinas de *Salmonella typhimurium* son inmunogénicas en ratones (27, 28).

Las porinas de *Salmonella typhi* han sido poco estudiadas, sin embargo, se cuenta con suficiente evidencia para pensar que desempeñan un papel importante en el desarrollo de inmunidad contra esta bacteria.

Algunos de los puntos más importantes que apoyan la idea de utilizar a las porinas como inmunógenos son los siguientes:

1. Los pacientes con fiebre tifoidea produjeron anticuerpos de clase IgM hacia una PME de 28 KDa durante la fase aguda de su

padecimiento. En la convalecencia, la respuesta fue de IgG y se dirigió hacia las porinas (36 a 41 KDa) (55).

2. Anticuerpos monoclonales (IgM) anti-porinas de *S. typhi* confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL₅₀ de la bacteria homóloga (21), mientras que anticuerpos monoclonales anti-LPS no produjeron ningún efecto (58).

3. La vacunación de ratones NIH con 30 µg de PME de *S. typhi*, indujo respuesta proliferativa in vitro de linfocitos en presencia de porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* o *E. coli* (17).

4. La administración de vacuna antitifoídica oral indujo, en las personas estudiadas, la producción de anticuerpos anti-porinas cuantificados por el método de ELISA (2).

5. La vacunación de ratones NIH con 10 µg de porinas de *S. typhi* indujo protección de 100% contra el reto de 500 DL₅₀ de la bacteria homóloga (22).

4. MECANISMOS INESPECIFICOS DE DEFENSA CONTRA LA INFECCION.

Los organismos superiores pueden vivir en contacto íntimo con bacterias potencialmente patógenas debido a que cuentan con mecanismos que previenen su invasión. En los mamíferos los principales mecanismos de defensa inespecífica consisten en las barreras del epitelio dérmico y mucoso, los componentes

antimicrobianos del suero y la fagocitosis.

Los epitelios funcionan como barreras físicas que impiden la invasión de microorganismos. Además, las células epiteliales pueden fagocitar a los microorganismos invasores ayudando a su eliminación. Sin embargo, algunas bacterias pueden sobrevivir dentro de estos fagocitos no profesionales.

Otro factor mecánico que protege la superficie epitelial de la penetración bacteriana es el efecto de lavado de las lágrimas, la saliva y la orina. Muchos de estos fluidos biológicos contienen componentes bactericidas, como son: la acidez del jugo gástrico, la espermina y el zinc en el semen, la lactoperoxidasa en la leche y la lisozima en las lagrimas, las secreciones nasales y la saliva.

Si una bacteria logra penetrar al organismo, deberá aún enfrentarse a dos distintos mecanismos de defensa: los efectos antimicrobianos del suero y la fagocitosis. Dentro del primer mecanismo encontramos tanto la actividad antibacteriana directa del complemento, como mecanismos de secuestro del hierro de los fluidos (12).

Las bacterias gram negativas son resistentes a la acción de la B-lisina y la lisozima, pero son sensibles a la lisis por complemento activado por la vía alterna. La muerte se debe a la deposición del complejo de ataque a la membrana (MAC, C5-C9) en la

membrana de la bacteria. La interacción resultante permite el acceso de la lisozima del suero a la peptidoglicana, ocasionando su lisis.

La fagocitosis representa el mecanismo más efectivo de defensa inespecífica. Los principales fagocitos profesionales involucrados en la destrucción de bacterias invasoras son los neutrófilos, monocitos y macrófagos. Estas células son atraídas al sitio de infección por sustancias quimiotácticas como péptidos que contienen N-formilmetionina (importantes en la iniciación de la síntesis de proteínas bacterianas) y algunos factores resultantes de la activación de la cascada del complemento, como C5a. Estos últimos factores funcionan como anafilatoxinas, que provocan la liberación de histamina por células cebadas y basófilos, ocasionando un aumento de permeabilidad en los capilares.

Cuando los factores quimiotácticos se unen a sus receptores leucocitarios provocan además de un movimiento dirigido, una de las señales de iniciación del estallido respiratorio y el aumento en la expresión de receptores para C3b y la fracción Fc de la IgG. Estos receptores permiten la adhesión de las bacterias opsonizadas para ser endocitadas por los leucocitos.

A medida que se forma el fagosoma durante el englobamiento microbiano, los gránulos del neutrófilo se fusionan con la vacuola fagocítica. Los gránulos más frecuentes son los secundarios o

especificos que contienen lactoferrina y lisozima. Los gránulos primarios, que son mas efectivos en actividad bactericida, contienen abundantes enzimas lisosómicas hidrolíticas, defensinas (proteínas catiónicas), lisozima, elastasa y mieloperoxidasa (32). Cuando esta última se une con un ion haluro y H_2O_2 , generado por el estallido respiratorio, se forma un agente bactericida extraordinariamente efectivo (el ácido hipocloroso o hipoclorito) (72). La muerte celular se debe a un aumento en la permeabilidad de la pared celular del microorganismo. Otras especies reactivas del oxígeno como los radicales hidroxilo y superóxido favorecen la actividad bactericida de los fagocitos profesionales. Los macrófagos no expresan el sistema de la mieloperoxidasa pero pueden ser activados inmunológicamente por el interferón gamma, el cual eleva su capacidad de generar especies reactivas del oxígeno.

5. FACTORES DE VIRULENCIA.

A los mecanismos por los cuales un microorganismo puede evitar las defensas del hospedero y causar una infección, se les llama factores de virulencia. La importancia de estos factores depende de la etapa de la infección.

En el caso de *Salmonella* los factores más conocidos de virulencia son los siguientes:

5.1 Fase de entrada.

Nnalue y Lindeberg (51) comprobaron en 1990, que el LPS juega

un papel importante en esta etapa de la infección. Para ello, probaron la virulencia de tres cepas mutantes de *S. choleraesuis* deficientes en antígeno "O" inoculadas por tres vías a ratones BALB/C. Cuando estas cepas se inocularon por vía intraperitoneal o intravenosa resultaron ser tan virulentas como la cepa original. Sin embargo, cuando se inocularon por vía oral resultaron ser avirulentas. Esto indica que el LPS desempeña un papel importante en facilitar la sobrevivencia de la bacteria en el tracto gastrointestinal.

5.2 Fase de penetración

La invasión de la mucosa gastrointestinal es un paso esencial en la patogénesis de *Salmonella*, que depende de factores como la movilidad y la capacidad de adherencia y penetración.

Jones y col. comprobaron en 1981, la importancia de la movilidad en esta etapa de la infección (24). Para ello, realizaron experimentos de invasividad de *Salmonella typhimurium* a células HeLa y encontraron que cuando se usaban mutantes sin movilidad no se producía el contacto entre los dos tipos de células y por lo tanto no se producía la invasión; sin embargo, cuando las células HeLa se centrifugaron con las mutantes no móviles, se produjo la invasión. Cuando estos experimentos se repitieron con *S. typhi* y células de riñón de perro MDCK no se obtuvo el mismo resultado lo que sugiere que esta especie bacteriana requiere de movilidad intrínseca para invadir células epiteliales, y que ésta no puede

ser sustituida por fuerzas mecánicas (34).

Por otro lado, los mismos autores han propuesto que los plásmidos de virulencia están involucrados en la adherencia e invasión de células de mamíferos, y que estos plásmidos pueden introducirse en el cromosoma bacteriano, lo que evita la expresión del fenotipo de virulencia (23). Cuando los plásmidos se escinden del cromosoma, se presenta de nuevo la virulencia bacteriana.

5.3 Fase de diseminación.

Una vez que las bacterias han penetrado el tejido mucoso viajan por vía linfática a la circulación. En esta etapa es probable que el antígeno Vi funcione como un factor protector del antígeno "O", contra la acción de los anticuerpos o el complemento, evitando de esta manera la fagocitosis y la acción bactericida del suero (34). Una evidencia que apoya esta hipótesis, es que los anticuerpos dirigidos contra el antígeno Vi facilitan la fagocitosis de bacterias con este antígeno capsular, que en condiciones normales son típicamente resistentes (19).

5.4 Fase de crecimiento intracelular.

Se han obtenido evidencias que apoyan la hipótesis de que la sobrevivencia de *Salmonella* en macrófagos es un factor primordial en la patogenia del microorganismo; una de ellas es que mutantes por inserción de transposón de *S. typhimurium* que no sobrevivieron intracelularmente en macrófagos cultivados, tienen reducida

virulencia en ratones (11).

Se han propuesto tres probables mecanismos por los cuales la bacteria evade su destrucción en el interior de los fagocitos (26): a) inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma; b) interferencia con los metabolitos reactivos del oxígeno o con las enzimas lisosomales; y c) transición al interior del citoplasma.

