



11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“ RESPUESTA DE LINFOCITOS T
CITOTOXICOS CONTRA LA PORINA
OmpC DE Salmonella typhi ”

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

I N M U N O L O G I A

P R E S E N T A :

QFB. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS

MEXICO, D. F.

OCTUBRE 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional s. XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. Vianney Ortiz Navarrete.

DEDICATORIA.

A mis padres María Yolanda Macías y Constantino López.

A mi hermano Ricardo.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial al Dr. Armando Isibasi, a María Teresa, María Elena y Alejandra, por su apoyo y amistad.

Al Dr. Vianney Ortiz por su dirección, ayuda y compromiso académicos.

Al Dr. César González por su asesoría y por enseñarme el trabajo de ingeniería genética.

Al Dr. Jorge Paniagua, por su apoyo y amistad.

Al Dr. Guillermo Ramírez por sus recomendaciones.

De manera especial a Laura Bonifaz y a Natalia Martín por su amistad, sus consejos y apoyo.

Al Dr. Jorge González por su amistad y asistencia médica.

Al Dr. Miguel Cruz por su cooperación y recomendaciones.

A los compañeros y amigos del laboratorio: Manuel, Marco, Araceli, Sara, Mario, Rebeca, Paty, María del Carmen, José Luis, Rosa María, Carmen Montaña, María Aurelia, Dr. Antonio Ramírez, Elizabeth por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos.

Al Dr. Fernando Noriega por su hospitalidad y consejos durante mi entrenamiento en Baltimore, y por los primers y reactivos que nos ha enviado.

A la Dra. Rosenda Peñalosa de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana por su asesoría para realizar las primeras amplificaciones de DNA.

A mis amigos: Francisco, Aura, Andrea, Carlos, Paty, Fernando, Linda, Louise, Adriana, por todos los momentos que hemos compartido.

CONTENIDO:

O. RESUMEN

I. INTRODUCCION

a) Generalidades	1
b) Mecanismos de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	1
c) Respuesta Inmune en contra de <i>Salmonella</i>	4
d) Planteamiento del problema	7

II. OBJETIVOS	8
-------------------------	---

III. MATERIALES Y METODOS	8
-------------------------------------	---

IV. RESULTADOS	17
--------------------------	----

V. DISCUSION	29
------------------------	----

VI. CONCLUSIONES	32
----------------------------	----

VII. BIBLIOGRAFIA	34
-----------------------------	----

O. RESUMEN

En la respuesta inmune contra *Salmonella* participan tanto la rama efectora humoral como la celular. Los ratones infectados con dosis subletales de *S. typhimurium* desarrollan una inmunidad específica mediada por linfocitos T CD4⁺, los cuales son importantes para el control de la infección, mientras que no se conoce el papel de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺. Diversos estudios se han desarrollado para buscar los antígenos de *Salmonella* que son reconocidos por el sistema inmune, con el fin de desarrollar una vacuna que prevenga las enfermedades que causan estas bacterias, uno de estos antígenos es la porina OmpC, la cual es una proteína de la membrana externa de la *Salmonella*, que administrada junto con otra porina aún no identificada, protege de la muerte a ratones inmunizados hasta con 500 DL₅₀; además estas proteínas despiertan una respuesta de anticuerpos IgG en individuos convalescientes de tifoidea, mientras que en pacientes con la enfermedad, activan a linfocitos CD4⁺, sin embargo no se conoce si estas proteínas activan la respuesta citotóxica.

Con el fin de estudiar la respuesta citotóxica en la infección causada por *Salmonella*, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad en donde se utilizaron células P815 (mastocitoma de ratón) capaces de expresar a la porina OmpC de *S. typhi*. Para conseguir esto, el gen de la porina OmpC fue amplificado con y sin la secuencia líder a través de PCR, los productos se clonaron en el vector de expresión pFM92.1, y los plásmidos resultantes (pIQCLM1 y pIQCLM3) se utilizaron para transfectar a las células P815. La expresión del de la porina, así como localización fueron evaluados por inmunofluorescencia. La porina OmpC fue localizada en el citoplasma de las células, por lo cual son potencialmente susceptibles al procesamiento enzimático y a la presentación en el contexto de moléculas clase I del MHC. Las células capaces de producir a la porina se utilizaron como blancos de esplenocitos de ratones infectados subletalmente con *S. typhimurium* o inmunizados con *S. typhi* CVD908gp63. Los resultados obtenidos nos demuestran que los ratones infectados con *Salmonella*, así como los inmunizados con estas bacterias, desarrollan linfocitos citotóxicos contra antígenos propios de la bacteria, y además que uno de los antígenos reconocidos es la porina OmpC.

I. INTRODUCCION.

a) Generalidades:

El género *Salmonella* comprende más de 2000 serotipos los cuales se agrupan en tres especies *S. choleraesuis* (con sólo un organismo), *S. typhi* (constituido sólo por el bacilo de la tifoidea humana) y *S. enteritidis* (a la cual pertenecen los demás serotipos). Las *salmonellas* se pueden clasificar a través de la identificación serológica de los antígenos de superficie que presentan, como lo son: el antígeno somático (O), el flegelar (H), y el capsular (Vi). *S. choleraesuis* y *S. typhi* son microorganismos muy adaptados al cerdo y al hombre, respectivamente; sin embargo, ambos son capaces de infectar al ser humano. *S. enteritidis* incluye serotipos adaptados y no adaptados al hospedero siendo estos últimos los causantes de la infección sistémica de muchos animales y de la diarrea en el hombre (1), en el caso de la *salmonellas* adaptadas al hospedero tenemos como ejemplos a *S. typhimurium* que causa la tifoidea del ratón, mientras que *S. gallinarum* y *S. pollorum* causan la tifoidea aviar. En el humano, las *salmonellas* no *typhi* son capaces de generar enfermedades invasivas en individuos muy jóvenes y en los de edad avanzada, así como en personas inmunosuprimidas. Los portadores asintomáticos de *S. typhi* son el reservorio de la fiebre tifoidea humana mientras que los portadores de otros serotipos de *Salmonella*, son los que ocasionan las gastroenteritis a través de la contaminación de los alimentos (2).

b) Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella*:

Encuentro:

Las *salmonellas* ingresan al organismo a por medio de la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados. Una vez que las *salmonellas* han pasado por el estómago, entran al intestino en donde se encuentran con los enterocitos (3).

Entrada:

Al entrar en contacto las *salmonellas* y el enterocito se establece un diálogo molecular mediado por moléculas de la superficie bacteriana y por receptores de la célula, lo cual provoca que el enterocito, aunque no es una célula fagocítica, internalice a la bacteria. Este proceso involucra la activación de la síntesis de proteínas

FALLA DE ORIGEN

en el microorganismo (4) mientras que en la célula se desencadena la formación de apéndices denominados "Ruffles" que envuelven a las *salmonellas* (5). La formación de los "ruffles" va acompañada de la fosforilación de la "proteína-tirosina cinasa activada por mitógenos" (MAPK) (6), con la subsecuente internalización de la bacteria y la formación de vacuolas asociadas a membrana (7) (que se han descrito como macropinosomas que no requieren microtúbulos) (8). Estos cambios de la membrana se parecen a los que se producen cuando hay contacto entre los factores de crecimiento y sus correspondientes receptores. Actualmente existe controversia sobre si las *salmonellas* entran o no a las células epiteliales a través de la estimulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (5,6,9).

En respuesta al contacto de la bacteria con la célula epitelial, los leucocitos polimorfonucleares son atraídos a la zona basolateral de la superficie luminal del epitelio intestinal. Aquí la secreción de cloro y agua no se encuentra alterada, lo cual sugiere que la gastroenteritis que se observa durante la infección bacteriana, es causada por la estimulación y liberación de factores de los neutrófilos más que por la secreción de fluidos por parte de las células epiteliales (10).

Las vacuolas que contienen a las *salmonellas* migran en dirección apico-basal dentro de la célula epitelial, sin que exista multiplicación de la bacteria. Una vez que la vacuola llega a la zona basal de la célula, el microorganismo es liberado a la lamina propia (3).

Diseminación y Multiplicación:

Después de cruzar la barrera intestinal la diseminación del microorganismo va a depender de su capacidad para invadir y sobrevivir dentro de los macrófagos. Las *salmonellas* entran a los macrófagos a través de la inducción de los "ruffles" y de la macropinocitosis, una vez dentro de la célula, se localiza en el denominado fagosoma gigante (FG), el cual no es ácido y es capaz de fusionarse con otros macropinosomas manteniendo a estas vacuolas con un gran volumen y con la bacteria en el interior por lo menos 45 minutos (11). Se tienen evidencias de que la formación los FG correlaciona con la capacidad invasora y los factores de virulencia de las *salmonellas*, y además de que hay factores genéticos del macrófago que activan la formación de dichos fagosomas en respuesta a la infección bacteriana. Esto se debe a que los macrófagos obtenidos de ratones DBA y CD1 (que son congénitamente resistentes a la infección por *S.typhimurium*) no producen FG cuando son infectados con dicha

bacteria, mientras que los macrófagos de ratones susceptibles a *S. typhimurium* si producen FG, así mismo, cuando estos macrófagos son infectados con *S. pollorum* y *S. typhimurium* mutante de *PhoP* (avirulenta), disminuye la formación de los fagosomas gigantes (12,17).

Factores de virulencia bacterianos:

Los genes *spaL*, *spaM*, *spaN*, *spaO*, *spaP*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *spaT*, han sido identificados como parte esencial para que las *salmonellas* sean capaces de entrar a la célula, estos genes están situados entre los minutos 59 y 60 del cromosoma de la bacteria, en la región denominada "*spa*" (antígenos que se encuentran en la superficie), entre las regiones *inv* y *hil*, estos genes codifican para unas proteínas similares a las codificadas por el plásmido de virulencia de *Shigella* y *Yersinia spp.* (13). Además recientemente se ha identificado un gene que codifica para un factor hemolítico importante en la virulencia y sobrevivencia de las *salmonellas* dentro del macrófago del ratón (14, 15).

Estudios recientes indican que el sistema *PhoP-PhoQ* regula la transcripción de genes que codifican para proteínas importantes en la invasión, sobrevivencia intracelular y virulencia de las *salmonellas*. Los genes reprimidos por *PhoP*, que son alrededor de veinte, son fundamentales para que *S. typhimurium* invada las células epiteliales (16) e induzca la macropinocitosis en los macrófagos, y forme el FG (11).

El pH del fagosoma es una de las señales más importantes que inducen la expresión de los genes de virulencia de las *salmonellas*. Una vez dentro del fagosoma gigante *S. typhimurium* retarda y atenúa la acidificación de la vacuola (17). La acidificación vacuolar ocurre entre las 4 y 5 h después de la entrada de la bacteria y se encuentra asociado con la transcripción de los genes activados por *PhoP*, así las *salmonellas* pueden generar una respuesta ante el estrés generado por los radicales de oxígeno producidos en el fagosoma del macrófago (18).

Existe un plásmido de virulencia de *Salmonella* el cual se encuentra en casi todas las *salmonellas* no *typhi*, este plásmido es importante para la patogénesis de la tifoidea en los animales y la bacteremia en los humanos. En el ratón la presencia del plásmido de virulencia de 80 Kb le confiere a *S. typhimurium* la capacidad de incrementar su crecimiento, mas no su sobrevivencia intracelular, al momento que viaja a otros tejidos (19). Una región muy conservada de 6.2 Kb de dicho plásmido codifica para cinco genes de virulencia *spv*, los cuales están regulados de manera coordinada (20).

c) Respuesta inmune en contra de *Salmonella*:

El macrófago lleva a las *salmonellas* al sistema linfático en donde se inicia la respuesta del hospedero. La respuesta inmune tanto humoral como celular es requerida en su totalidad para tener una protección ante la infección por *Salmonella* (22).

La respuesta inmune que se genera en contra de *Salmonella* ha sido estudiada en los ratones, tanto resistentes como susceptibles a la infección por *Salmonella typhimurium* (21,22,23). Los ratones que expresan el alelo *Ity'* pueden sobrevivir a las primeras fases de la salmonelosis, mientras que los ratones susceptibles (*Ity'*) son incapaces de controlar la multiplicación temprana de las *salmonellas* dentro de los macrófagos, y mueren rápidamente por la enfermedad (38,39). Entre los ratones tanto resistentes como sensibles no existe diferencia en cuanto a la capacidad de sus macrófagos para fagocitar a la bacteria, sin embargo, en los ratones susceptibles la *S. typhimurium* crece de mejor manera (37). Recientemente se ha identificado un gen dentro del cromosoma 1 del ratón candidato para ser el responsable de generar el fenotipo *Ity'*, al cual se le ha denominado *Nramp*, el producto de este gen es una proteína integral de membrana que estructuralmente tiene homología con la proteína *crn A* de *Aspergillus nidulans*, por lo cual, se ha propuesto que la *Nramp* puede transportar los nitritos y nitratos generados en el citosol de la célula al interior de las vacuolas endosomales (21).

