

576
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**“DETERMINACION DEL PATRON DE EXPRESION DE
CITOCINAS EN RATONES INMUNIZADOS CON
PORINAS DE SALMONELLA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA - FARMACEUTICA - BIOLOGA
P R E S E N T A :
PENELOPE MAGAÑA HERNANDEZ



MEXICO, D. F.

OCTUBRE, 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. MEZA RUIZ GRACIELA
Vocal	Prof. PELAYO CAMACHO ROSANA
Secretario	Prof. ORTIZ NAVARRETE VIANNEY FCO.
1er. Suplente	Prof. ORTEGA MUÑOZ RAQUEL
2do. Suplente	Prof. CASTILLO DURAN ANTONIO

Asesor del Tema



Dr. Vianney Fco. Ortíz Navarrete

Sustentante



Penélope Magaña Hernández

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

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por otorgarme vida y salud para poder llegar a realizar mis más grandes anhelos.

A Mis Padres, Josefina y Petronio:

Por darme su apoyo y consejos para poder realizarme personal y profesionalmente.

A mis Hermanos:

Ale, Tani y Vicente

A mis sobrinos:

Eliza y el pequeño bebé.

A mi Novio:

Victor Hugo Rosales García

Por su apoyo y cariño, que me ha dado la fortaleza para seguir en éste camino.

A mi Gran Amiga:

Veronica Castillo Orde

Por su gran apoyo moral, comprensión, cariño y sobre todo su lealtad como Amiga.

A mis amigos de la Facultad de Química:

Alejandra, Dulce, Alberto, Jessica, Lalo y Tomás.
Y Eduardo.

Agradezco al Dr. Armando Isibasi A. por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Así como al Dr. Vianney Fco. Ortiz Navarrete que desde un inicio confió en mí, ofreciéndome su apoyo académico y moral.

Así como agradezco la participación de amigos y compañeros del laborotio que de alguna manera hicieron posible la realización del presente trabajo, en especial a los correspondientes al Peine 3.

INDICE

	Pág.
INDICE DE ABREVIATURAS	I
0. RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	
1.1.1.- Infección por <i>Salmonella</i>	3
1.1.2.- Fiebre Tifoidea	3
a).- <i>Salmonella typhi</i>	3
1.1.3.- Respuesta inmune contra <i>Salmonella</i>	4
1.2.1.- Porinas	4
a).- Estructura y función	4
b).- Inmunogenicidad de las porinas de <i>Salmonella typhi</i>	7
2.1.1.- Linfocitos T y subpoblaciones	
2.1.1.1.- Subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺	8
a).- Linfocitos T CD4 ⁺	8
2.2.1.- Subpoblaciones de células T CD4 ⁺ Th1/Th2	9
a).- Subpoblaciones Th1/Th2	9
b).- Factores que afectan la diferenciación Th1/Th2	11
1.- Linfocinas y citocinas	11
2.- Dosis de antígeno	15
3.- Tipos de CPA's	15
4.- Moléculas coestimulatorias	15
2.3.1.- Subpoblaciones de células T CD8 ⁺ Tc1/Tc2	16
3.1.1.- Memoria en linfocitos T	
a).- CD44	17
b).- CD62L	17
II.- HIPOTESIS	18
III.- OBJETIVOS	19

IV.- METODOLOGIA

1.1.1.- Animales utilizados	20
1.1.2. Esquema de inmunización	20
2.1.1.- Preparación del antígeno	20
3.1.1.- Estandarización del ensayo de proliferación de linfocitos T	20
3.1.2.- Evaluación de la pureza de los linfocitos T por citometría de flujo	21
4.1.1.- Esquema de Titulación de anticuerpos porina-específicos mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) directo e indirecto	23
4.1.1.1.- Titulación de anticuerpos por ELISA-directo	23
4.1.1.2.- Isotipificación de anticuerpos mediante ELISA-indirecto	24
5.1.1.- Estimulación <i>in vitro</i> de células de bazo para el rastreo RNAm para citocinas mediante RT-PCR	24
5.1.2.- Obtención de macrófagos de peritoneo de ratón	25
5.1.3.- Extracción de RNA Total	25
5.1.4.- RT-PCR	26
5.1.5.- Análisis de los productos de DNA a partir de RNAm obtenidos por la técnica RT-PCR de las citocinas mediante electroforesis	27
6.1.1.- Análisis de la expresión de moléculas de activación y/o memoria (CD62L y CD44) y de las regiones variables de la cadena β (VB's) del receptor para antígeno de la célula T en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T mediante inmunofluorescencia indirecta	28

V.- RESULTADOS

Figura 1.- Proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos T provenientes de ratones inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	39
Figura 2.- Cinéticas de expresión de RNA mensajero para IFN- γ en células de bazo totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	40
Figura 3.- Cinéticas de expresión de RNA mensajero para IL-4 en células de bazo totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	41
Figura 4.- Cinéticas de expresión de RNA mensajero para GAPDH en células de bazo totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	42
Figura 5.- Cinética de expresión de RNA mensajero para IL-12 <i>in vivo</i> en macrófagos de peritoneo provenientes de ratones C57BL/6J inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	43
Figura 6.- Cinética de generación de anticuerpos porinas-específicos de respuesta secundaria analizados mediante la técnica de ELISA-directo	44