Se ha comprobado que *Salmonella* posee cuando menos el segundo mecanismo de evasión. Buchmeier y Heffron demostraron en 1990 que este proceso requiere una regulación en el genoma bacteriano, que provoca la síntesis de más de 30 proteínas selectivas del periodo de infección de *Salmonella typhi* a macrófagos (5). También demostraron que dos mutantes de *Salmonella*, sensibles a muerte intracelular, fallaban en la síntesis de diferentes grupos de estas proteínas normalmente inducidas cuando la bacteria infecta macrófagos (5).

Con respecto a la regulación de la expresión génica, en estudios simultáneos, los grupos de Mekalanos (40) y Heffron (18), demostraron que *S. typhimurium* con mutaciones en el locus regulador *phoP* (responsable de la síntesis de una fosfatasa ácida periplásmica) son avirulentas cuando se inyectan en ratones BALB/c, son incapaces de sobrevivir en macrófagos y son extremadamente sensibles a péptidos con actividad antimicrobiana, tales como las defensinas. El locus *phoP* está compuesto de dos genes presentes en

un operón: *phoP* y *phoQ*, y las secuencias de aminoácidos de los productos génicos tienen alta homología con otros miembros de reguladores transcripcionales bacterianos de dos componentes que responden a estímulos ambientales, tales como PhoB y OmpR; por lo que se ha propuesto que existe en *Salmonella* un sistema regulador de dos componentes *phoP/phoQ* que regula la expresión de genes involucrados en virulencia, que codifican para proteínas de superficie que participan en la resistencia del microorganismo a factores microbicidas del ambiente.

Por otro lado, se ha comprobado que las porinas además de funcionar como poros de difusión están involucradas en la patogénesis de ciertas bacterias. Porinas de *S. typhimurium* inducen la activación del complemento por la vía clásica y por la vía alterna (15); son capaces de unirse a leucocitos polimorfonucleares de humanos, afectando la integridad de su membranas y su actividad funcional (76); parecen tener relación con la adherencia e invasión de las bacterias a células epiteliales y son capaces de inducir la liberación de histamina en células epiteliales (14).

6. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune está formado por una intrincada red en la que participan diferentes tipos de células, que permiten el reconocimiento de lo propio y de lo ajeno, para formar un equilibrio con el medio ambiente. Este sistema se enfrenta continuamente con sustancias extrañas y organismos que tratan de

infectarlo. Estos pueden encontrarse en los fluidos biológicos (ej. toxinas, bacterias) o dentro de las células del hospedero (virus, productos de oncógenos y algunas bacterias intracelulares que pasan al citoplasma). El sitio donde se encuentra el antígeno (intra o extracelularmente), es determinante en la vía de procesamiento que llevará a cabo la célula presentadora de antígeno y finalmente en el tipo de célula T que lo reconocerá (78).

6.1 Procesamiento de antígeno.

Los antígenos extracelulares, que son fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear, son digeridos a péptidos y expresados en la superficie de estas células, unidos a las moléculas de clase II (H-2 I-A e I-E en el ratón y HLA DR, DQ y DP en el humano) del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (78). Estos antígenos son internalizados y degradados gradualmente en su tránsito por la vía endocítica, primero en los endosomas primarios, luego en los endosomas tardíos y finalmente son convertidos a péptidos en los lisosomas. Estos compartimentos aumentan gradualmente su poder proteolítico a medida que bajan en pH. Las moléculas de clase II permanecen en la vía endocítica (61), hasta que son liberadas de la cadena invariable. Una vez liberadas las moléculas clase II pueden unir péptido y transportarlo a la membrana celular (fig. 2), (3).

Sadegh-Nasserí y Germain demostraron en 1991 (66), que la unión del péptido al MHC II se favorece en un microambiente ácido,

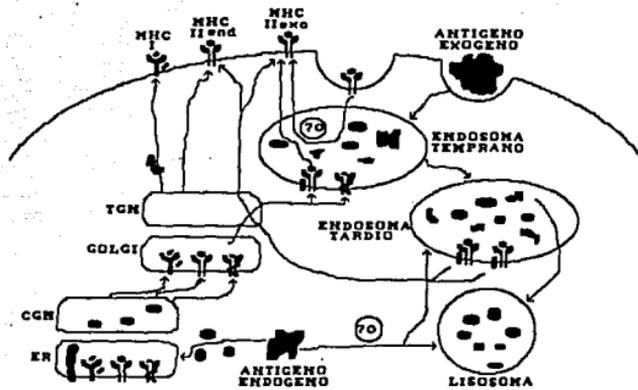


FIGURA 2. TRAFICO INTRACELALAR DE LAS VIAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENO (modificado de 3).

Los antígenos exógenos son fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear, digeridos a péptidos por la vía endocítica, y expresados en la superficie de estas células, unidos a las moléculas de clase II del MHC. En cambio, los antígenos endógenos son degradados a péptidos en la vía citosólica y transportados al ER, donde se unen a moléculas de clase I para ser expresados en la superficie de las células.

Abreviaturas: MHC: complejo principal de histocompatibilidad, END: endogeno, EXO: exogeno, TGN: red de trans-Golgi, CGN red de cis-Golgi, ER: retículo endoplásmico.

formándose un complejo MHC II-péptido que se estabiliza durante la neutralización, dando como resultado una unión de alta afinidad.

Por otra parte, los antígenos endógenos se generan principalmente por tres vías: a) por degradación de las proteínas sintetizadas en forma endógena a péptidos por proteasas citosólicas, los cuales son transportados al retículo endoplásmico (ER); b) por transporte de proteínas a un compartimento intermedio entre el ER y el aparato de Golgi, y c) ocasionalmente las proteínas pueden transportarse al lisosoma o al endosoma tardío, en un proceso que involucra la interacción de una proteína de 70 KD, que forma parte de la familia de las proteínas de choque térmico. Los péptidos generados en el ER pueden unirse con las moléculas de clase I (H-2 K, D en el ratón y HLA B, C y A en el humano) o competir con la cadena invariable para unirse a las moléculas de clase II (fig 2), (3).

Esta primera fase, llamada de procesamiento y presentación de antígeno, es indispensable, pues los linfocitos T son incapaces de distinguir al antígeno en su forma nativa (38).

6.2 Linfocitos T

El reconocimiento del péptido ligado a la molécula de clase I o clase II del MHC divide a los linfocitos T en dos grupos: los llamados T citotóxicos (Tc, CD8⁺), que se unen a las moléculas de clase I, y los linfocitos T cooperadores (Th, CD4⁺), que se unen a

las moléculas de clase II (78).

Los linfocitos Tc, como células efectoras, tienen la capacidad de lisar células infectadas directamente y secretar linfocinas como el interferón gamma y la interleucina 2, por lo que son importantes para erradicar células infectadas por virus o células tumorales (45).

En cambio, la principal función de los linfocitos Th, cuando son activados, es liberar linfocinas que conducen la fase efectora de la respuesta inmune, de manera que activan células como linfocitos B, macrófagos y otros linfocitos (30). Promueven la producción de anticuerpos, por lo que ayudan a la eliminación de antígenos extracelulares sensibles a mecanismos inmunes como: lisis por la vía clásica del complemento y citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), entre otros.

La actividad de los linfocitos Tc y Th correlaciona con el tipo de antígeno requerido para su activación. Mientras las células Th son activadas principalmente por células presentadoras de antígeno (CPA) que han fagocitado un antígeno extracelular, los linfocitos Tc reconocen antígenos que han sido biosintetizados dentro de la célula que los presenta.

La activación de los linfocitos T no solo depende de la unión del complejo receptor (TCR)-CD2-CD3 al antígeno asociado a las

moléculas del MHC, ya que existen otras moléculas en la superficie de los linfocitos T que intervienen en la regulación de la adhesión a la célula presentadora de antígeno (CPA) (fig. 3).

6.3 Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión además de regular las interacciones célula-célula, regulan la migración celular. Estas moléculas desarrollan un papel importante frente a la infección, ya que su regulación permite que las células inmunes, que circulan en forma no adherente en la sangre, puedan migrar como células adherentes a través de los tejidos. Este proceso permite que las células inmunes en presencia de un antígeno, puedan congregarse en los órganos linfoides y atravesar el endotelio para llegar finalmente al sitio de infección.

Se han descrito tres familias de moléculas de adhesión que median estas interacciones: la superfamilia de las inmunoglobulinas, que incluyen los receptores antígeno específicos de los linfocitos T y B; la familia de las integrinas, que tiene especial importancia en la regulación de la adhesión y la migración; y por último las selectinas, que son importantes en la interacción de los linfocitos y neutrófilos con el epitelio vascular (71).