Respuesta inmune humoral: Los estudios realizados para evaluar la respuesta humoral han mostrado que éste es un mecanismo efectivo para controlar la infección (28-30).

Respuesta inmune celular: En el caso de la respuesta mediada por células, se ha estudiado la participación de las diferentes poblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$ ($CD4^+$ y $CD8^+$) y $\gamma\delta$ así como de los factores solubles que estas producen y la influencia de estos factores en la actividad microbicida del macrófago.

Linfocitos T $\gamma\delta$: En el caso de la infección causada por *S. choleraesuis* en ratones *Ity'* se ha observado que hay mayor reclutamiento de linfocitos T $\gamma\delta$ que en ratones *Ity'*, estos linfocitos pudieran estar involucrados en el control de la infección (23).

Linfocitos T $CD4^+$: Los linfocitos T $\alpha\beta$ $CD4^+$ participan en la activación de los macrófagos, en la estimulación para la producción de anticuerpos y en la inducción de hipersensibilidad retardada observada en los animales infectados con *Salmonella* (31-34). También se ha reportado que la eliminación tanto de linfocitos T $CD4^+$ como

de los CD8⁺ en ratones C57BL/6 provoca el incremento de la translocación de microorganismos de la flora intestinal así como de *S. typhimurium* a los ganglios linfáticos mesentéricos (35). En el hígado se ha observado que la población de linfocitos T que se diferencia dentro de este órgano (linfocitos T $\alpha\beta$ extra-tímicos) participa en la protección en estadios tempranos de la infección causada por *Salmonella* (36).

Linfocinas: El papel de algunas citocinas como el interferón- γ (INF- γ), y el factor de necrosis tumoral (TNF), ha sido evaluado en la inmunidad contra *Salmonella*.

La neutralización del TNF a través de anticuerpos específicos, provoca que los ratones sean más susceptibles a la infección por *salmonellas* tanto virulentas como atenuadas (51). En ratones inmunizados con *Salmonella* atenuada así como en los no inmunizados, el INF- γ restringe el crecimiento de la bacteria dentro de los macrófagos durante la primera semana de infección, sin embargo, no se le atribuye la eliminación de la bacteria del bazo, hígado y ganglios linfáticos (27). Así mismo, en otros reportes se menciona que la incubación de macrófagos con INF- γ , incrementa la capacidad bactericida de estos desde las primeras 12 h, mientras que el incremento en la generación de radicales del oxígeno, se presenta hasta las 48 h (52).

Papel de los linfocitos T CD8⁺: En los ratones la inducción de la respuesta inmune citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺, ha sido demostrada contra antígenos expresados por *salmonellas* modificadas genéticamente, así tenemos que la inmunización con una cepa de *S. typhimurium* que expresa la proteína circunsporozoítica (CS) de *P. berghei* (41), o bien, con la que expresa la CS de *P. yoelii* (40), genera citotoxicidad dirigida contra la proteína recombinante. En humanos la vacunación con *S. typhi* CVD908-CSP genera una respuesta citotóxica contra la proteína circunsporozoítica de *P. falciparum* (CSP) (43). La actividad citotóxica es desencadenada debido a que el macrófago fagocita a la *Salmonella*, procesa los antígenos de ésta y presenta los péptidos producto del procesamiento a través de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC I). El mecanismo por medio del cual se lleva a cabo este fenómeno no se conoce aún, sin embargo, para el caso del macrófago, se han propuesto algunas vías (24,62,78,81). En otros casos, como el de las células epiteliales, aunque son capaces de fagocitar a la bacteria, no se ha podido demostrar que puedan procesar y presentar los antígenos de la *Salmonella* (42,44). En los estudios antes mencionados la respuesta citotóxica evaluada fue contra el antígeno recombinante que es expresado por la bacteria, sin

embargo, en trabajos más recientes se ha reportado que la infección causada por una cepa virulenta de *S. typhimurium* es capaz de estimular células Lyt-2⁺ (CD8⁺) de cavidad peritoneal y de bazo (45) y que los linfocitos Lyt-2⁺ de bazo, extraídos después de una segunda inmunización con *Salmonella*, y reestimulados con concanavalina A, son capaces de mediar la citotoxicidad lectina dependiente y la citotoxicidad sobre células P815 infectadas con *Salmonella* (46). Estos resultados indican que hay presentación de los antígenos bacterianos a través de las moléculas clase I del MHC; sin embargo, hasta el momento no se conoce cuales son estos antígenos, así como tampoco se conoce el papel que juegan los linfocitos T CD8⁺ y la respuesta citotóxica en la infección causada por *Salmonella*.

En la búsqueda de los antígenos involucrados en la respuesta inmune contra *Salmonella* se han analizado algunos de los componentes de la membrana externa como lo son el lipopolisacárido (LPS) y las porinas. En el caso de *S. typhimurium* se ha reportado que una mezcla de proteínas de la membrana externa (PME), o bien con porinas purificadas, son capaces de inducir un estado inmune protector en los ratones (47,49). El LPS induce protección mediante el desarrollo de una respuesta de anticuerpos, y aumentando la respuesta celular dirigida contra las porinas (25). La inoculación de porinas de *S. typhimurium*, en el cojínete plantar de ratones inmunizados con dosis subletales de la misma bacteria, son capaces de generar una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) (48), la cual se considera una manifestación *in vivo* de la inmunidad celular. Algunos autores consideran que hay una correlación directa entre inmunidad protectora y el desarrollo de la DTH, sin embargo, en otros trabajos se ha encontrado que no en todos los casos hay correlación entre estos dos fenómenos (48), e inclusive se ha reportado que hay protección en ausencia de DTH (33). Por otro lado en humanos el LPS y las porinas inducen la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 α (IL-1 α) e interleucina 6 (IL-6) por monocitos, e interleucina 4 (IL-4) e interferón- γ (INF γ), de manera dosis dependiente, por linfocitos (26).

En el caso de *Salmonella typhi* las investigaciones se han encaminado en la búsqueda de antígenos que puedan usarse como vacuna contra la fiebre tifoidea, en este sentido se ha encontrado que tanto las PME de *S. typhi* (53), las porinas purificadas (54), así como la OmpC recombinante (55), inducen un estado inmune protector en ratones. En la protección observada está involucrada la respuesta de anticuerpos, ya que el suero hiperinmune de conejo anti-PME protege pasivamente a

ratones (53) al igual que los anticuerpos monoclonales anti-porinas (56) mientras que los anticuerpos monoclonales anti-LPS no tienen ningún efecto (57). En el humano se ha encontrado que los pacientes convalescientes de fiebre tifoidea producen IgG contra las porinas de *S. typhi* (58). Por otro lado, las porinas también inducen inmunidad mediada por células, ya que activan específicamente linfocitos T en humanos y ratones (59,60) y promueven activación de macrófagos (61). Debido a los resultados mencionados se considera que las porinas de *S. typhi* son un candidato para vacuna contra la tifoidea.

Del estudio de la respuesta inmune contra *Salmonella* se puede concluir que existe un efecto sinérgico entre la actividad del macrófago, los anticuerpos y los linfocitos T en el control de la infección, sin embargo, en ninguno de los trabajos anteriormente mencionados ha quedado totalmente dilucidado el papel de cada uno de los componentes de la respuesta celular en la infección causada por *Salmonella*; en especial el papel de los linfocitos T CD8⁺ es el menos claro, sin embargo, es evidente que participan contra infecciones de bacterias intracelulares como es el caso de *Listeria*, *Mycobacterium*, *Chlamydia* y *Brucella* (82), así mismo, se desconoce cuál es el antígeno o los antígenos capaces de inducir la respuesta citotóxica.

d) Planteamiento del problema:

La respuesta inmune protectora contra *Salmonella* requiere de la participación tanto de la rama efectora humoral como de la celular. En este sentido tanto los anticuerpos y los linfocitos T CD4⁺ así como algunas linfocinas están involucrados en el establecimiento de dicha respuesta. La protección puede ser inducida a través de la inmunización con algunos antígenos de la bacteria como las PME, en particular, se ha demostrado que las porinas tanto de *S. typhimurium* como las de *S. typhi* inducen una respuesta protectora mediada por anticuerpos y/o linfocitos T CD4⁺. Por otra parte existen evidencias indirectas de la participación de linfocitos T CD8⁺ durante la infección de *Salmonella*, sin embargo, hasta el momento se desconoce cuáles son los antígenos de la *Salmonella* capaces de activar a estos linfocitos, por lo tanto es importante conocer si los antígenos que inducen respuesta protectora (como es el caso de las porinas), son capaces de inducir también una respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺.

II. OBJETIVOS:

General: Determinar si la porina OmpC de *Salmonella* es un antígeno involucrado en el desarrollo de la respuesta de linfocitos T citotóxicos.

Particulares:

- 1.- Obtención del gen de la porina ompC.
- 2.- Clonación en vectores de expresión los genes de la porina obtenidos.
- 3.- Transfección de células eucariotes con los plásmidos construidos.
- 4.- Determinación de la respuesta de células T citotóxicas con ratones infectados y/o inmunizados con *Salmonella*.

III. MATERIALES Y METODOS:

Obtención del gen de la porina ompC con secuencia líder (L-ompC) y sin secuencia líder (ompC): El gen de la porina Omp C de *S. typhi* fue obtenido a través de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) con y sin su secuencia líder, a partir del plásmido pST13 (65). Se diseñaron tres (Donados por el Dr. Fernando Noriega, Center for Vaccine Development, University of Maryland at Baltimore, MD. USA) iniciadores con base en la secuencia del gen (66): el iniciador 72 (CGGG AAGCTT AGGAG TAATTAAA ATG GATATC GTC GAA ATT TAT AAT AAA GAC GGC AAC AAA), en el cual se incluyó un sitio HindIII, un sitio de unión a ribosoma (SUR), un codón de iniciación (CI), y la parte amino terminal de la secuencia madura (sin líder) de la OmpC ; el iniciador 73 (CCGGG GAATTC AGGAG TAATTAAA ATG AAA GTT AAA GTA CTG TCC) en el cual se incluyó un sitio EcoRI, un SUR, un CI y la parte amino-terminal incluyendo la secuencia líder de la OmpC; y el iniciador reverso fue el 74 (CGGG GGATCC TTA GAATTC GAA CTG GTA AAC CAG ACC CAG), en el cual se incluyó un sitio BamHI y un codón de terminación. La reacción se llevó a cabo como continuación se describe:

Los siguientes reactivos se mezclaron en tubos especiales para termociclador: 100 ng de DNA template (pST13), 48 pg de cada uno de los iniciadores 72 ó 73 y 74, 0.2 mM de la mezcla de desoxinucleótidos, 1.3 nM de $MgCl_2$, 0.16 U de Taq DNA polimerasa, 15 μ l de Buffer para la Taq, agua c.b.p. 100 μ l. la reacción se desarrolló en un termociclador (Perkin-Elmer 9600) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de

inicio con calentamiento a 94°C-3 min, 35°C-2 min, 72°C-2 min. 23 ciclos de amplificación de 1 min a 94°C, 40°C-1 min, 72°C-1 min. 1 ciclo de término con 94°C-1min, 40°C-1min, 72°C-4min. Los productos de la reacción se precipitaron con un volumen de acetato de amonio 7.5 M y dos volúmenes y medio de etanol absoluto durante toda la noche a -70°C, la presencia de los productos fue evaluada a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa (Gibco-BRL) al 1% en buffer TAE (Tris-acetatos-EDTA: 40 mM de Tris base en ácido acético glacial, 1 mM de EDTA, pH = 8.0), el corrimiento se realizó a 77 V, durante 45 min.

Obtención de los vectores de expresión: El gen de la porina fue clonado bajo el promotor de β -actina con y sin la secuencia líder en el plásmido pFM92.1 (67).

Clonación del gen de la porina OmpC (ompC) sin secuencia líder en el plásmido pFM92.1: El producto de PCR ompC, así como el plásmido pFM92.1 se sometieron a digestión con las enzimas de restricción Hind III y Bam HI. Los productos de reacción se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente; las bandas correspondientes a los productos de la digestión fueron cortadas y el DNA fue separado de la agarosa por medio de la técnica de Gene-clean (que se describe posteriormente en el texto). 750 ng de ompC digerido, se mezcló con 250 ng del plásmido cortado y se unieron de acuerdo con el método que se describe posteriormente en el texto. 5 μ l del producto de la ligación se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* DH10B (Gibco-BRL). La transformación se realizó por medio del método de cloruro de calcio (Se describe posteriormente en el texto). Las bacterias transformadas fueron cultivadas en cajas con agar Luria (1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.05% de NaCl, 1.5% de agar pH = 7.0) suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina, las colonias resistentes fueron crecidas en 3ml de caldo Luria (misma formulación del medio Luria sólo que sin agar) con ampicilina durante 8h, a 37°C. Las bacterias fueron cosechadas y lavadas con solución salina isotónica, el sedimento bacteriano se sometió a la extracción de DNA por medio de la técnica de miniprep. El DNA obtenido en la miniprep se sometió al análisis con las enzimas de restricción Hind III y Bam HI, Eco RV y NdeI para corroborar la presencia e identidad del plásmido construido.

Clonación del gen de la porina OmpC (L-ompC) con secuencia líder en el plásmido pJRD184: El gen L-ompC obtenido por medio de PCR se sometió a la digestión con la enzima Bam H1, los productos de reacción fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa. El gen de ompC se purificó por medio de gene clean. Por otra parte el plásmido pJRD184 (Donado por el Center for Vaccine Development, Baltimore USA) fue digerido con las enzimas Eco RV y Bam H1, los productos de reacción fueron tratados de la misma forma que el gen de ompC. 750 ng del gen de la porina cortado con la enzima fueron ligados a 250 ng del plásmido digerido utilizando las condiciones anteriormente descritas. Con 5 μ l de la mezcla de ligación se transformó la cepa *E. coli* DH5 α FIQ. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio Luria con 50 μ g/ml de ampicilina y la búsqueda del plásmido construido se realizó por medio de mini-prep de las colonias bacterianas que fueron aisladas. La identificación del plásmido se hizo utilizando las enzimas de restricción Hind III, Bam H1 y Eco RI. Una vez identificadas, las colonias positivas se crecieron en 500 ml de caldo Luria con ampicilina y se extrajo el DNA plasmídico por medio de la técnica de midi-prep (que se describe más adelante).

Clonación del gen del gen L-ompC en el plásmido pFM92.1: El DNA plasmídico de la midi-prep del plásmido pJRD184-L-ompC, fue digerido con las enzimas Hind III y Bam H1. De esta mezcla de ligación se separó el producto de 1.4 kb (en el cual va el gen de la porina con secuencia líder) por medio de electroforesis en gel de agarosa; el fragmento se purificó por gen-clean. Por otro lado el plásmido pFM92.1 fue digerido con las enzimas Hind III y Bam H1, y los productos se separaron por electroforesis, así el producto de 10 Kb fue purificado por gen-clean.

250 ng del pFM92.1 se ligaron con 750 ng del fragmento de 1.4 Kb (en donde se encuentra el gen L-ompC). Con 5 μ l de la mezcla de ligación se transformó la cepa *E. coli* DH10B. Las bacterias se seleccionaron en agar Luria con ampicilina y la búsqueda del gen se realizó por medio de la técnica de mini-prep. Las colonias que contenían el vector construido fueron seleccionadas para extraer el plásmido en grandes cantidades por medio de la técnica de midi-prep.

Técnica de ligación de DNA: En proporción de 3:1 se mezclaron el inserto y el vector con 1 U de T4 DNA ligasa (Gibco) y 2 μ l del amortiguador de la enzima (5X) ajustando a un volumen final de 20 μ l. La mezcla se colocó a una temperatura de 15°C durante toda la noche.

Transformación de bacterias con DNA plasmídico por el método de cloruro de calcio:

a) **Preparación de células competentes:** Se picó una colonia de la cepa bacteriana (*E. coli* DH10B, MC1061/P3, DH5 α FIQ) y se cultivó a 37°C y 200 rpm durante toda la noche en 30 ml de caldo Luria, al día siguiente se tomó 1 ml del cultivo y se colocó en 200 ml de caldo Luria, se incubó a 37°C y 200 rpm hasta que la densidad óptica (DO) del medio medida a 600 nm alcanzó un valor de 0.6, después se adicionaron 600 ml de caldo Luria precalentado a 37°C y se incubó durante 15 min 200 rpm y 37°C. Las bacterias se centrifugaron 8 min a 5,000 rpm, el sedimento se resuspendió en 250 ml de 0.1 M de CaCl₂, se incubó durante 2 h a 0°C, la suspensión se centrifugó 8 min a 0°C y 5,000 rpm; el sedimento se resuspendió en 5 ml de 0.1M de CaCl₂ y 10% de glicerol a 0°C y se hicieron alícuotas de 100 μ l en tubos eppendorf estériles previamente enfriados a -20°C. Las alícuotas se guardaron a -70°C.

b) **Transformación de las células competentes:** Tres alícuotas de células competentes se colocaron en hielo durante 5 min, después se les adicionó el DNA de la siguiente manera: a la primera 5 μ l de la mezcla de ligación, a la segunda 2 μ l del vector digerido con enzimas de restricción (control negativo) y a la tercera 250 ng de pUC19 (Gibco) como control positivo. Las células se dejaron 30 min en hielo y después se les sometió a un choque térmico de 42°C durante 60 seg, al término del cual se les incubó en hielo durante 5 min. Las bacterias se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 seg, el medio se decantó y los sedimentos se resuspendieron con 1 ml de medio SOC (2 % de bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.05 % de NaCl, 2.5 mM de KCl, 20 mM de glucosa pH = 7.0), se incubó durante 1 h a 37°C y 200 rpm. 100 μ l de cada suspensión bacteriana fueron utilizados para sembrar una caja con agar Luria suplementado con ampicilina, el resto de la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 seg, y los sedimentos se resuspendieron en 100 μ l de medio SOC, estas suspensiones se sembraron en agar Luria con 50 μ g/ml de ampicilina.

Extracción y purificación de DNA plasmídico de geles de agarosa por el método de Gene-clean:

Se cortó el gel de agarosa en la zona en donde se encontraba la banda del DNA de interés, a ésta, se le adicionaron 3 volúmenes de una solución 6 M de NaI seguido de la incubación durante 5 min a 45-55°C. Una vez que el gel se disolvió se adicionaron 5 μ l de una suspensión de perlas de vidrio (glasmilk, Bio 101 Inc.), la mezcla se incubó por 5 minutos en hielo. Terminado el tiempo de incubación se sedimentaron las perlas por medio de centrifugación a 13,000 rpm durante 10 seg.

El sobrenadante se decantó y las perlas se lavaron tres veces con una solución denominada New-Wash (50% de etanol, más 50% de una solución de 20 mM Tris, pH = 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl). Después de los lavados el DNA se separó de las perlas por medio de dos ciclos: la incubación a 45-55°C con 20 μ l de agua destilada (con resistencia mayor a 18 MOhms) en el primer ciclo, y con 10 μ l de agua para el segundo, seguidos de centrifugación a 13,000 rpm por 10 seg.

Obtención de DNA plasmídico en pequeña escala (mini-prep):

El sedimento bacteriano proveniente de un cultivo con 3 ml de medio Luria se resuspendió en 200 μ l de una solución denominada TELT: (50 mM de Tris-HCL pH = 8.0, 62.5 mM de EDTA, 2.5 M de LiCl y 0.4 % de tritón X-100), después se adicionaron 20 μ l de lisozima (10 mg/ml disuelta en TELT), y se calentó a 100°C durante 60 seg. Al finalizar la lisis se colocó la mezcla de reacción en hielo durante 5 min y después se centrifugó 8 min a 14,000 rpm. El sobrenadante de lisis se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con 100 μ l de isopropanol, las muestras se centrifugaron 5 min y el precipitado se lavó con etanol al 70 %, una vez.

Obtención de DNA plasmídico en grandes cantidades (Midi-prep):

Se inocularon 10 ml de una suspensión de bacterias que fueron crecidas toda la noche a 37°C y 200 rpm, en 500 ml de medio Luria suplementado con 50 μ g/ml y se cultivó durante 8 h a 200 rpm y 37°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm por 5 min y se lavaron con solución salina isotónica dos veces. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1.5 ml de una solución de 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH = 7.6, 10 mM de EDTA, después se adicionaron 6 ml de una solución de 10 mg/ml de lisozima disuelta en TE pH = 8 (10 mM de Tris-HCl pH = 7.4, 1 mM de EDTA pH = 8), y 15 ml de una solución con 1 % de SDS y 0.2 M de NaOH, se mezclaron y se incubaron 10 min en hielo. Al finalizar la incubación se adicionaron 11.25 ml de una solución 3 M de acetato de potasio /5 M de ácido acético seguida de una incubación de 10 min en hielo. La mezcla de reacción se centrifugó 10 min a 5,000 rpm, el sobrenadante se filtró a través de gasa estéril y se le adicionó 15 ml de isopropanol, después se incubó en hielo durante 5 min. La suspensión se centrifugó durante 5 min a 5,000 rpm, el sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en 2 ml de TE y se adicionaron 2 ml de LiCl seguido de una incubación en hielo durante 30 min. El tubo se centrifugó y el sobrenadante se

colocó en un tubo nuevo con 10 ml (2.5 volúmenes) de etanol absoluto, se incubó 1 hora a -20°C y se centrifugó 10 min a 5,000 rpm. El sedimento se resuspendió en 500 μl de agua inyectable y se le adicionaron 100 μl de una solución de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAasa (Sigma), seguida de una incubación a 37°C durante 60 min. Una vez terminada la incubación, el producto se le adicionó un volumen (600 μl) de una solución de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm, la fase acuosa se separó para ser sometida dos veces más al mismo tratamiento. Después se adicionó 1/10 (50 μl) de acetato de sodio 3 M pH=7.0, se distribuyó en tres tubos eppendorf y se les adicionó etanol hasta llenar el tubo. Las muestras se colocaron a -70°C durante toda la noche, después se centrifugaron 15 min a 4°C y 13,000 rpm. El sedimento se lavó con 750 μl de etanol al 70 %, y se concentró durante 5 min en una centrifuga con vacío (Heto). El DNA de cada tubo fue resuspendido 200 μl de agua inyectable y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm.

Transfección de las células P815: Una vez purificados, 10 μg de los vectores de expresión se utilizaron para transfectar células de mastocitoma murino P815 (donada por el Dr. Gunter Hammerling, German Institute of Cancer Research, Heidelberg Alemania) (90) por medio de electroporación a 220 V y 1180 μF . Las células fueron seleccionadas con base en la resistencia que presentaron al cultivo con 1 mg/ml del antibiótico G418 (Gibco, genitocina). Las células resistentes fueron clonadas por medio de dilución a 0.3 células por cada 100 μl en placas de 96 pozos.

Análisis de la expresión de la porina en las células transfectadas: La expresión del antígeno así como su localización se evaluaron en las células P815 transfectadas, por medio de inmunofluorescencia indirecta (89) utilizando anticuerpos de conejo anti-porinas y un anticuerpo anti-conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako), la permeabilización de las células se realizó mediante saponina al 3 %. Como testigos se utilizaron anticuerpo de conejo anti-moléculas clase II del MHC y anticuerpos anti-CD3.

Cepas bacterianas: En el presente trabajo se utilizaron las siguientes cepas:

S. typhimurium LT2 (68) (donada por el Center for Vaccine Development. Baltimore, Maryland. USA)

S. typhi CVD90B-GP63 (69) (construida en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología en colaboración con el Center for Vaccine Development. Baltimore, Maryland. USA)

E. coli DH10B (Gibco)

Purificación de la porina OmpC: La porina fue purificada a través del método de Nikaído, modificado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (55).

Preparación del tripsinizado de *Salmonella typhimurium* y de OmpC:

S. typhimurium fue cultivada en 10 L de medio Luria durante 10 h, después se cosechó por centrifugación. Las bacterias se lavaron con solución balanceada de fosfatos (PBS: 0.8 % de NaCl, 0.02 % de KCl, 0.144 % de Na₂HPO₄, 0.024 % KH₂PO₄, pH = 7.4) y se rompieron a 100 psi utilizando una prensa French. El lisado se centrifugó a 6,000 rpm durante 8 min, el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 35,000 rpm por 30 min, después el sobrenadante se guardó, mientras que el sedimento se sometió a la extracción de las proteínas con 0.1% de SDS en 50 mM de Tris-HCl pH = 7.4. Las proteínas extraídas y el sobrenadante de la ultracentrifugación se mezclaron y se dializaron contra solución salina isotónica.