6.4 Subpoblaciones de linfocitos Th

En el ratón se han demostrado dos subpoblaciones funcionales

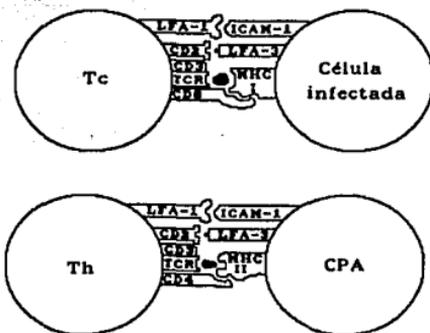


FIGURA 3. MOLECULAS DE ADEHESION RELACIONADAS EN LA PRESENTACION DE ANTIGENO (modificado de 65).

CPA- célula presentadora de antígeno

TCR- receptor de antígeno del linfocito T

ICAM- molécula intercelular de adhesión

CD- grupo de diferenciación

MHC- molécula del complejo principal de histocompatibilidad.

de linfocitos cooperadores con distinta capacidad de producción de interleucinas (IL): los Th1 se relacionan con la hipersensibilidad de tipo retardado, ya que elaboran principalmente IL-2, interferón gamma y linfotoxina; en cambio, los Th2, producen fundamentalmente interleucinas 4, 5, 6 y 10, de las cuales las tres primeras son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B y la última es un factor inhibidor de la secreción de citocinas por linfocitos Th1 (42, 43).

Recientemente se han presentado evidencias que sugieren la presencia de estas subpoblaciones en el humano (65). Así, en pacientes con diversos estados patológicos se ha encontrado acumulación de linfocitos T CD4⁺ que secretan diferentes tipos de interleucinas; por ejemplo, en los pacientes con tiroiditis se ha encontrado que la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ que infiltran dicha glándula, pueden producir interferón gamma pero no IL-4, lo que sugiere que esta población sea equivalente a los linfocitos Th1 encontrados en los ratones.

6.5 Linfocitos B

Los linfocitos B, a diferencia de los linfocitos T, pueden reconocer al antígeno en su forma nativa y funcionar como células presentadoras de antígeno. Sin embargo, estas células necesitan la participación de los mediadores solubles producidos por los linfocitos Th para iniciar su activación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos.

La capacidad de los linfocitos B de procesar y presentar antígenos aumenta la eficiencia del sistema inmune, sobre todo en respuestas secundarias (30).

6.6. Fase efectora de la respuesta inmune.

La fase efectora de la respuesta inmune puede dividirse en dos ramas: la humoral, que comprende las actividades biológicas de los anticuerpos y el complemento; y la celular, que involucra los fenómenos mediados por los linfocitos Tc, que se describieron anteriormente.

Otros mecanismos efectores no específicos, de gran importancia, dependen de los macrófagos y las células asesinas naturales (NK).

Los macrófagos cumplen con varios papeles importantes en la modulación de la respuesta inmune y en la inflamación (77). Entre ellos se cuentan: 1) funcionan como células presentadoras de antígeno, que pueden fagocitar y presentar péptidos provenientes del procesamiento de moléculas solubles o microorganismos; 2) liberan al medio productos biológicamente activos como la interleucina 1, que es un mediador de algunos efectos de la endotoxinas, el interferón- α que presenta actividad antiviral, el factor de necrosis tumoral, metabolitos derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos) y algunos componentes del complemento; 3) están situados en sitios críticos en varios

tejidos, regularmente cerca del sistema microvascular y rodeando las células epiteliales; y 4) tienen receptores de superficie para diversas linfoquinas que median su activación, permitiendo que aumente su poder microbicida y tumoricida.

Kaufmann describió en 1989 (26) el papel del interferón gamma producido por las células T CD4⁺ como el principal factor de activación de los sistemas microbicidas de los macrófagos. Algunos factores estimulantes de linfocitos B, como IL-4 y 6 provenientes de las células Th2, así como el factor de necrosis tumoral (TNF), contribuyen también en la activación de los macrófagos.

6.7 Mediadores solubles de la respuesta inmune.

El interferón (INF) tipo 1, comprende dos tipos diferentes de proteínas. El primer grupo, llamado INF- α , es una familia de aproximadamente 20 estructuras polipéptidicas relacionadas, de aproximadamente 18 KDa, codificadas cada una en genes independientes y producidas principalmente por fagocitos mononucleares. El segundo grupo llamado INF- β consiste en una glicoproteína de aproximadamente 20 KDa, producida principalmente por fibroblastos. Ambos grupos de INF cumplen con funciones similares: inhiben la replicación viral, inhiben la proliferación celular, incrementan el poder lítico de las células NK, y modulan la expresión de las moléculas del MHC (1).

El INF-gamma, homodimero de glicoproteina formado por subunidades de 21 a 24 KDa, es producido por las células Th1 y algunas Tc. El INF-gamma al igual que el INF- α/β , tiene efecto antiviral (68) y promueve la expresión de diversos genes (64), de manera notable, los del MHC (6). Además, el INF-gamma es un potente activador de los sistemas microbicidas de los fagocitos mononucleares y los neutrófilos, promueve la diferenciación de células T y B, y activa las células NK en forma más eficiente que el INF tipo 1.

La IL-2 es una glicoproteina de 14 a 17 KDa, producida principalmente por los linfocitos Th1 y algunos Tc. Esta IL actúa como el principal factor de crecimiento de linfocitos T (70), promueve el crecimiento de clonas antígeno específicas, funciona como factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos T citotóxicos, y promueve la expansión de células NK (54).

La IL-3 es producida por los linfocitos Th y funciona como uno de los factores estimulantes de colonias que regulan la hematopoyesis (41).

La IL-4 es producida por los linfocitos Th2, actúa como factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B, favorece el mecanismo del "switch" necesario para la producción IgG y de IgE y aumenta la expresión de las moléculas de clase II (53).

La IL-5, que es producida por linfocitos Th2, induce la proliferación de los linfocitos B que hayan tenido contacto previo con el antígeno y favorece la secreción de IgM. Además, funciona como factor de crecimiento y diferenciación de eosinófilos (1).

La IL-6 es sintetizada por fagocitos mononucleares, células del epitelio vascular, fibroblastos, linfocitos Th2 y otras células en respuesta a la IL-1. Interviene en la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas (53).

La IL-7 es secretada por células estromales de médula ósea, induce la producción de timocitos y linfocitos B inmaduros (74).

La IL-8 que es producida por linfocitos T activados y monocitos, actúa como factor quimiotractante de neutrófilos y en menor grado para eosinófilos, basófilos y linfocitos; además, inhibe la adhesión de los neutrófilos a monocapas endoteliales (16).

La IL-10 que es secretada por los linfocitos Th2 en el ratón, actúa como linfocina reguladora de la actividad de los Th1 (43).

V. MATERIALES Y METODOS.

1. CEPA BACTERINA

Se utilizó *Salmonella typhi* 9, 12, Vi:d aislada originalmente de un paciente con diagnóstico clínico y bacteriológico de fiebre tifoidea.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratones de la cepa C₃HeB/FeJ (H-2^k, Ity', LPSⁿ) de 8 a 12 semanas de edad.

3. OBTENCION DE ANTIGENOS

Las porinas de *S. typhi* fueron purificadas por una modificación al método de Nikaido (49).

La bacteria se creció durante 8 horas a 37°C con agitación a 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A complementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon en fase logarítmica, por centrifugación a 1650 g durante 15 min a 4°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador de Hepes (ácido N-2-hidroxietyl-N'-2-etano sulfónico) 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso.

Posteriormente la bacteria se recuperó en amortiguador Tris (Hidroxi metil amino metano) 0.01 M, pH 7.7 y se rompió en forma

mécanica (DYNO-MILL, Glen Mills Co.) con 60% de perlas de vidrio, empleando 10 ciclos de ruptura de un minuto con descansos de 5 minutos. Después de la ruptura, el sobrenadante se recuperó dejando sedimentar las perlas de vidrio; las bacterias enteras y las perlas residuales se eliminaron de este centrifugando a 7000 g por 15 minutos. El lisado, así obtenido, se trató con DNasa y RNasa para disminuir la viscosidad y eliminar los ácidos nucleicos.

La envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación del lisado a 100 000 g por 30 minutos a 20°C, se solubilizó en Tris 10 mM, pH 7.7, SDS (dodecil sulfato de sodio) al 2% y se incubó 30 minutos a 32°C; posteriormente se ultracentrifugó a 130 000 g, 35 min y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contenía peptidoglicana, de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella solubilizándola con Tris 50 mM, pH 7.7, SDS 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y 2-mercaptoetanol 0.05%; después de un periodo de incubación de 2 horas a 37°C, se ultracentrifugó a 100 000 g por 30 minutos a 25°C y el sobrenadante se pasó por columna de Sephacryl S-200 (80 cm por 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con un flujo de 4 ml/hr. Se recuperó la fracción que levigó inmediatamente después del volumen vacío, detectando la presencia de proteínas a 280 nm. Para reutilizar la columna, se lavó con un volumen equivalente a dos veces el volumen total del gel.

4. DETERMINACION DE PROTEINAS

La cuantificación de proteínas en las preparaciones de porinas purificadas, se realizó de acuerdo al método de Lowry (35) empleando albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma Co).

5. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Las porinas se caracterizaron de acuerdo a su movilidad electroforética, en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), según la técnica de Laemmli (29). Se utilizó una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments), en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos. El gel separador contenía 11.2% de acrilamida, 0.25% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M y pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005%.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 15 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente los geles se tiñeron durante 1 hora en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Después de teñir, los geles se decoloraron con una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo de los geles quedó transparente.

6. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

La electrotransferencia de porinas de los gales de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC) se llevó a cabo durante una 1 h 15 min a 500 mA en un equipo Transphor (LKB Instruments). Se empleó como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 20% en Tris 20 mM pH 8.3, según lo descrito por Towbin (75). Transcurrido este tiempo para comprobar que la transferencia se llevó a cabo, el PNC se tiñó con rojo de Fonceau al 0.1%. Después de lavar con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS; NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M pH 7.2) hasta que desaparecieron las bandas, el papel se introdujo en solución de bloqueo (gelatina al 1.5% en PBS), durante 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados con PBS-T, el PNC se incubó 1 hora a 37°C y toda la noche a temperatura ambiente con suero de conejo anti-PME absorbido con LPS, se lavó 6 veces con PBS-T y se incubó 1.5 h a 37°C con la dilución óptima de antisuero de cabra conjugado a peroxidasa (anti-IgG de conejo, Cappel Lab.). Una vez pasado el tiempo de incubación se lavó 6 veces con PBS-T y 2 veces con PBS. Finalmente se reveló con solución de sustrato (3,3-diaminobencidina, H₂O₂ en PBS), eliminándose el exceso con agua destilada.

7. ESQUEMA DE INMUNIZACION.

Los ratones se inmunizaron intraperitonealmente (i.p.) con 30 µg de porinas de *S. typhi* en 0.5 ml de solución salina fisiológica, los días 0 y 7. El día 14 se sacrificaron obteniéndose de cada ratón: sangre por punción cardiaca, macrófagos de exudado

peritoneal y células de bazo.

8. OBTENCION DE MACROFAGOS DE CAVIDAD PERITONEAL

Los ratones se anestesiaron con cloroformo y se sangraron por punción cardiaca. Después, se fijaron a la tabla de cirugía, se les cortó la piel para exponer el epitelio y se les inyectó (en condiciones de asepsia) 5 ml de solución de Hanks en el peritoneo. Se dio masaje en el abdomen durante 5 min, y se recuperó el medio introducido por aspiración (manteniéndolo en frío para evitar la adherencia de las células). Las células se lavaron con la misma solución, a 255 g, 10 min y se resuspendieron en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). La concentración celular se ajustó contando las células viables en cámara de Neubauer mediante tinción con un colorante vital (azul tripano).

9. OBTENCION DE CELULAS DE BAZO

A los ratones sacrificados para la obtención de macrófagos se les extrajo el bazo en condiciones de esterilidad. Los esplenocitos se obtuvieron por disgregación mecánica del bazo y se lavaron con solución de Hanks, a 255 g, 10 min. Los eritrocitos presentes se eliminaron por lisis con cloruro de amonio 0.16 M, Tris-HCl 0.17 M, pH 7.65. Las células se recuperaron en DMEM complementado con SFB al 10%, antibióticos (penicilina y gentamicina), 2-mercaptoetanol 2×10^{-5} M y L-glutamina. La concentración celular se ajustó de la misma manera que para los macrófagos.

10. ENSAYO IMMUNOENZIMATICO (ELISA).

Los niveles de anticuerpos anti-porinas y anti-LPS, en el suero de los ratones, se evaluaron con el método de ELISA, descrito por Engvall (9). Las placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Co.) se sensibilizaron con 100 μ l/pozo de una solución de 10 g/ml de porinas o LPS en amortiguador de carbonatos (carbonato/bicarbonato de sodio pH 9.6), 1h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T al 0.1% y se bloquearon con PBS-gelatina al 2% durante dos horas a 37°C. Después de este periodo de incubación, las placas se lavaron, 4 veces, con PBS-T al 0.1%, y se adicionaron 100 μ l/pozo de las diluciones seriadas del suero problema (se probaron diluciones desde 1:50 hasta 1:12 800). Con el primer anticuerpo se incubó 1.5 h a 37°C, se lavó 4 veces con PBS-T al 0.1% y se agregaron 100 μ l/pozo del conjugado (inmunoglobulinas de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón, Sigma Co.). Con el segundo anticuerpo se incubó 2 hrs a 37°C y después de lavar 4 veces con PBS-T al 0.1%, se agregó 100 μ l/pozo de sustrato (o-fenilendiamida, H₂O₂, en amortiguador de citratos pH 5.6). A los 10 min de incubación en oscuridad, la reacción se paró agregando 30 μ l/pozo de H₂SO₄ 2 N. La absorbencia se leyó a 490 nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatec).

11. ENSAYO DE ACTIVACION *in vitro* CON MITOGENOS

Los esplenocitos se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml y se cultivaron 200 000 células por pozo en placas de

microcultivo de 96 pozos de fondo plano (NUNC). Se agregaron cantidades variables de Concanavalina A 0.1 mg/ml (Con A), tipo IV-S (Sigma Co.), para llegar a una concentración final de 5, 10 y 20 μ g/ml. Las células se cultivaron durante 5 días a 37°C, en cámara húmeda y 5% de CO₂. Dieciocho horas antes de terminar el cultivo se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada (³HTDr, Amersham International 5 mCi de actividad específica) por pozo. Las células se transfirieron a papel de fibra de vidrio mediante un cosechador semiautomático (Mini Mash II) y se determinó la concentración de timidina incorporada en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 580).

12. ENSAYO DE ACTIVACION ANTIGENO-ESPECIFICA CON PORINAS.

Los esplenocitos, provenientes de ratones inmunes y testigos, se cultivaron en placas de 96 pozos (NUNC), a una concentración de 200 000 células/pozo en 200 μ l de medio DMEM complementado y se les agregó porinas de *S. typhi* a una concentración de 25 y 50 μ g/ml. Como control de activación se cultivaron células con Con A a 10 μ g/ml. Las células se cultivaron y su activación se evaluó en las condiciones descritas para la activación con mitógenos (44).

13. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

Con el fin de obtener la concentración óptima de antibiótico necesaria para eliminar a la bacteria extracelular en el ensayo de invasividad, se realizó la prueba de susceptibilidad. Para ello se realizaron diluciones seriadas de diferentes antibióticos partiendo de una solución de 2 000 μ g/ml, en placas de agar (2 ml de dilución

en 18 ml de medio, para tener una concentración final desde 0.25 hasta 128 μ g/ml). Estas placas se inocularon con 2 μ l de *Salmonella typhi* ajustada a 5×10^7 UFC/ml. Como controles se utilizaron cepas de susceptibilidad conocida. Después de un periodo de incubación de 18 horas, el índice de susceptibilidad se determinó como la concentración mínima de antibiótico que fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (MIC).

14. AJUSTE DE BACTERIA

La bacteria empleada para los ensayos de infección, se creció en medio BHI, durante 18 hrs. Después de la incubación, se cosechó en fase logarítmica de crecimiento, (en este caso se incubó 18 hrs tomando en cuenta el periodo de adaptación requerido por la bacteria para utilizar un medio de cultivo diferente), y se ajustó su concentración en SSI (solución salina isotónica) a una absorbencia de 0.59-0.61, a 540 nm, lo que equivale a una concentración de 10^9 bacterias/ml. A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas de la bacteria hasta llegar a la concentración deseada (10^7 en Hanks para el ensayo de infección). El ajuste bacteriano, se comprobó haciendo una cuenta en placa en medio BHI, de las tres últimas diluciones bacterianas (800, 80 y 8).

15. ESTANDARIZACION DE LA RELACION DE INFECCION

Con el fin de evaluar la relación óptima de infección (bacteria:macrófagos), se realizó el siguiente ensayo: macrófagos

provenientes de exudado peritoneal se ajustaron a una concentración de 10^6 cels/ml, en medio DMEM (sin antibióticos y complementado con 15% de SFB sin descomplementar) y se infectaron según el método descrito por Falkow (12), con *S. typhi* (crecida en BHI, 18 hrs antes) en relación 1:1 y 1:10, (células:bacteria). Después de tres horas de incubación a 37°C con agitación, las células se lavaron a 255 g/10 min y se resuspendieron en 2 ml de PBS con tritón X-100 al 25%, se incubaron durante 5 minutos y se agitaron en vortex para lisar las células y permitir la liberación de la bacteria internalizada, la cual se evaluó por cuenta en placa (en medio BHI). Como control de crecimiento bacteriano se utilizaron muestras a las cuales no se les agregó células y como control de esterilidad células no infectadas. Ambos controles se manejaron de la misma forma que los problemas.