A partir de este punto, el procedimiento seguido es el mismo tanto para la porina OmpC como para el extracto proteico *S. typhimurium*.

A la solución de proteína de *S. typhimurium* o a la solución de 5 mg de OmpC se le adicionó 8 M de urea y 0.2 M de β -2-mercapto-etanol. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente, y después se realizó una alquilación adicionando ácido iodoacético hasta una concentración final de 0.25 M, se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente se dializó exhaustivamente contra agua destilada y contra carbonato de amonio 50 mM. Al final de la diálisis se adicionó tripsina a una concentración final de 1 % del volumen y posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se separaron los péptidos de peso molecular menor a 10,000 Da por medio de filtración en filtros centriprep (Amicón), y finalmente se esterilizaron por filtración en membranas con diámetro de poro de 0.22 nm.

Inmunización de ratones: Se inmunizaron por vía intraperitoneal grupos de cinco ratones BALB/c de 20 g de peso, los días cero, 10, 20 y 30, con 100 μ l de una suspensión de *S. typhimurium* LT2 con 10^2 bacterias/ml. Diez días después de la última inmunización se les extrajo el bazo. Otro grupo de ratones fue inmunizado vía oral (previa administración de 100 μ l de bicarbonato de sodio vía oral) con *S. typhi* CVD908-GP63 a una concentración de 9×10^8 bacterias por cada 100 μ l, los días 0, 7, 14 y 35. Nueve días después de la última inmunización se les extrajo el bazo.

Reestimulación *in vitro* de linfocitos: Apartir de los bazos obtenidos de los ratones inmunizados se preparó una suspensión de esplenocitos por medio de disgregación del bazo en tela de organza. Los eritrocitos se eliminaron mediante el empleo de un amortiguador de lisis (0.15 M de NH_4Cl , 1.0 mM de KHCO_3 , 0.1 mM de Na_2EDTA , pH=7.4) durante 3 minutos. Los esplenocitos se lavaron con solución de HANKS (Gibco), y se ajustaron a 30 millones/10 ml de RPMI complementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina y piruvato de sodio. Las células se colocaron en botellas de cultivo de 25 cm^2 a las que se les adicionó 100 $\mu\text{g/ml}$ de los péptidos de *Salmonella* (tripsinizado de *S. typhimurium*), o bien 100 $\mu\text{g/ml}$ de péptidos de OmpC (tripsinizado de OmpC). Los cultivos se incubaron 5 días a 37°C y 5 % de CO_2 . Al término de la reestimulación, las células se cosecharon y se emplearon como células efectoras en el ensayo de citotoxicidad.

Ensayo de citotoxicidad: Como células efectoras se emplearon esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con *Salmonella typhimurium* o con *Salmonella typhi* CVD908gp63, reestimulados *in vitro* con el extracto de péptidos de *Salmonella typhimurium* o con el extracto de péptidos de la porina OmpC. Como células blanco se utilizaron células PB15 transfectadas con el gen de la porina OmpC. Para el ensayo de citotoxicidad las células blanco se marcaron con cromato de sodio radiactivo (^{51}Cr), para esto, 1×10^6 se incubaron 2 h a 37°C con 100 μCi de ^{51}Cr (Dupont); posteriormente se lavaron 3 veces con solución de Hanks y se ajustaron a 3×10^4 cel/ml. Las células efectoras y blancos se colocaron en placas de 96 pozos de fondo redondo (Nunc), en razones de 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.25:1 y se incubaron durante 5 h a 37°C 5 % de CO_2 . Al término del período de incubación se recuperaron 100 μ l del sobrenadante y se cuantificó el número de cuentas por minuto (cpm) en un contador gama (Packard modelo Cobra). El porciento de citotoxicidad expresado como

percentage de lisis específica se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{cpm de liberación máxima} - \text{cpm del problema}}{\text{cpm de lib. máxima} - \text{cpm de lib. espontánea}}$$

La liberación máxima corresponde a las cpm de las células blanco lisadas con SDS al 10 %. Mientras que la liberación espontánea corresponde a las cpm de las células blanco incubadas sin células efectoras.

IV. RESULTADOS:

1.- Obtención de los genes L-ompC y ompC por PCR: El gen de la porina OmpC fue amplificado por medio de PCR con y sin su secuencia líder, los productos presentaron un movimiento electroforético relativo a 1.1 Kb (ompC) y de 1.3 Kb (L-ompC) en gel de agarosa (Fig.1).

2.- Clonación del gen ompC (sin líder) en el plásmido pFM92.1: El gen ompC obtenido por PCR fue clonado en el plásmido pFM92.1 dando como resultado el plásmido pIQCLM1, el cual presentó un tamaño aproximado de 11.2 Kb. Al cortar el plásmido con la enzima Eco RV se observó la presencia de dos productos, el primero con un tamaño aproximado de 10 Kb correspondiente al vector y el segundo de 1.1 Kb correspondiente al gen ompC; la digestión con las enzimas Hind III y Bam H1 mostraron resultados similares, mientras que la digestión con Eco RI nos mostró un producto linearizado de un tamaño aproximado de 11 Kb. El análisis con enzimas de restricción nos mostró que el gen ompC se encuentra presente en el plásmido construido en la dirección correcta (Fig.2 y 4).

3.- Clonación del gen L-ompC (con líder) en el plásmido pJRD184: El gen L-ompC obtenido por PCR fue clonado en los sitios Eco RV y Bam H1 del pJRD184, como resultado se obtuvo el plásmido pIQCLM2, éste presentó un tamaño aproximado de 4.8 Kb, las digestiones con las enzimas Hind III y Bam H1, o bien con Eco RI nos mostraron dos productos, uno de alrededor de 3.5 Kb correspondiente al vector y otro de 1.3 Kb que corresponde al gen L-ompC este análisis nos mostró que el gen L-ompC se clonó en los sitios planeados y en la orientación correcta (Fig.3).

4.- Clonación del gen L-ompC en el plásmido pFM92.1: Del plásmido pIQCLM2 se cortó el fragmento correspondiente al gen L-ompC el cual se clonó en el plásmido pFM92.1, dando como resultado el plásmido pIQCLM3. Los cortes con las enzimas Eco RI, ó Hind III y Bam H1 muestran en la electroforesis en geles de agarosa dos productos, el primero es de aproximadamente 10 Kb correspondiente al vector, mientras que el segundo es de aproximadamente 1.3 Kb correspondiente al gen L-ompC, la digestiones con las enzimas Eco RV y Nde I muestran un producto lineal

5.- Las células P815 son capaces de producir a la porina OmpC de *Salmonella typhi*: Las células transfectadas fueron resistentes al cultivo con 1 mg/ml de G418 al menos hasta los dos meses en los que se les mantuvo con este antibiótico, a estas células se les denominó CLM1 (las que fueron transfectadas con el pIQCLM1) y CLM3 (las que fueron transfectadas con el pIQCLM3); de estas células se obtuvieron clonas. La presencia de la porina en dichas clonas fue evaluada por medio de inmunofluorescencia, la cual mostró que las clonas de las células CLM1 denominadas A3 y B6, así como la clona B3 de las células CLM3, fueron capaces de expresar la porina OmpC de *Salmonella typhi*. La porina fue detectada en el citoplasma de las células, no se observó en el núcleo, ni en vacuolas ni en la membrana citoplasmática, tampoco se formaron cuerpos de inclusión (Fig.5), además no se pudo detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante de cultivo. Los controles negativos de la prueba consistieron en incubar con anticuerpos anti-moléculas clase II del MHC de ratón, y de segundo anticuerpo (anti-conejo-FITC), estos resultaron negativos como se esperaba, mientras que los controles positivos con anticuerpos anti-moléculas clase I K^d y D^d de ratón dieron una señal intensa (Fig.6). Las células produjeron porina al menos hasta los ocho meses posteriores a la transfección, tiempo en el cuál se realizó la última inmunofluorescencia.

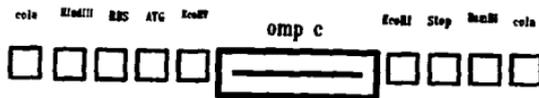
6.- Linfocitos citotóxicos provenientes de ratones infectados subletalmente con *Salmonella typhimurium* y reestimulados con un tripsinizado de *S. typhimurium* son capaces de reconocer y lisar a las células que expresan la porina OmpC sin líder (A3 y B6): Los datos nos muestran que existe una lisis específica dos veces mayor hacia las células que expresan la porina sin líder (A3 y B6), con respecto a las que no la expresan (P815) (Fig. 7).

7.- Linfocitos citotóxicos provenientes de ratones infectados subletalmente con *S. typhimurium* y reestimulados con la porina OmpC, son capaces de reconocer y lisar a las células que expresan la porina OmpC sin líder (A3 y B6): En la figura 8 se muestra que existe una lisis específica hacia las células que expresan la porina (A3) 2.5 veces mayor con respecto a las células que no la expresan (P815), mientras que para las células B6 no hubo diferencia evidente con respecto a las células P815.

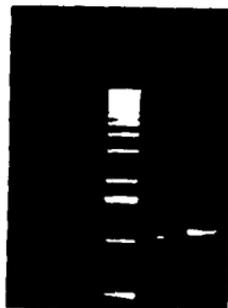
En ninguno de los dos experimentos anteriores se observó citotoxicidad dirigida en contra las células que expresan la porina con secuencia líder (B3).

8.- Linfocitos citotóxicos provenientes de ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908gp63 y reestimulados *in vitro* con un tripsinizado de *S. typhimurium*, son capaces de reconocer y lisar a las células que expresan porina sin líder (A3 y B6): En este caso se observó una lisis específica de 50 % hacia las células que expresan a la porina sin secuencia líder (A3 y B6), es decir cinco veces más que la lisis observada hacia las células que no expresan porina (PB15) así como hacia las células que expresan la porina con la secuencia líder (B3) (Fig 9); mientras que para el testigo positivo de células PB15 incubadas con tripsinizado de *S. typhimurium* la lisis específica fue de 30 %.

a) ompC de *S. typhi* (Iniciadores 72,74)



c)



b) l-ompC de *S. typhi* (Iniciadores 73,74)

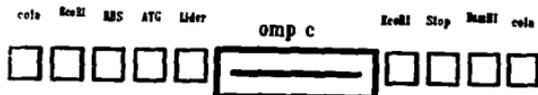


Figura 1. Amplificación por medio de PCR del gen de la porina OmpC. a) iniciadores para la amplificación del gen sin secuencia líder, b) con secuencia líder, c) electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación. Carril 1, marcadores de tamaño molecular 1 Kb. Carril 2, ompC sin líder (1.1 Kb). Carril 3, ompC con líder (1.3 Kb).

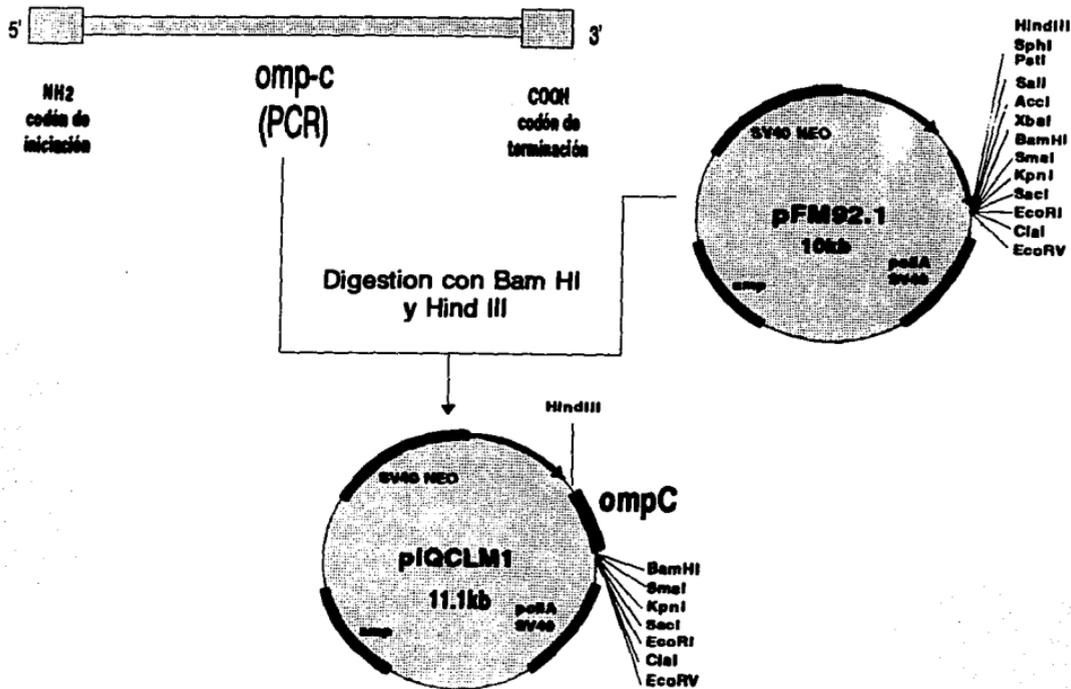


Figura 2. La clonación del gen de la porina OmpC sin secuencia líder, en el plásmido pFM92.1 dió origen al plásmido pIQCLM1.

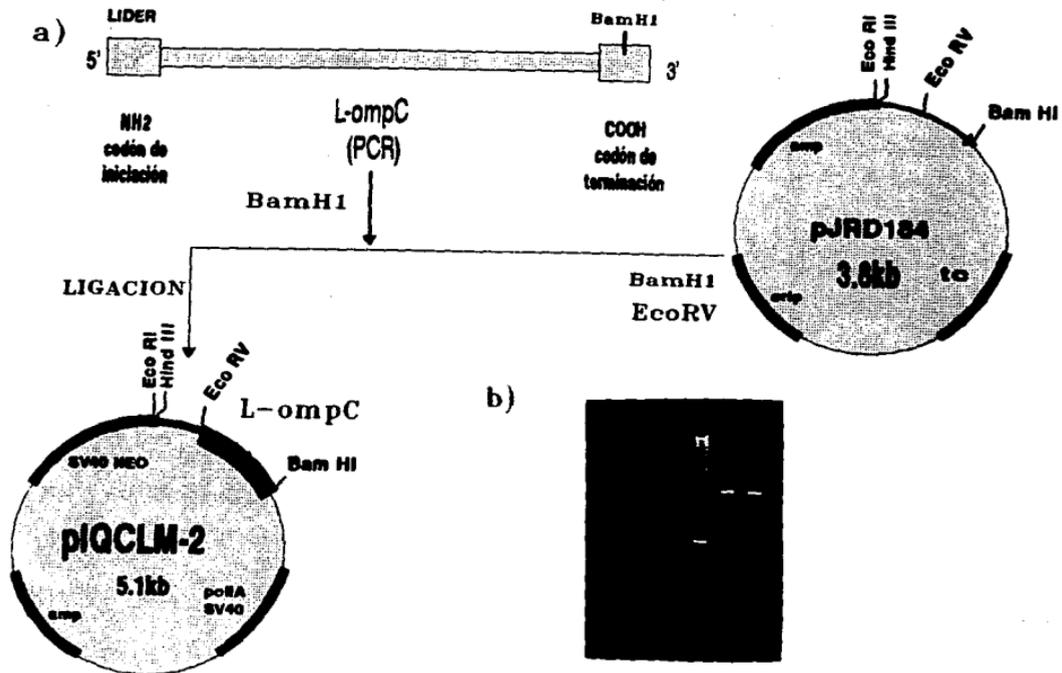


Figura 3. a) La clonación del gen de la porina *OmpC* con secuencia *lider*, en el plásmido pJRD184 dió origen al plásmido pIQCLM2. b) Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos digeridos con enzimas de restricción. Carril 1, marcadores 1 Kb; Carril 2, pJRD184 Hind III y Bam HI; Carril 3, pIQCLM2 Hind III y Bam HI.

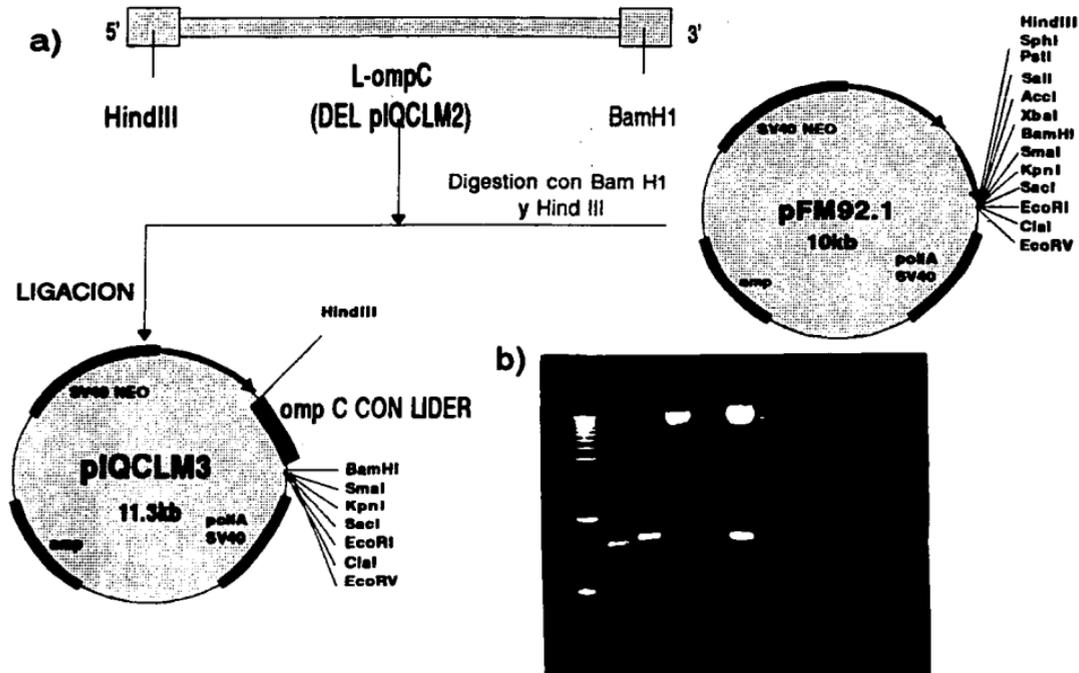
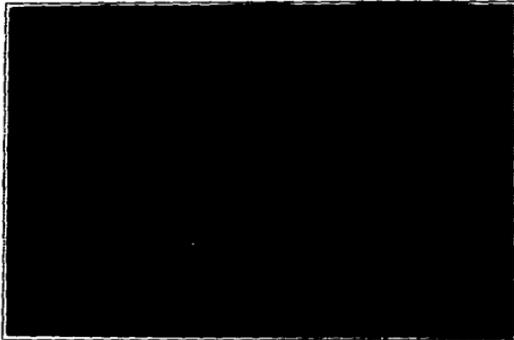
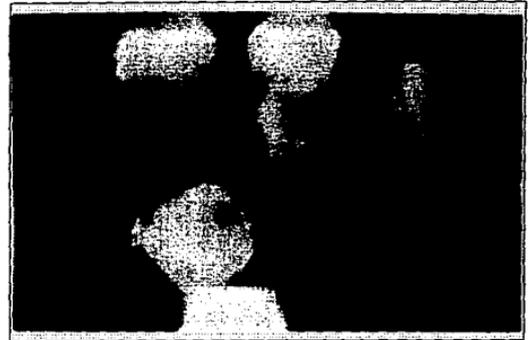


Figura 4. a) La clonación del gen de la porina **OmpC** con secuencia líder proveniente del piQCLM2 (a través de los cortes con las enzimas Bam H1 y Hind III), en el plásmido pFM92.1 dió origen al plásmido piQCLM3. b) Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos digeridos con enzimas de restricción. Carriles 1 y 8, marcadores 1 Kb; carril 2, ompC sin líder (PCR); carril 3, ompC con líder; carril 4, pFM92.1 Eco RV; carril 5, piQCLM1 Eco RV; carril 7, piQCLM3 Eco RV y Hind III.

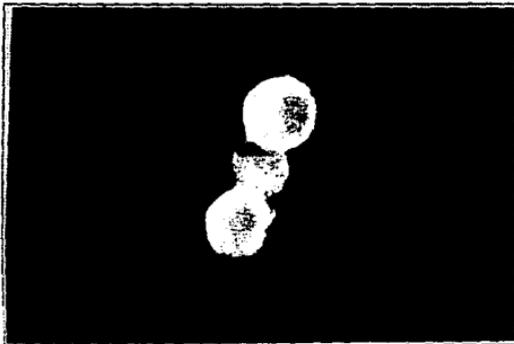
P815



A3



B6



B3

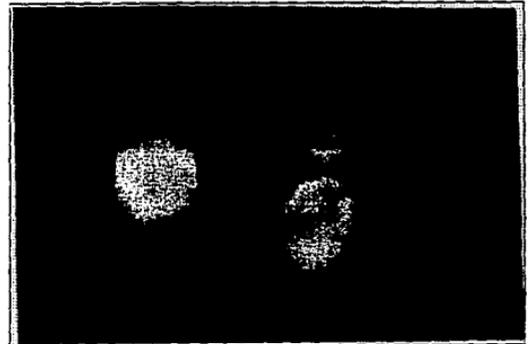
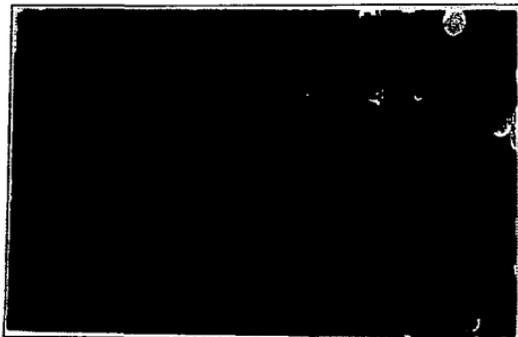
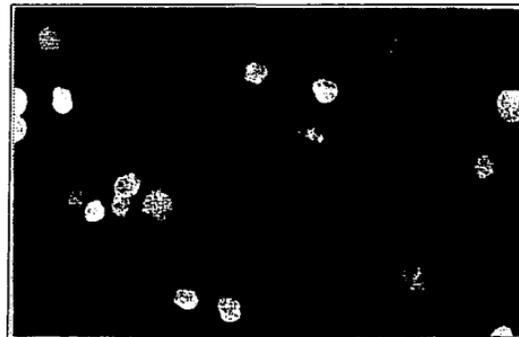


Figura 5. La tinción intracelular por medio de inmunofluorescencia indirecta, nos muestra que las células transfectadas con el plásmido que contiene al gen de la porina OmpC sin líder (A3 y B6), y las transfectadas con el plásmido que contiene a la porina OmpC con líder (B3) son capaces de expresar a la proteína en el citoplasma, mientras que las células no transfectadas son incapaces de producir la porina.

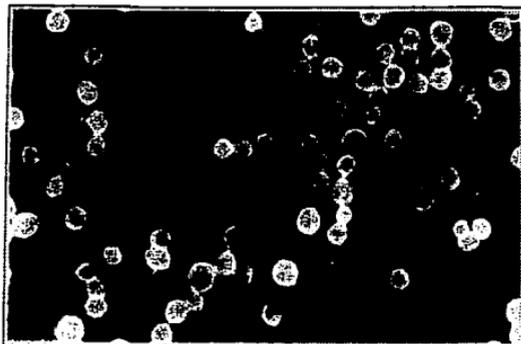
P815



A3



B6



B3

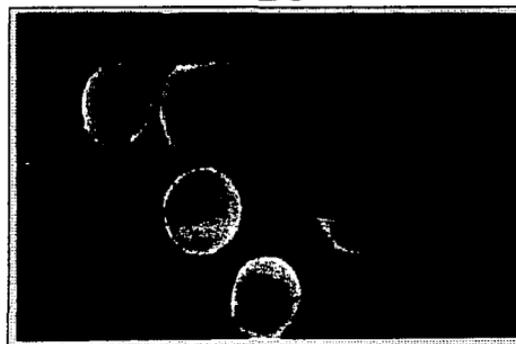


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta que nos muestra que las células transfectadas que son capaces de producir a la porina OmpC sin líder (A3 y B6) y con líder (B3), así como las células no transfectadas (P815), expresan de manera normal moléculas clase I del MHC, en la superficie. (Controles positivos de la inmunofluorescencia).