16. ENSAYO DE INFECCION *in vitro*.

Para determinar la capacidad que tienen las porinas de inducir una respuesta de linfocitos T capaces de activar a los macrófagos se inmunizaron ratones $C_3\text{HeB/FeJ}$ como se indicó anteriormente y el día 14 se sacrificaron junto con ratones testigo de la misma cepa.

Los macrófagos de exudado peritoneal y las células de bazo, provenientes de ratones inmunes y testigos, se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cels/ml en medio DMEM (sin antibióticos y complementado con 15% de SFB sin descomplementar) y se infectaron según el método descrito por Falkow (13), con *S. typhi* (crecida en

BHI, 18 hrs antes) en relación 1:10. Después de tres horas de incubación a 37°C con agitación, las células se lavaron a 255 g/10 min y se eliminó la bacteria extracelular incubando durante 30 min en medio complementado con gentamicina, a la concentración evaluada como óptima (10 µg/ml). Las células fueron lavadas, 4 veces con PBS, para eliminar el antibiótico y se resuspendieron en 2 ml de PBS con tritón X-100 al 25%, se incubaron durante 5 minutos y se agitaron en vortex para lisar las células y permitir la liberación de la bacteria internalizada, la cual se evaluó por cuenta en placa en agar con infusión de cerebro-corazón (BHI).

VI. RESULTADOS.

1. Obtención del antígeno

Las PME obtenidas por el método de Nikaido (49) se purificaron en columna de exclusión molecular (Sephacryl S-200) obteniéndose el perfil cromatográfico que se muestra en la figura 4. Se recuperó la fracción que levigó inmediatamente después del volumen vacío (fracciones entre 40 y 45), que corresponde a las porinas, cuyo peso molecular en forma nativa (como homotrímero) es de 120 KDa aproximadamente. La concentración de proteínas en esta fracción se determinó por el método de Lowry (35).

2. Electroforesis

El corrimiento electroforético de esta fracción muestra dos bandas, que en condiciones reductoras (en forma de monómeros) corresponden a un intervalo de peso molecular de 36 a 41 KDa (fig. 5.a, carriles 5 y 6). Este corrimiento no presenta bandas contaminantes, a diferencia del corrimiento electroforético de porinas no purificadas (carriles 2, 3, y 4). En base a este resultado se decidió trabajar con las porinas purificadas, que corresponden a los carriles 5 y 6 de la fig. 5.a.

3. Inmunolectrotransferencia.

La transferencia de las porinas a papel de nitrocelulosa presentó una banda única con peso molecular aproximado de 38 KDa, cuando se reveló con suero de conejo anti-PME (fig. 5.b).

ELUCION DE PORINAS

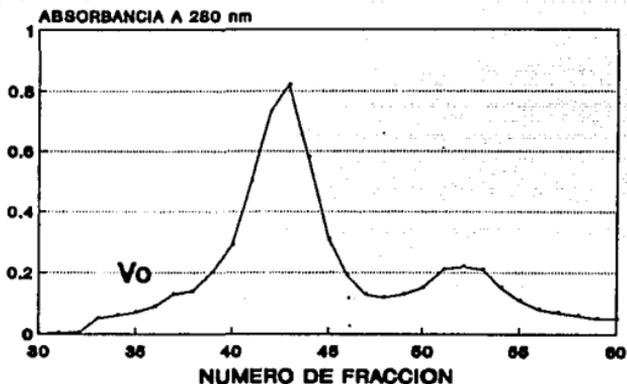


FIGURA 4. CRONATOGRAMA DE ELUCION DE LAS PORINAS

COLUMNA SEPHACRYL S-200

El pico que levigó inmediatamente después del volumen vacío (Vo), entre las fracciones 40 y 45, corresponde a las porinas purificadas en su forma nativa.

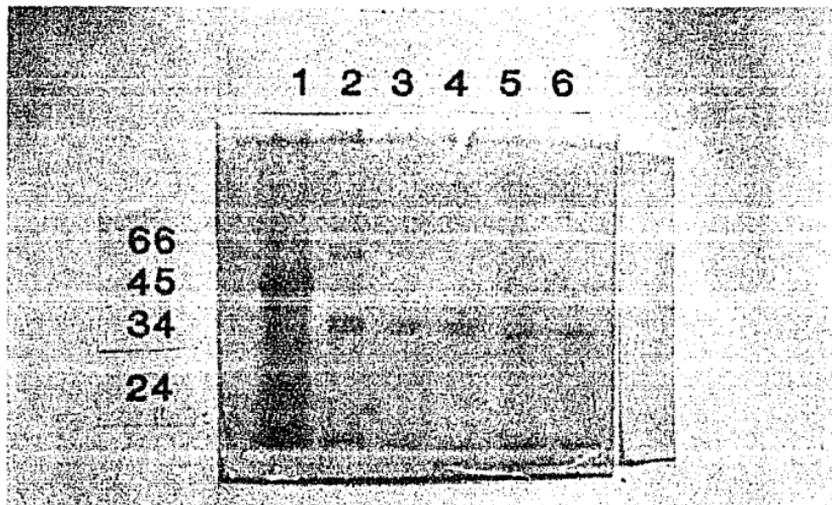
A**B**

FIGURA 5. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS PORINAS EN CONDICIONES REDUCTORAS E IMMUNOELECTRANFERENCIA.

a) En el carril número 1 se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a: albúmina sérica bovina 66 KDa, ovoalbúmina 45 KDa, pepsina 34 KDa y tripsinógeno 24 KDa. Las porinas purificadas, correspondientes al primer pico del cromatograma de la figura 4, se corrieron en los carriles 5 y 6. Porinas no purificadas se corrieron en los carriles 2, 3, y 4.

b) Transferencia de porinas a PNC revelado con suero de conejo anti-porinas.

4. Evaluación de la respuesta inmune a porinas.

4.1 Respuesta humoral.

Los niveles de anticuerpos anti-porinas, medidos por ELISA en los ratones inmunizados con porinas se encuentran dentro del intervalo de 1.5 unidades de absorbencia (UA) para la primera dilución (1:50) y 0.48 UA para la última dilución (1:12 800), en cambio los ratones control presentaron niveles menores a 0.18 UA a partir de la dilución 1:1 600 (fig 6).

Cuando se determinó el nivel de anticuerpos anti-LPS se encontró un comportamiento similar en ambos grupos de ratones: tanto inmunes como controles presentaron niveles menores a 0.2 UA a partir de la dilución de 1:800 (fig. 7).

4.2 Respuesta celular

4.2.1 Ensayo de activación *in vitro* con mitógenos.

La curva de activación de linfocitos con Con A, presenta un máximo de incorporación de timidina tritiada de 43,000 c.p.m. (promedio de tres determinaciones), cuando las células se cultivaron con 10 µg/ml de Con A (fig. 8), en concentraciones menores o mayores se observa un descenso en la actividad proliferativa. En base a este resultado se decidió trabajar con la concentración de 10 µg/ml de Con A para verificar la viabilidad de las células en los ensayos posteriores.

ANTICUERPOS ANTI-PORINAS

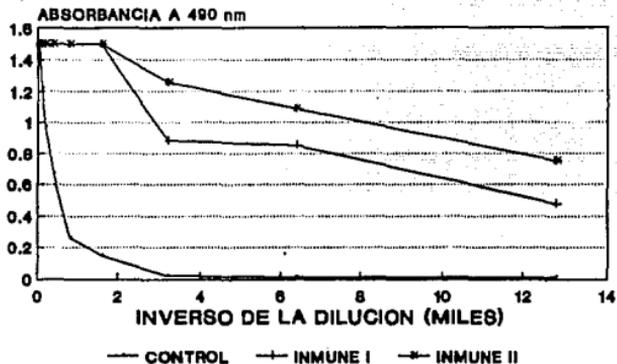


FIGURA 6. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-PORINAS.

Determinación por el método de ELISA en suero de ratones C_3 HeB/FeJ inmunizados o no con 30 μ g de porinas de *S. typhi* los días 0 y 7 y sacrificados el día 14.

ANTICUERPOS ANTI-LIPOPOLISACARIDO

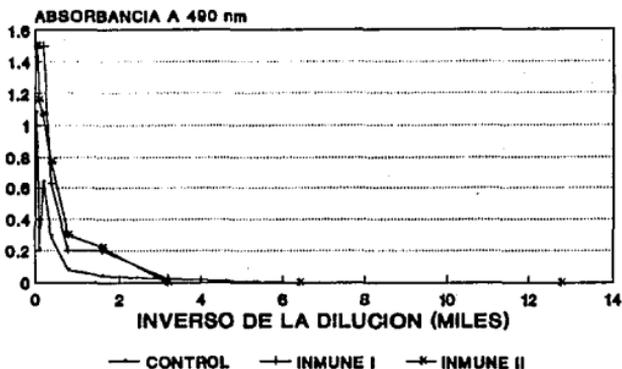


FIGURA 7. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-LPS.