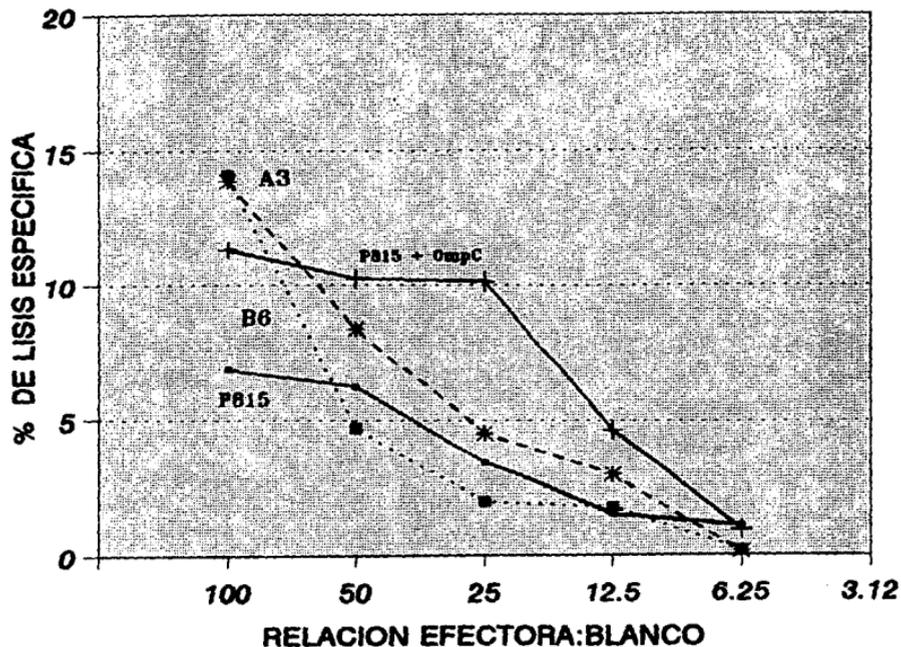


Figura 7. La infección causada por *S. typhimurium* induce la activación de linfocitos citotóxicos capaces de reconocer péptidos de la porina OmpC. Esplenocitos provenientes de ratones infectados subletalmente con *S. typhimurium* y reestimulados *in vitro* (con un extracto protéico de dicha bacteria que fue tratado con tripsina), son capaces de reconocer y lisar a las células que expresan a la porina OmpC sin líder (A3 y B6), 2.5 veces más que a las células que no expresan porina (P815). Como control positivo se utilizaron células P815 incubadas con el extracto utilizado en la reestimulación (P815 + pep).

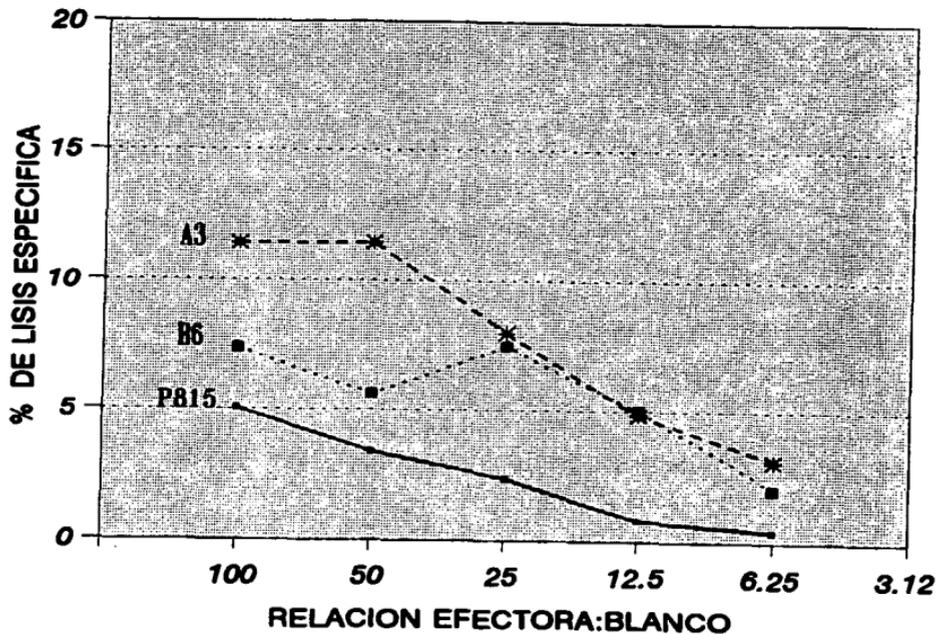


Figura 8. La infección causada por *S. typhimurium* induce la activación de linfocitos citotóxicos capaces de reconocer péptidos de la porina OmpC. Esplenocitos provenientes de ratones infectados subletalmente con *S. typhimurium* y reestimulados *in vitro* (con la porina OmpC), son capaces de reconocer y lisar a las células que expresan a la porina sin líder (A3 y B6) 2 veces más que a las células que no expresan porina (PB15).

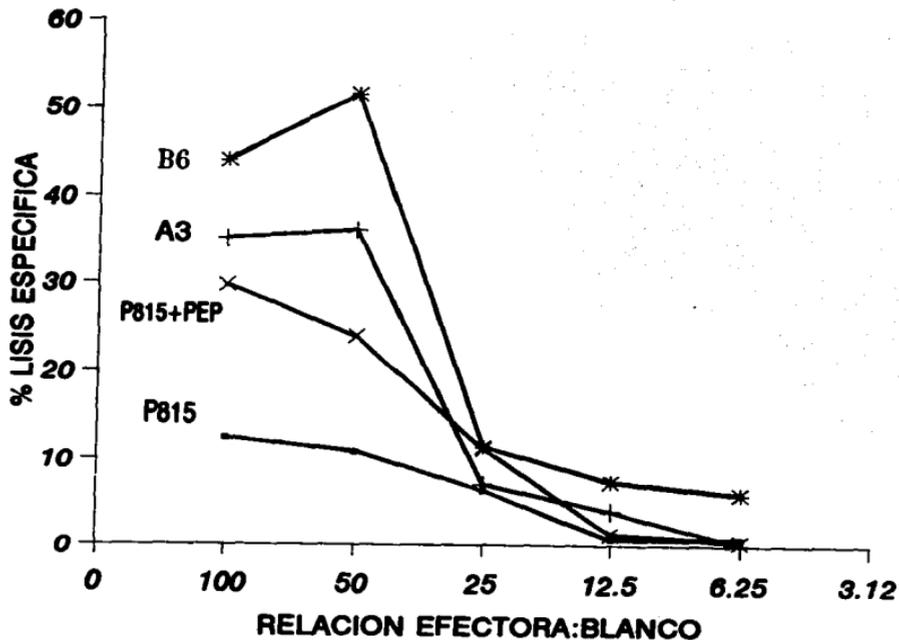


Figura 9. La inmunización con *S. typhi* CVD908-gp63 induce la activación de linfocitos citotóxicos capaces de reconocer péptidos de la porina OmpC. Esplenocitos de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908gp63 y reestimulados *in vitro* (con un extracto protéico de *S. typhimurium* tratado con tripsina), son capaces de reconocer y lisar a las células que expresan a la porina OmpC sin líder (A3 y B6), cuatro veces más que a las células que no expresan porina (P815). Como control positivo se utilizaron células P815 incubadas con el extracto usado en la reestimulación (P815+pep).

V. DISCUSION:

Uno de los conceptos aceptados en el estudio de la inmunidad contra agentes infecciosos, es que la respuesta inmune citotóxica es la encargada principal de mediar la acción en contra de los virus y tumores (70), sin embargo, la presencia de linfocitos T citotóxicos ha sido demostrada en infecciones bacterianas; reportes de esto los tenemos para *Mycobacterium* (71) y *Listeria* (72) entre otros. En el caso de *Salmonella*, la presencia de linfocitos T citotóxicos ha sido demostrada sólo para antígenos expresados en *salmonellas* genéticamente modificadas, (41 y 43), aunque también se ha reportado que hay linfocitos T citotóxicos Lyt-2⁺ capaces de lisar a células infectadas con *Salmonella* (46). En estos trabajos, no se llega a identificar cual es el antígeno de la *Salmonella* que es reconocido por los linfocitos citotóxicos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran dos hechos relevantes, primero, que los ratones infectados con *S. typhimurium* y *S. typhi* CVD908-GP63 desarrollan una respuesta citotóxica específica mediada por linfocitos CD8⁺, lo cual confirma lo descrito en la literatura en el sentido de que la infección, o la inmunización con la bacteria induce este tipo de respuesta, y segundo, que algunos de estos linfocitos citotóxicos reconocen específicamente a la porina Omp C de *Salmonella*.

Para la realización del presente trabajo, fue necesario desarrollar un sistema de expresión de antígenos que permitiera evaluar la respuesta citotóxica. Con este propósito se seleccionó a la células P815, debido a que este tipo de células son muy eficientes para expresar antígenos recombinantes, por lo cual han sido utilizadas para expresar antígenos de tipo tumoral (73). Las células P815 fueron transfectadas con los plásmidos que llevan al gen de la porina OmpC con y sin la secuencia líder, con esto se esperaba lograr la expresión de la proteína en partes específicas de la célula eucarionte. Por un lado se esperaba que la porina con líder, fuera secretada al medio o fuera depositada en la membrana debido a la presencia de dicha señal; mientras que con la porina sin líder se esperaba que fuera expresada en el citoplasma. Para ambos casos se encontró que la porina se produce y se distribuye de forma homogénea en el citoplasma, mientras que no se pudo localizar ni en el medio de cultivo, ni insertada en la membrana. Estos hechos sugieren que la síntesis y el ensamble de la proteína pudieran llevarse a cabo en el citoplasma utilizando a los ribosomas libres y las

chaperoninas del citosol (74). Nuestros datos también sugieren que la señal dada por la secuencia líder en la célula eucariótica no es interpretada igual que en la célula procariontica (75); así, tomando como base los hechos mencionados, se pensó que las células P815 transfectadas con la porina pudieran servir como células presentadoras de antígeno, ya que la porina expresada en el citosol, puede ser susceptible a la degradación por los proteasomas, y los péptidos producidos de esta forma pueden ser transportados al interior del retículo endoplásmico y ser presentados en el contexto de moléculas clase I del MHC, como ha sido descrito para otros antígenos (76). Para demostrar esta hipótesis, fue necesario obtener linfocitos T capaces de reconocer a los péptidos de la porina presentados en el contexto de las moléculas clase I del MHC, la estrategia seguida para obtener dichos linfocitos fue inmunizar ratones con dosis subletales de *S. typhimurium* o bien de *S. typhi* recombinante, esperando que la infección causada por estos microorganismos, despierte una respuesta citotóxica contra algunos de los antígenos bacterianos.

Los esplenocitos de los ratones infectados con *S. typhimurium* o bien con *S. typhi* recombinante fueron capaces de reconocer y lisar a las células que expresan la porina sin líder (A3 y B6), mientras que las células que expresan la porina con secuencia líder (B3) no son reconocidas ni lisadas por dichos esplenocitos (Fig. 7,8 y 9). Estos experimentos nos indican que existen linfocitos T CD8⁺ en los ratones infectados, capaces de reconocer a los péptidos de la porina OmpC presentados por las moléculas clase I del MHC de las clonas A3 y B6, mientras que el hecho de que las células B3 no sean lisadas por los esplenocitos nos sugiere que esta clona no está presentando a los péptidos de la porina, probablemente debido a que la proteína no sea procesada.

La citotoxicidad observada se atribuye a los linfocitos T CD8⁺, debido a que los otros tipos de células capaces de desarrollar un efecto citotóxico, como es el caso de las células asesinas naturales (NK), no reconocen a las células P815 (63); mientras que, los linfocitos T CD4⁺ citotóxicos tampoco reconocen a las células P815, debido a que estas células no presentan moléculas clase II del MHC que son los elementos de restricción de dichos linfocitos.

Un aspecto importante que debe ser esclarecido, es cuales son los péptidos de la porina OmpC que están siendo reconocidos por los linfocitos T CD8⁺. En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMI), se ha investigado la posibilidad de que algunos péptidos de la porina OmpC sean capaces de unirse a las moléculas clase

l del MHC de acuerdo al modelo propuesto por Rammensee (77). Se identificaron las secuencias consenso o "motifs" de unión a las moléculas clase I, K^b o D^b y se encontró experimentalmente que los aminoácidos correspondientes a la regiones 73-80 y la 132-139 de la porina OmpC, son capaces de unirse a las moléculas K^b , mientras que la región capaz de unirse a D^b fue la 314-321 (83). Por otra parte se han identificado 13 regiones de la secuencia de la porina, con probable capacidad de unirse a las moléculas K^d (que están presentes en las células P815), estas son: la 3-11, 52-60, 57-65, 90-98, 94-101, 148-156, 173-181, 209-217, 224-232, 235-243, 240-248, 315-323 y 323-331. Hasta el momento no se ha evaluado experimentalmente la capacidad de unión de estos péptidos a las moléculas K^d , sin embargo, el hecho de que en ratones infectados con *Salmonella* se detecten linfocitos $CD8^+$ capaces de lisar a las células P815 transfectadas con la porina, es una evidencia indirecta de que una o varias de estas regiones están siendo reconocidas.

El hecho de que la infección causada por *Salmonella* en los ratones estimule a linfocitos T $CD8^+$, genera algunas interrogantes como cuál es el mecanismo de procesamiento y presentación de los antígenos bacterianos, y cuál es el papel de los linfocitos T $CD8^+$ en el control y erradicación de la infección.

En algunos trabajos se han propuesto diferentes vías para explicar el mecanismo de presentación de los antígenos exógenos, por medio de las moléculas clase I del MHC; dichos antígenos son generalmente presentados por la vía de clase II (62,78,79,81). En el caso de *Salmonella* se propone que al entrar al organismo, la bacteria es fagocitada por el macrófago, una vez dentro del éste las bacterias o productos de ellas pueden pasar al citosol donde se procesan sus antígenos para después ser presentados por las moléculas clase I, siguiendo la vía endógena como cualquier antígeno de la célula ó viral, o bien, que los péptidos producto de la degradación de la *Salmonella* sean secretados al medio, y así algunos de estos se pueden unir a las moléculas vacías clase I que se encuentran en la superficie de la célula. Otra posibilidad es que el microorganismo degradado dentro de la vacuola fagocítica se encuentre con moléculas clase I del MHC, y que estas lleguen a cargar algún péptido de la bacteria para después viajar a la superficie y presentar el péptido (Figura 10). En la UIMI existen las evidencias experimentales que apoyan el mecanismo de secreción de péptidos al medio (78). Sin embargo, cualquiera que sea la forma de presentación al linfocito citotóxico, es un hecho que estas células se activan durante la infección causada por *Salmonella*.

El linfocito T CD8⁺ al activarse, por un lado, puede lisar al macrófago infectado, de tal forma que se impediría la multiplicación bacteriana que se lleva a cabo dentro de estas células, de esta manera las bacterias quedan al alcance de los anticuerpos y del complemento. Por otro lado el linfocito CD8⁺ activado, es capaz de secretar linfocinas como el IFN- γ , el cual activa a los macrófagos incrementando su capacidad fagocítica y posiblemente su capacidad lítica (Fig. 11). Esto podría ser parte del papel de los linfocitos T CD8⁺ durante la infección por *Salmonella*. Para dilucidar el papel de los linfocitos CD8⁺ en el control y erradicación de *Salmonella*, se podría utilizar el modelo de los denominados ratones "Knock out", estos animales son deficientes en la expresión de algún gen debido a que se les ha alterado por medio de procedimientos de ingeniería genética; en particular se podrían utilizar ratones "Knock out" de las moléculas clase II del MHC (84), ya que estos no presentan linfocitos T CD4⁺, por lo cual, sólo se observaría el papel de los CD8⁺ ante la infección. Por otro lado, en los ratones "Konck out" de perforina (85) se podrían evaluar los mecanismos de citotoxicidad mediados por la perforina y/o por el sistema Fas-ligando de Fas de los linfocitos T CD8⁺ durante la infección causada por *Salmonella*.

El conocimiento del papel de los linfocitos CD8⁺ en la infección causada por *Salmonella* nos puede ayudar a entender mejor los mecanismos de control y erradicación del microorganismo y por tanto al diseño de agentes vacunales; para esto es importante señalar que no sólo es importante conocer el papel de estas células sino que también se necesita conocer cuales son los antígenos que reconocen. El hecho de que péptidos de la porina Omp C de *Salmonella typhi* sean reconocidos por los linfocitos CD8⁺ es de suma relevancia en el contexto de la respuesta inmune contra *Salmonella* y en el desarrollo de una vacuna contra la fiebre tifoidea a base de porinas, ya que próximamente se evaluará la capacidad de protección y la inocuidad de las porinas de *Salmonella typhi* en voluntarios humanos (fase I del desarrollo de vacunas).

VI. CONCLUSIONES.

En la infección por *Salmonella* se generan linfocitos T citotóxicos dirigidos contra los antígenos de estas bacterias.

La inmunización con *Salmonella* induce una respuesta inmune citotóxica contra antígenos de la bacteria.

Uno de los antígenos reconocidos por los linfocitos T citotóxicos generados en la infección, es la porina OmpC de *Salmonella typhi*.

FALLA DE ORIGEN

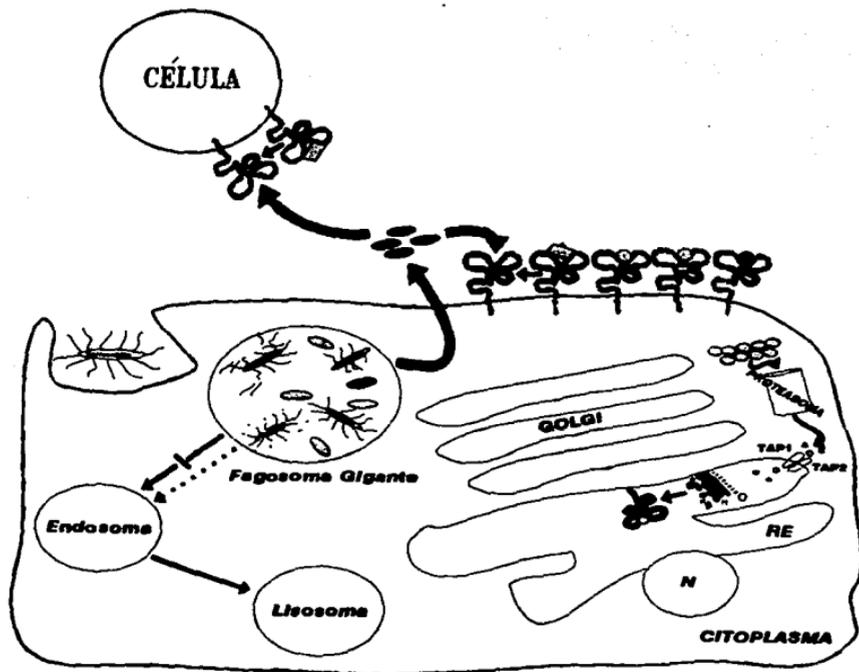


Figura 10. Posible mecanismo de presentación de antígenos derivados de *Salmonella* a través de moléculas clase I del MHC. (N: núcleo, RE: Reticulo endoplasmático, TAP 1 y 2: proteínas transportadoras dependientes de ATP).

VII. BIBLIOGRAFIA:

1. Kusch, G.T. and Thea, D.M. 1993. **Invasive and tissue-damaging enteric Bacterial Pathogens: Bloody Diarrhea and Dysentery.** Cap. 18 En: **Mechanisms of microbial Disease.** Shaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B., 2^a ed. Ed. Williams and Wilkins. p.264-280.
2. Hormaeche, C.E. 1992. **Salmonella, Infection and Immunity.** In the **Encyclopedia of Immunology.** Edited by Roitt, I.M. and Dalves, P.J. Academic Press. pp. 1350-1352.
3. Polotsky, Y., Dragunsky, E., Khavkin, Th. 1944. **Morphologic Evaluation of the Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections.** **Critical Reviews in Microbiology.** 20(3):161-208
4. MacBeth, K.J., Lee, C.A. 1993. **Prolongated Inhibition of Bacterial Protein Synthesis Abolishes Salmonella Invasion.** **Infect. Immun.** 61:1544-1546.
5. Guinocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., Galan, J.E. 1994. **Contact with Epithelial Cells Induces the Formation of Surface Appendages on Salmonella typhimurium.** **Cell.** 76:717-724.
6. Rosenshine, I., Ruschokowski, S., Foubister, V., Finlay, B. 1994. **Salmonella typhimurium Invasion of Epithelial Cells: Role of Induced Host Cell Tyrosine Protein Phosphorylation.** **Infect. Immun.** 62:4969-4974.
7. Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., Falkow, S. 1993. **Ruffles Induced by Salmonella and Other Stimuli Direct Macropinocytosis of Bacteria.** **Nature.** 364:639-642.
8. García Del Portillo, F., Finlay, B.B. 1994. **Salmonella Invasion of Nonphagocytic Cells Induces Formation of Macropinosomes in the Host Cell.** **Infect. Immun.** 62:4641-4645.

9. Jones, B.D., Paterson, H.F., Hall, A., Falkow, S. 1993. *Salmonella typhimurium* Induces Membrane Ruffling by a Growth Factor Receptor-Independent Mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:10390-10394.
10. MacCormick, B.A., Colgan, S.P., Delp-Archer, C., Miller, S.I., Madara, J.L. 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal Epithelial Monolayers: Transcellular Signaling to Subepithelial Neutrophils. J. Cell. Biol. 123:895-907.
11. Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A., Miller, S.I. 1994. *Salmonella* Stimulate Macrophage Macropinocytosis and persist within Spacious Phagosomes. J. Exp. Med. 179:601-608.
12. Pegues, D.A., Miller, S.I. 1994. *Salmonellosis*, including typhoid fever. Curr. Op. Infect. Dis. 7:616-623.
13. Groisman, E.A., Ochman, H. 1993. Cognate Gene Clusters Govern Invasion of Host Epithelial Cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. EMBO J. 12:3779-3787.
14. Libby, S.J., Goebel, W., Ludwig, A., Buchmeier, N., Bowe, F., Fang, F.C., Guiney, D.G., Songer, J.G., Heffron, F. 1994. A Cytolysin Encoded by *Salmonella* is Required for survival within Macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:489-493.
15. Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., 1993. Selection of bacterial Virulence Genes that are Specifically Induced in Host Tissues. Science. 259:686-688.
16. Behlau, I., Miller, S.I. 1993. A PhoP-Regulated Gene Promotes *Salmonella typhimurium* Invasion of Epithelial Cells. J. Bacteriol. 175:4474-4484.
17. Alpuche-Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P., Miller, S.I. *Salmonella typhimurium* Activates Virulence Gene Transcription within Acidified Macrophage Phagosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10079-10083.

18. Francis, K.P., Gallaher, M.P., 1993. Light Emission from Mudlux Transcriptional Fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by Hydrogen Peroxide and by Interaction with the mouse Macrophage Cell Line J774.2. *Infect. Immun.* 61:640-649.
19. Gulig, P.A., Doyle, T.J. 1993. The *Salmonella typhimurium* Virulence Plasmid Increases The Growth Rate of Salmonellae in Mice. *Infect. Immun.* 61:504-511.
20. Valone, S.E., Chikarni, G.K., Miller, V.L. 1993. Stress Induction of the Virulence Protein (SpvA,-B,-C) from Native Plasmid dSDI of *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* 61:705-713.
21. Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., Gros, P. 1993. Natural Resistance to Infection with Intracellular Parasites: Isolation of Candidate for Bcg. *Cell* 73:469-485.
22. Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B., Hormaeche, C.E. 1993. Transfer of Immunity to Oral Challenge with Virulent *Salmonellae* in Innately Susceptible BALB/c Mice Requires Both Immune serum and T Cells. *Infect. Immu.* 61:3981-3984.
23. Emoto, M., Naito, T., Nakamura, R., Yoshikai, Y. 1993. Different Appearance of $\gamma\delta$ T cells During *Salmonellosis* Between *Ity⁻* and *Ity⁺* mice. *J. Immunol.* 150:3411-3420.
24. Pfeiffer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., Harding, C.V. 1993. Phagocytic Processing of Bacterial Antigens for Class I MHC Presentation to T Cells. *Nature.* 361:359-361.
25. Muthukkumar, S., Muthukkaruppan, V.R. 1993. Mechanism of Protective Immunity Induced by Porin Lipopolysaccharide against Murine *Salmonellosis*. *Infect. Immun.* 61:3017-3025.
26. Galdiero, F., de L'Ero G.C., Benedetto, N. Galdiero, M., Tufano M.A. 1993. Release of Cytokines Induced by *Salmonella typhimurium* Porins. *Infect. Immun.* 61:155-161.