Determinación por el método de ELISA en suero de ratones C_3 HeB/FeJ inmunizados o no con 30 μ g de porinas de *S. typhi* los días 0 y 7 y sacrificados el día 14.

ACTIVACION CON MITOGENOS

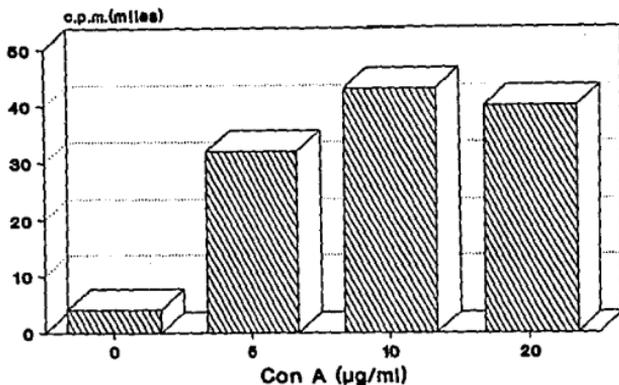


FIGURA 8. ACTIVACION DE ESPLENOCITOS TOTALES CON Con A.

Esplenocitos provenientes de ratones $C_{57}H_{e}B/FeJ$ se cultivaron en presencia de concentraciones variables de ConA. Los datos representan el promedio de tres determinaciones.

4.2.2 Ensayo de activación antígeno-específica.

Como pueda observarse en la figura 9, los esplenocitos cultivados con porinas de *S. typhi* presentaron diferencias en activación dependiendo si habían tenido o no previo contacto con el antígeno. Las células provenientes de ratones inmunizados con porinas presentaron una activación (25 000 c.p.m. de incorporación de timidina tritiada) aproximadamente 6 veces mayor a la que presentaron las células provenientes de ratones control (4 000 c.p.m.), cuando se cultivaron con 50 μ g/ml de porinas. En cambio, cuando las células se cultivaron con 25 μ g/ml de porinas la diferencia en activación resultó ser aproximadamente cuatro veces mayor. Además, las células provenientes de ratones inmunes presentaron una activación mayor al doble de la que presentaron en ausencia del antígeno.

Como control positivo se realizó una activación con 10 μ g/ml de Con A (concentración previamente establecida como óptima), con la cual se obtuvieron cuentas mayores a 12 000 c.p.m., en las células provenientes de ambos grupos de ratones tanto inmunes como control.

4.3 Ensayo de infección *in vitro*.

4.3.1 Estandarización de la relación de infección

En la figura 10 se observa que no existe diferencia en la cuenta bacteriana del control y el problema cuando se utilizó una

ACTIVACION ESPECIFICA DE LINFOCITOS

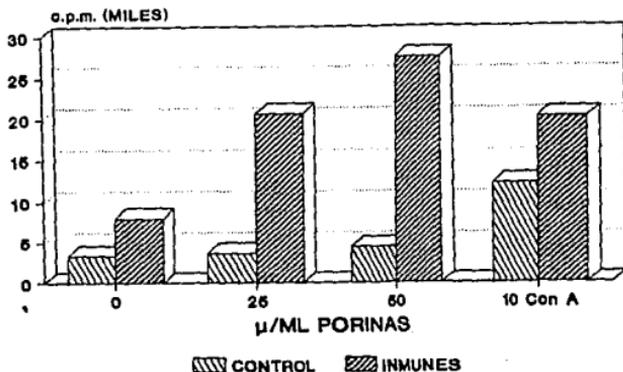
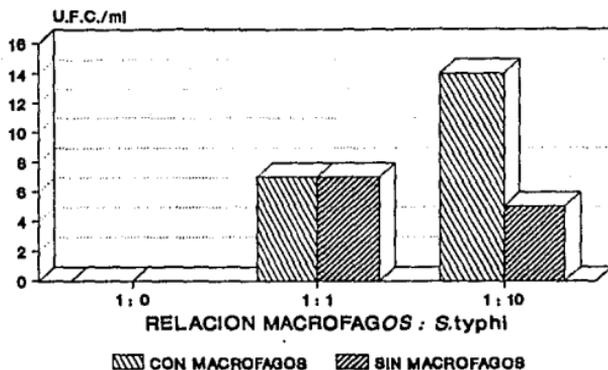


FIGURA 9. ACTIVACION ANTIGENO ESPECIFICA.

Esplenocitos provenientes de ratones C_3H_6/FeJ inmunizados o no con 30 μ g de porinas de *S. typhi*, los días 0 y 7 y sacrificados el día 14, fueron cultivados en presencia de medio de cultivo, porinas, o Con A. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones.

ENSAYO DE INFECCION



**FIGURA 10. ESTANDARIZACION DE LA RELACION DE INFECCION
(MACROFAGOS:BACTERIA)**

Macrófagos provenientes de exudado peritoneal se infectaron con *S. typhi* en diferentes relaciones. La infección se evaluó por el crecimiento bacteriano (extra e intracelular) determinado por cuenta en BHI.

relación de infección macrófagos:bacteria de 1:1. En cambio, cuando la relación utilizada fue 1:10 la cuenta bacteriana resultó ser aproximadamente 3 veces mayor en presencia de macrófagos; ya que esta relación favorece la infección se escogió para realizar los ensayos posteriores.

4.3.2 Prueba de susceptibilidad a antibióticos.

Los resultados de susceptibilidad expresados como la cantidad mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (MIC) fueron los siguientes:

ANTIBIOTICO	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
gentamicina	2
aztronam	32
cefoperazona	16
ceptacidina	32
ceptriaxona	32
carbenicilina	64

En base a estos datos se decidió trabajar con gentamicina a 10 $\mu\text{g/ml}$, ya que esta concentración al ser mayor que el MIC nos asegura la eliminación de la bacteria extracelular en el ensayo de infección *in vitro*.

4.3.3 Ensayo de infección in vitro.

Las células provenientes de ratones testigos permitieron un desarrollo bacteriano aproximadamente dos veces mayor al que se encontró en células provenientes de ratones inmunes. Este comportamiento fue general para macrófagos y esplenocitos. La figura 11 muestra un ensayo representativo, de tres ensayos repetitivos, cada una de las barras representa el promedio de tres determinaciones.

4.3.4 Porcentaje de muerte inducida.

Para determinar la eficiencia con la que se están activando los sistemas microbicidas del macrófago se determinó el porcentaje de muerte inducida, es decir, el porcentaje del total de bacteria internalizada por un macrófago normal que es eliminada por un macrófago activado por células inmunes (fig 12). Los datos obtenidos indican que la inmunización con porinas induce una respuesta de linfocitos T capaces de activar a los macrófagos de tal manera que estos eliminen alrededor de un 50% de la bacteria que los infectaría en condiciones normales.

ENSAYO DE INFECCION

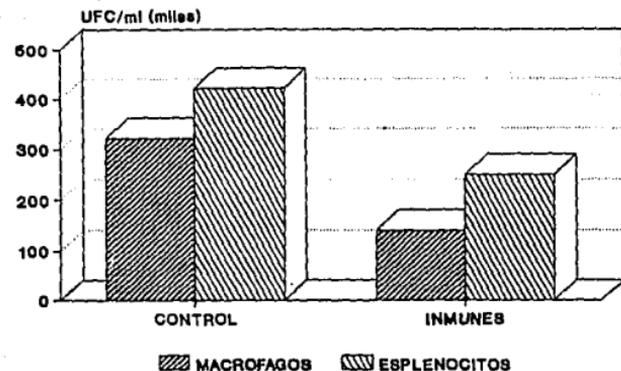


FIGURA 11. ENSAYO DE INFECCION *in vitro*.

Macrófagos y esplenocitos provenientes de ratones inmunizados o no con porinas se infectaron con *S. typhi* en una relación 1:10 (cél:s:bact). El crecimiento bacteriano intracelular se evaluó por el método de cuenta en placa. Se muestra un experimento representativo de tres ensayos.

MUERTE INDUCIDA

$$* \% MI = (\text{Cont}-\text{Inm}) / \text{Cont} \times 100$$

<u>CONTROL</u>	<u>INMUNE</u>	<u>% MI</u>
MACROFAGOS		
11,400	4,078	64
322,000	139,333	56.7
ESPLENOCITOS		
422,000	248,750	41
533.3	233.3	56
11,400	5,150	54

FIGURA 12. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE MUERTE INDUCIDA

Porcentaje del total de bacteria internaliza por un macrófago normal que es eliminada por un macrófago activado por células inmunes. Los datos mostrados son el promedio de tres determinaciones. Abreviaturas: MI: muerte inducida; CONT: crecimiento bacteriano dentro de macrófagos normales; INM: crecimiento bacteriano dentro de macrófagos inmunes.