27. Muotiala, A., Makela P.H. 1993. Role of Gamma Interferon in Late Stages of Murine *Salmonellosis*. Infect. Immun. 61: 4248-4253.
28. Angerman, C.R., Eisenstein, T.K. 1978. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, acetone-killed cell, lipopolysaccharide, and a live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 19:575.
29. Hochadel, J.F., Keller, K.F. 1977. Protective effects of passively transfected immune T- or B-lymphocytes in mice infected with *Salmonella typhimurium*. J. Infect. Dis. 135:813.
30. Kita, E., Kashiba, S. 1980. Immunogenicity of the Ribosomal fraction of *Salmonella typhimurium*: Analysis of humoral immunity. Infect. Immun. 27:197.
31. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V.R. 1983. Characteristics of Live Vaccines in Relation to Delayed-Type Hypersensitivity and Protective Immunity in Murine *Salmonellosis*. Immunology Letters. 6:299:302.
32. Fukazawa, Y., Kagaya, K., Ishibashi, Y. 1983. Effect of Delayed-Type Hypersensitivity Reaction and Transferred Lymphokine on Resistance of Mice to *Salmonella typhimurium* infection. 39:986-989.
33. Killar, L. M., Eisenstein, T.K. 1986. Delayed Type Hypersensitivity and Immunity to *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 52:504-508.
34. Tite, J.P., Gao, X.M., Hughes-Jenkins, C.M., Lipsombe, M., O'Callaghan, D., Dougan, G., Liew, F.Y. 1990. Antiviral immunity induced by recombinant nucleoprotein of influenza A virus III. Delivery of recombinant nucleoprotein to the immune system using attenuated *Salmonella typhimurium* as a live carrier. Immunology. 70:701-708.

FALLA DE ORIGEN

35. Gautreaux, M.D., Deitch, E.A., Berg, R.D. 1994. T Lymphocytes in Host Defense against Bacterial Translocation from the Gastrointestinal Tract. *Infect. Immun.* **62**:2874-2884.
36. Matsumoto, Y., Emoto, M., Usami, J., Meada, K., Yoshikai, Y. 1994. A protective role of extrathymic $\alpha\beta$ TcR cells in the liver in primary murine salmonellosis. *Immunology.* **81**:8-14.
37. Lissner, C.R., Swanson, R.N., O'Brien, A.D. 1983. Genetic Control of the Innate Resistance of Mice to *Salmonella typhimurium*: Expression of the *Ity* Gene in peritoneal and Splenic Macrophages Isolated In Vitro. *J. Immunol.* **131**:3006-3012.
38. Swanson, R.N., O'Brien, A.D. 1983. Genetic Control of the innate Resistance of Mice to *Salmonella typhimurium*: *Ity* Gene is Expressed In Vivo by 24 Hours After Infection. *J. Immunol.* **131**:3014-3020.
39. Benjamin Jr, W.H., Hall, P., Roberts, S.J., Briles, D.E. 1990. The primary Effect of the *Ity* Locus is on the Rate of Growth of *Salmonella typhimurium* that are Relatively Protected from Killing. *J. Immunol.* **444**:3443-3451.
40. Flynn, J.N., Weiss, W.R., Norris, K.A., Seifert, H.S., Kumar, S., So, M. 1990. Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. *Molec. Microb.* **4**(12):2111-2118.
41. Aggarwal, A., Kumar, S., Jalle, R., Hone, D., Gross, M., Sadoff, J. 1990. Oral *Salmonella*: Malaria Circumsporozoite Recombinants Induce Specific CD8+ Cytotoxic T Cells. *J. Exp. Med.* **172**:1083-1090.
42. Gao, X.M., Tite, J.P., Lipscombe, M., Rowland-Jones, S., Ferguson, D.J.P., McMichel, A. 1992. Recombinant *Salmonella typhimurium* Strains That Invade Nonphagocytic Cells Are Resistant to Recognition by Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Infect. Immun.* **60**(9):3780-3789.

43. González, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C. O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Sztein, M. B., Heppner, D.G., Foust, T.R., Isibasi, A., Levine, M. 1994. *Salmonella typhi* Vaccine Strain CVD908 Expressing the Circumsporozoite Protein of *Plasmodium falciparum*: Strain Construction and Safety and Immunogenicity in Humans. *J. Infect. Dis.* 169:927-931.
44. Harding, C.V., Pfeiffer, J.D. 1994. Antigen expressed by *Salmonella typhimurium* is processed for class I major histocompatibility complex presentation by macrophages but not infected epithelial cells. *Immunology.* 83:670-674.
45. Pope, M., Kotlarsky, I. 1994. Detection of *Salmonella*-specific L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells which can proliferate in vitro and mediated delayed-type hypersensitivity reactivity. *Immunology.* 81:183-191.
46. Pope, M., Kotlarsky, I. 1994. Induction of Lyt2⁺ cytotoxic T lymphocytes following primary and secondary *Salmonella* infection. *Immunology.* 81:177-182.
47. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V.R. 1987. Protective Immunity Induced by Outer Membrane Proteins of *Salmonella typhimurium* in Mice. *Infect. Immun.* 55(3):816-821.
48. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V.R. 1987. An Outer Membrane Protein (Porin) as an Eliciting Antigens for Delayed-Type Hypersensitivity in Murine Salmonellosis. *Infect. Immun.* 55(3):822-824.
49. Udhayakumar, V., Muthukkaruppan, V.R. 1989. Protective Immunity induced by porin against *Salmonella* infection mice. *Indian J. Med. Res.* 89:121-127.
50. Collins, F.M., Mackaness, G.B. 1968. Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance to *Salmonella* infected Mice. *J. Immunol.* 101:830-845.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

51. Tite, J.P., Dougan, G., Chatfield, S.N. 1991. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 147(9):3161-3164.
52. Kagaya, K., Watanabe, K., Fukazawa, Y. 1989. Capacity of Recombinant Gamma Interferon To Activate Macrophages for *Salmonella*-Killing Activity. *Infect. Immun.* 57(2):609-615.
53. A. Isibasi, V. Ortiz, M. Vargas, M. Vargas, J. Paniagua, C.R. González, J. Moreno and J. Kumate. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in Mice after Immunization with Outer Membrane Proteins Isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
54. A. Isibasi, V. Ortiz, J. Paniagua, R. Pelayo, C.R. González, J.A. García, and J. Kumate. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* 10:811-813.
55. A. Isibasi, J. Paniagua, M.P. Rojo, N. Martín, G. Ramírez, C.R. González, C. López Macías, J. Sánchez, J. Kumate, and V. Ortiz-Navarrete. 1994. Role of Porins from *Salmonella typhi* in the Induction of Protective Immunity. *Ann of the New York Acad of Sci.* 730:350-353.
56. A. Isibasi, V. Ortiz, J. Moreno, J. Paniagua, M. Vargas, C. González, and J. Kumate. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. In: Cell function and disease, ed L.E. Cañedo, L.E. Todd, L. Packer and J. Jaz (Plenum Press, New York). pp 281-292.
57. J. Paniagua, A. Isibasi, R. Pelayo, V. Ortiz, M. Muy, C. González, J.A. García, S. Islas. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d: análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20:315-320.

58. V. Ortiz, A. Isibasi, E. García-Ortigoza and J. Kumate. 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.
59. F. Blanco, A. Isibasi, C.R. González, V. Ortiz, J. Paniagua, C. Arreguín and J. Kumate. 1992. Human Cell Mediated Immunity to Porins from *Salmonella typhi*. Scand. J. Infectol. 1993. 25:73.
60. C.R. González, A. Isibasi, V. Ortiz, J. Paniagua, J.A. García, F. Blanco, and J. Kumate. 1993. Lymphocytic Proliferative Response to Outer Membrane Proteins Isolated from *Salmonella*. Microbiol. Immunol. 37:793-799.
61. J.A. García, A. Isibasi, E. Romo de Vivar, et al. 1992. 8th International Congress of Immunology, Budapest, Hungary.
62. M. Kovacovics-Bankovskiy K.L. Rock. 1995. A Phagosome-to-Cytosol Pathway for exogenous Antigens Presented on MHC Class I Molecules. Science 267:243-246.
63. K. Bezouska, C.T. Yuen, J. O'Brian, R. A. Childs, W. Chai, A.M. Lawson, K. Drbal, A. Fiserova, M. Popšil, and T. Feizi. 1994. Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. Nature. 372:150-157.
64. H.G. Rammensee, P.J. Robinson, A. Crisanti, M.J. Bevan. 1986. Restricted recognition of β -2 microglobulin by cytotoxic T lymphocytes. Nature. 391:502-504.
65. J. Agüero, G. Mora, M.J. Mroczenski-Wildey, M.E. Fernández-Beros, L. Aron and F.C. Cabello. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 KDa *Salmonella typhi* porin gene in *E. Coli*. Microb. Pathogen. 3:399-407.
66. A. Venegas, I. Gómez, I. Zaror, and A. Yuldelevich. 1988. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene. Nuc. Ac. Res. 16:15:7721.

67. F. Momburg, V. Ortíz Navarrete, J. Neefjes, Els Goulmy, Y. van de Wal, H. Spits, S. J. Powis, G. W. Butcher, J. C Howard, P. Walden, and G. J. Hammerling. 1992. Proteasome subunits encoded the mayor histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature*. 360:174-177.
68. Kenneth E. Sanderon. *Salmonella* Genetic Stock Center, Department of Biology, University of Calgary, Calgary Alberta, Canada T2N 1N4.
69. C.R. González, F. Noriega, S. Huerta, A. Santiago, V. Ortiz-Navarrete, A. Isibasi and Myron M. Levine. 1995. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein from *Leishmania mexicana*. Manuscrito en preparación.
70. G.M. Van Bleek, S.G. Nathenson. 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b molecule. *Nature*. 348:213-216.
71. B. Kaleab, T. Ottenhoff, P. Converse, E. Halapi, G. Tadesse, M. Rottenberg, R. Kiessling. 1990. Mycobacterial-Induced Cytotoxic T cells as well as Nonspecific Killer Cells Derived from healthy individuals and leprosy patients. *Eur. J. Immunol.* 145:3540-3546.
72. E.G. Pamer, J.T. Harty, and M.J. Bevan. 1991. Precise prediction of dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 353:852-855.
73. T. Boon, J.C. Cerottini, B. Van den Eynde. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Ann.Rev.Immunol.* 12:337-365.
74. J. Frydman, E. Nimmesgern, K. Ohtsuka, F. U. Hartl. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*. 370:111-117.
75. N. Nouwen, J. Tommassen, B. Kruijff. 1994. Requirement for conformational flexibility in the signal sequence of precursor protein. *J. Biol. Chem.* 269:23:16029-16033.

76. J.J. Neefjes y F. Momburg. 1993. Cell Biology of antigen presentation. *Curr. Op. Immunol.* 5:27-34.
77. K. Falk, O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 351:290-296.
78. N. Martín, I. Ochoa, A. Isibasi, V. Ortiz-Navarrete. 1995. Processing and presentation of exogenous antigens by class I molecules. En las memorias de: The 9th International Congress of Immunology. Resumen No. 4211 p. 709.
79. C. V. Harding. 1995. Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules. *Trends in Cell Biology.* 5:105-108.
80. H.G. Rammensee, K. Falk, O. Rotzschke. 1993. MHC molecules as peptides receptors. *Curr. Op. Imm.* 5:35-44.
81. J.B. Ulmer, J.J. Donnelly, M.A. Liu. 1994. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 24:1590-1596.
82. Pamer, E.G. 1993. Cellular immunity to intracellular bacteria. *Curr. Op. Immunol.* 5:492-496.
83. Castellanos-Palma L. 1995. Caracterización de péptidos de porina Omp C de *Salmonella typhi* que se unen a moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad murino. Tesis de licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas, Universidad La Salle.
84. D. Cosgrove, D. Gray, A. Dierich, J. Kaufman, M. Lemeur, C. Benoist, D. Mathis. 1991. Mice Lacking MHC Class II Molecules. *Cell* 66:1051-1066.

85. D. Kagi, B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K.J. Olsen, E.R. Podack, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 369:31-37.
86. J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. 2nd ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
87. E. Harlow, D. Lane. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. 1st ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
88. M. Plaut, L.M. Lichtenstein, E. Gillespie, C.S. Henney. 1973. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 111:389-394.