VII. DISCUSION

Un problema importante en el estudio de la respuesta inmune en fiebre tifoidea es la falta de un modelo experimental adecuado, ya que el hombre es el hospedero específico de *Salmonella typhi*. Por lo tanto, es necesario relacionar los estudios experimentales realizados con esta bacteria en ratones, con la infección en el humano (20).

A pesar de que *S. typhi* no es el patógeno natural del ratón, se logró estandarizar un modelo de infección variando condiciones tales como: a) fase de crecimiento bacteriano (en fase logarítmica se favoreser la infección) (31); b) medio de cultivo (sin antibióticos y con complemento para favorecer la fagocitosis); c) relación de infección (1:10 macrófagos bacteria) (fig. 10) y d) concentración de antibiótico necesaria para la eliminación de la bacteria extracelular.

El modelo propuesto requiere del uso de ratones singénicos por dos razones: en primer lugar, debido a que la susceptibilidad de ratones a la infección por *Salmonella* depende en la fase temprana, del producto del gen *Ity* (33, 52, 60 y 73); y en segundo, a que la capacidad de la respuesta a las porinas es diferente según la cepa de ratón, lo cual sugiere a su vez, asociación con el sistema H-2 (39, 48).

En este trabajo se decidió utilizar la cepa de ratones singénicos C₃H₆B/FeJ (Ity^c), pues al estudiar la respuesta a porinas de seis cepas, ésta fue la que mejor respondió a la inmunidad humoral y celular (39).

La inmunización con dos dosis de 30 µg de porinas, indujo respuesta proliferativa cuando los esplenocitos de los ratones inmunes se cultivaron en presencia del antígeno (fig. 9); sin embargo, no pudimos distinguir que poblaciones estaban participando.

La respuesta inmune específica de los linfocitos B a las porinas fue alta (fig. 6), lo que sugiere la participación de éstos en los mecanismos efectores en el modelo utilizado. Por otra parte, hay que hacer notar que a pesar de que las porinas utilizadas para la inmunización están contaminadas con endotoxina, el título de anticuerpos anti-LPS fue bajo (fig. 7).

Actualmente se sabe que los anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie, tales como los anti-porina, son importantes únicamente en la fase de invasión por *Salmonella typhi*. Así, en modelos murinos se ha comprobado que la presencia de este tipo de anticuerpos permite la inactivación de *Salmonella* en las primeras horas después del reto. Esto produce un decremento en la mortalidad en los primeros días, pero no previene el crecimiento de la bacteria remanente en los días posteriores (12).

La permanencia de *Salmonella typhi* en los tejidos, se debe a que posee mecanismos de evasión que le permiten sobrevivir dentro de los macrófagos y proliferar en su interior; por lo que en una respuesta protectora, se busca la activación de linfocitos T que produzcan las citocinas necesarias para activar los sistemas microbicidas del macrófago para eliminar la bacteria intracelular. Esta activación fue evaluada en forma indirecta en un modelo de infección *in vitro* de *S. typhi* a macrófagos.

De esta manera, se encontró que macrófagos provenientes de ratones inmunizados con porinas, eliminaron la bacteria intracelular de manera más eficiente que los macrófagos provenientes de ratones control (fig. 11 y 12). Estos resultados sugieren la participación de linfocitos Th (L3T4⁺) específicos para porinas. Esto puede explicarse, a que las porinas son proteínas solubles, por lo cual, son degradadas a péptidos por la vía endocítica y presentadas en el contexto de clase II, a células inmunocompetentes (3, 77).

Los linfocitos Th son capaces de proporcionar los factores solubles que activan a los macrófagos, tales como interferón gamma, IL-4 e IL-6 (1, 25). Los dos últimos actúan también como factores estimulantes de los linfocitos B (53). Por tanto, la presencia de linfocitos Th en el modelo, puede explicar la activación y participación de los linfocitos B y los macrófagos en la fase efectora de la respuesta inmune.

Por otra parte, existe la posibilidad de que *Salmonella typhi*, al igual que otras bacterias intracelulares pueda pasar de un compartimento de la vía endocítica al citosol, donde los antígenos serían presentados en el contexto de moléculas de clase I a linfocitos Tc. Este mecanismo se lleva a cabo en *Listeria monocytogenes*, pues la bacteria posee un factor de virulencia, llamado listeriolisina, que le permite perforar la membrana del compartimento endosomal y pasar al citosol (25). En el caso de que un mecanismo similar se llevara a cabo en *S. typhi*, los linfocitos Tc participarían como células efectoras lisando las células infectadas, lo que facilitaría la fagocitosis de estas bacterias por macrófagos previamente activados, que finalmente llevarían a la eliminación de la bacteria (26).

Por otro lado, existen evidencias que apoyan la idea de que otra población de linfocitos T (gamma/delta) con poder citolítico, participan en el control de las infecciones causadas por bacterias intracelulares (4). Estas células pueden distinguirse de los linfocitos T alfa/beta en que presentan un receptor de antígeno (TCR) especial, el cual es parecido estructuralmente al TCR de los linfocitos T alfa/beta pero está codificado por un grupo de genes diferentes (63).

Poco se sabe acerca de la participación de los linfocitos T gamma delta en la respuesta inmune contra *Salmonella*, sin embargo, su localización preferencial en la mucosa epitelial sugiere que

este tipo de células sean importantes en la respuesta inmune local (4, 63).

Por los datos obtenidos en este trabajo, se sugiere la participación de cuando menos tres poblaciones celulares activadas, como consecuencia de la inmunización con porinas: linfocitos Th, macrófagos, y linfocitos B. Estos resultados no excluyen la participación de otras poblaciones celulares, tales como linfocitos Tc, linfocitos gamma/delta, células NK, etc. Estas poblaciones podrían evaluarse utilizando ensayos de citotoxicidad midiendo liberación de ^{51}Cr , lo que repercutiría en un mejor conocimiento de la respuesta inmune en fiebre tifoidea.

VIII. CONCLUSIONES.

El modelo de infección *in vitro* de *Salmonella typhi* a macrófagos murinos permite evaluar la activación de los sistemas microbicidas del macrófago, como consecuencia de la inmunización con porinas.

La inmunización de ratones C₃HeB/FeJ con dos dosis de 30 µg de porinas es capaz de inducir una respuesta en la cual participan cuando menos tres poblaciones celulares: linfocitos B, linfocitos Th y macrófagos.

La inmunización con porinas despierta en el modelo murino una respuesta específica, tanto en la fase temprana de la infección (anticuerpos anti-porinas), como en la fase tardía (macrófagos activados).

Los resultados sugieren que las porinas son un buen candidato como inmunógenos protectores, en el control de la infección por *S. typhi* en el modelo murino.

IX. BIBLIOGRAFIA.

1.- Abbas AK, Lichtman AH, y Pober JS. 1991. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company. USA. 225-243.

2.- Blanco, F., Arreguín, C., González, C.R., Paniagua, J., Pelayo, R., Muy, M., Isibasi, A. y Kumate, J. 1989. Respuesta inmune celular a antígenos de *Salmonella typhi* en humanos. VIII Congreso Nacional de Inmunología, SLP, México.

3.- Brodsky FM y Guagliardi LE. 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. Annu. Rev. Immunol. 9:707-744.

4.- Born WK, Kalataradi H, Modlin RL y O'Brien RL. 1991. The role of gamma delta T lymphocytes in infection. Curr. Opin. Immunol. 3:455-459.

5.- Buchmeier NA y Heffron F. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. Science. 248:730-732.

6.- Collins RW, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes D, Fiers W, Ault KA, Gimbrone MA Jr, y Strominger JL. 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated chain gene in human endothelial cells and

dermal fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 4917.

7.- Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S.; Wood, W.B. and McCarty, M. 1980 Tratado de Microbiología, Ed. Salvat Editores. Barcelona España. pp 783-800.

8.- Di Rienzo JM, Nakamura K, Inouye M. 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly, and functions. Ann. Rev. Biochem. 47:481-532.

9.- Engvall E. y Parlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry 8:874-879.

10.- Felix, A. y Pitt, R.M. 1951. The pathogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. J. Hyg. (Camb) 49:92-110.

11.- Fields PI, Swanson R, Haidaris C y Heffron F. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5189-5193.

12.- Finlay, B.B., y Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev. 210-230

13.- Gahring LC, Heffron F, Finlay B, y Falkow S. 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells.

Infect. Immun. 58:443-448.

14.- Galdiero F, Tufano M, Galdiero M, Masiello S, y Di Rosa M. 1990. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. Infect. Immun. 58: 3183-3186.

15.- Galdiero F, Tufano M, Sommense L, Folfore A y Tedesco F. 1984. Activation of complement system by porins extracted from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 46: 559-563.

16.-Gimbrone MA, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hebert YK, Yip YK, Leung DW, Lowe DG, Kohr WJ, Darbone WC, Bechtol KB, y Baker JB. 1989. Endothelial interleukin-8: A novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. Science. 246: 1601-1603.

17.- González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Blanco, F., Moreno, J. y Kumate, J. 1989. Cell-mediated immune response to porins from *Salmonella typhi* in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA.

18.- Groisman E, Chiao E, Lipps C, y Heffron F. 1989. *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:7077-7081.

19.- Huckstep, R.L. 1983. Typhoid fever and other *Salmonella* infections. Immunol. Today. 4-9

20.- Hohman AW. 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infect. Immun.* 22: 763-770.

21.- Isibasi A, Ortiz V, Moreno J, Paniagua J, Vargas M, González C, y Kumate J. 1988. The role of outer membrane proteins from Gram negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. Monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. En: Cañedo LE, Todd LE, Packer L y Jaz J eds. Cell function and disease. Plenum Press, N.Y., U.S.A. pp 281-292.

22.- Isibasi, A., Pelayo, R., Paniagua, J., Ortiz, V., García-Ortigoza, E. y Kumate, J. 1989. Porins from *Salmonella typhi* induce a protective status against a challenge with the bacteria in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA.

23.- Jones WG, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *S. typhimurium* with autonomous 60 megadalton plasmid. *Infect. Immun.* 38:476-486.

24.- Jones GW, Richardson LA, y Uhlman D. 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *J. Gen. Microbial.* 127:1967.

25.- Kaufmann SHE. 1991. Role of T-cell subsets in bacterial infections. *Curr. Opin in Immunol.* 3: 465-470

26.- Kaufmann SHE, Munk ME, Steinhoff U, Wand-Württenberger A, Gastrill AJ, Flesch I y Shoel B. 1989. Effector T cells in bacterial infections. En: *Progress in immunology VII. Proceedings of the 7th International Congress of immunology.* Melchers, F et al eds. Springer-Verlag, RFA. 963-970.

27.- Kussi N, Nurminen M, Saxén H, y Mäkelä PH. 1981. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparation in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.

28.- Kussi N, Nurminen M, Saxén H, Valtonen M y Mäkelä PH. 1979. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice. *Infect. Immun.* 25:857-862.

29.- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

30.- Lanzavecchia A. 1985. Antigen-specific interaction between B and T cells. *Nature* 314:530-532.

31.- Lee CA y Falkow S. 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. 87: 4304-4308.

32.- Lehrer R, Ganz T y Selsted ME. 1991. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. Cell. 64:229-230

33.- Lissner CR, Swanson RN y O'Brien AD. 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages *in vitro*. J. Immunol. 131: 3006.

34.- Liu SL, Ezaki T, Miura H, Matsui K, Yabuuchi E. 1982. Intact motility as a *S. typhi* invasion related factor. Infect. Immun. 56:1967-1973.

35.- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, y Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. 1951. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

36.- Lugtenberg B, Peters R, Bernheimer H, y Berendsen W. 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of outer membrane proteins of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 147:251-262.

37.- Mäkelä, P.H.; Hovi, M.; Saxen, H.; Valtonen, M. y Valtonen V. 1988. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. Immunology. 19: 217-222.

38.- Marrack P, Enders R, Schimonkevitz R, Zlotnik A, Dialynas D, Fitch F, y Kappler J. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. II. Role of the L3T4 product. J. Exp. Med. 158: 1077-1091.

39.- Mejía MV. 1990. Susceptibilidad de cepas singénicas murinas a porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM.

40.- Miller S, Kukral A, y Mekalanos J. 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5054-5058.

41.- Miyajima A, Schoichoiro M, Scheurs J, De Vries J, Arai N, Yokota T, y Arai K. 1988. Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by cell-derived lymphokines. FASEB J. 2:2462-2473.

42.- Mosmann TR, y Coffman RL. 1989. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173.

43.- Mosmann TR y Moore KW. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. Immunol. Today. 49-52.

44.- Murphy JR, Wasserman SS, Baqar S, Schlesinger L, Ferreccio C, Eindberg AA, y Levine MM. 1989. Immunity to *Salmonella*

typhi considerations relevant to measurement of cellular immunity in typhoid-endemic regions. J. Exp. Immunol. 75: 228-233.

45.- Nabholz M, y MacDonald HR. 1983. Cytolytic T lymphocytes. Ann. Rev. Immunol. 1:273-306.

46.- Nakae T. 1976. Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces tranmembrane channels. J. Biol. Chem. 251:2176-2178.

47.- Nakae T, Ishii J. 1978. Transmembrane permeability channels in vesicles reconstituted from single species of porins from *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 133:1412-1418.

48.- Nauciel C, Ronco E, y Marika P. 1990. Influence of different regions of the H-2 complex on the rate of clearance of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 58:573-574.

49.- Nikaido H. y Nakae T. 1979. The outer membrane of Gram negative bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 20:163-250.

50.- Nikaido H y Vaara M. 1987. Outer Membrane. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and molecular biology. Neidhardt FC, editor. ed. American society for microbiology. Washington, D.C. 7-22

51.- Nnalue NA, y Lindberg AA. 1990. *Salmonella choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parenteral inoculation but are avirulent by oral administration. Infect. Immun. 58: 2493-2501.

52.- O'Brien AD. 1986. Innate resistance of mice to *Salmonella* infection. Infect. Immun. 38:948-952.

53.- O'Garra, A. 1989. Peptide regulatory factors. Interleukins and the immune system 2. Lancet 333: 1003-1005.

54.- Ortaldo JR y Heberman RB. 1984. Heterogeneity of natural killer cells. Ann. Rev. Immunol. 2: 359-394.

55.- Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia-Ortigoza, E. y Kumate, J. 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: 1640-1645.

56.- Osborn MJ, y Wu H. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34: 369-422.

57.- Osborn MJ, Gander JE, Parisi E y Carson J. 1972. Mechanism and assembly of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane.

J. Biol. Chem. 247: 3962-3927.

58.- Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., González, C., García, J.A., Islas, S. y Kumata, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. Arch. Invest. Med. (Mex.) 20: 315-320.

59.- Paul C, Shalala K, Warrern R y Smith R. 1985. Adoptive transfer of murine host protection to salmonellosis with T-cell growth factor-dependent, *Salmonella*-especific T-cell lines. Infect. Immun. 48: 40-43.

60.- Plant J y Glynn AA. 1979. Locating *Salmonella* resistance gene on mouse chromosome 1. Clin. Exp. Immunol. 37: 1-6.

61.- Peters P, Jacques JN, Oorschot V, Ploegh HP y Geuze HJ. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. Nature. 349: 669-676.

62.- Rachel R, Engel AM, Huber R, Stetter K y Baumeister W. 1990. A porin-type protein is the main constituent of the cell envelope of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima*. FEBS. 262: 64-68.

63.- Raulet, DH. 1989. The structure, function and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. Annu. Rev. Immunol. 7: 175-207.

64.- Revel M y Chebath AA. 1979. Interferon-activated genes. TIBS. 11: 166-170.

65.- Romagnani S. 1991. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunol. Today. 12: 256-257.

66.- Sadegh-Nasseri, S. y Germain, R.N. 1991. A role for peptide in determining MHC class II structure. Nature. 353: 167-169.

67.- Schnaitman CA. 1971. Effect of ethylenediamine tetracetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 108: 553-563.

68.- Schreiber RD, Hicks LJ, Celada A, Buchmeier NA, y Gray PW. 1985. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. J. Immunol. 134: 1609-1618.

69.- Smith, CJ. 1985. Immunology of outer membrane proteins of Gram negative bacteria. En: Immunology of the bacterial cell

envelope. Stewart-Tull, D.E.S. y Davis, M. eds. John Wiley & Sons. Chichester, USA.

70.- Smith KA. 1988. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science*. 240: 1169-1176.

71.- Springer TA. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346:425-434.

72.- Drutz DJ y Mills J. Inmunidad e infeccion. En: Stites DP, Stobo JD, y Funderberg HH. 1985. *Inmunologia Clinica Básica.*, Ed. El Manual Moderno. México. pp 201-214.

73.- Tagliabue A, Nencioni L, Villa L y Boraschi D. 1984. Genetic control of *in vivo* natural cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by intestinal and splenic lymphoid cell in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 56: 531-536.

74.- Takeda S, Gillis S y Palacios R. 1989 *In vitro* effects of recombinant interleukin 7 on growth and differentiation of bone marrow pro-B and pro-T lymphocyte clones and fetal thymocyte clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1634-1638.

75.- Towbin HT, Staehlin T, Gordon J. 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.A. 76:4350-4354.

76.- Tufano M, Ianniello R, Galdiero M, De Martino L, y Galdiero F. 1989. Effect of *Salmonella typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. Microb. Pathogen. 7: 337-342.

77.- Unanue ER y Allen PM. The basis for immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. 1987. Science. 236: 551-557.

78.- Yewdell JW y Bennink JR. 1990. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. Cell. 62: 203-206.