Figura 7.- Isotipificación de anticuerpos porinas-específicos mediante la técnica de ELISA-indirecta.	45
Figura 8.- Citometría de flujo de la pureza de linfocitos T por inmunofluorescencia indirecta.	46
Figura 9.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD62L (MEL-14) en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	47
Figura 10.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD62L (MEL-14) en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	48
Figura 11.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD44 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	49
Figura 12.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD44 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	50
Figura 13.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 17a en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	51
Figura 14.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 17a en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	52
Figura 15.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 8.1/2/3 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	53
Figura 16.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 8.1/2/3 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de <i>Salmonella typhi</i>	54
VI.- DISCUSION	55
VII.- CONCLUSIONES	58
VIII.- APENDICE	59
IX.- BIBLIOGRAFIA	63-66

ABREVIATURAS

A	Amstrong
Ac	Anticuerpo
ATCC	American Type Culture Collection
CD	Cluster Differentiation
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
D_a	Dalton
DEPEC	Dietyl-piro-Carbonato
DL₅₀	Dosis letal 50
DNA*	Acido-desoxirribonucleico
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardío
EDTA	Etil-Diamina-Tetracético
F(ab)₂	Fracción Fab de las Ig
Fc	Fracción cristalizabile
FEM	Fuerza electro-motriz
GAP ó GAPDH	Gliceraldehido-3-Fosfato-Deshidrogenasa
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEV	Vénulas altas endoteliales
HEPES	(N-[2-Hidroxietyl]piperazina -N'-[2-ácido etanosulfónico])
Ig	Inmunoglobulina
IFN-γ	Interferón gamma
IL-	Interleucina
i.p.	intra-peritoneal
LFA	Antígeno asociado a la función del leucocito
LPS	Lipopolisacárido
MEL-14	Anticuerpo anti-CD62L ó L-selectina
Mu	Cadena pesada de la IgM
μCi	Micro-Curi
NK	Célula natural asesina
NOS	Oxido-Nítrico-Sintetasa
Omp ó PME	Proteína de membrana externa
OPD	Orto-Fenil-Diamina
PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos
PCR*	Reacción en cadena de la Polimerasa
PLN	Nódulos linfáticos periféricos
pTh	Precursor de célula Th
RNA*	Acido-ribonucleico
ROI	Intermediarios-Reactivos de Oxígeno
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT*	Transcritasa-reversa
SFB	Suero fetal bovino
TAE	Tris-acetato-EDTA

Tc ó CTL	Célula T citotóxica
TCR*	Receptor de la célula T
TGF-β	Factor transformador del crecimiento
Th	Célula T helper (cooperadora)
Th0	Célula T CD4 no diferenciada
Th1	Célula T CD4 diferenciada a Th1
Th2	Célula T CD4 diferenciada a Th2
TH1P	Célula precursora de Th1
TH2P	Célula precursora de Th2
Tl⁻³H	Timidina-tritiada
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TNF-β	Factor de necrosis tumoral beta
Tween 20	Polyoxyethyleno sorbitan monolaurato
Vβ	Fración variable de la cadena β del TCR
VLA	Antígeno Tardío

* Por ser siglas universalmente conocidas se conservan así, aunque provengan del idioma inglés.

0. RESUMEN

En la infección por algunas bacterias intracelulares como la *Salmonella* en que induce una respuesta inmune tanto humoral como celular. En el presente trabajo abordó el estudio detallado de los mecanismos inmunes hacia un potente inmunógeno de *S. typhi*, que es la proteína de membrana externa denominada C, a través del análisis del tipo de respuesta inmune estimulada: a) humoral, por la determinación de anticuerpos; b) celular, por la expresión de RNAm para citocinas. Para ello se utilizaron dos diferentes cepas de ratones, que poseen susceptibilidad genética diferente hacia la *Salmonella*; C57BL/6J (B6) que contiene el gen de susceptibilidad *Ity*^s, y DBA/2 (D2) el gen de resistencia *Ity*^r.

Ratones de ambas cepas, se inmunizaron con una preparación de dos porinas de *S. typhi*, con pesos moleculares entre 38 y 42 kDa (una de ellas identificada como OmpC), por vía intraperitoneal (30µg/ratón) dos veces cada 10 días, analizándose: 1.- Niveles de anticuerpos específicos anti-porinas en sueros post-segunda inmunización. 2.- Isotipos y/o subclases de los anticuerpos específicos. 3.- Expresión de RNA mensajero para las citocinas: IL-2, IL-4, IL-10 e Interferón-gamma (IFN-γ) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa como testigo positivo, en células de bazo totales, por la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa. 4.- La expresión de moléculas de memoria y/o activación y de regiones variables de la cadena β del receptor de antígeno de la célula T, en linfocitos T totales.

Los resultados obtenidos en las dos cepas de ratones, mostraron una respuesta muy similar frente a las porinas estudiadas. 1.- Se presentaron títulos de anticuerpos desde el primer día después de la segunda inmunización, que alcanzaba un pico de mayor producción al día 17 y mantenía hasta el día 30. 2.- Los anticuerpos porina-específicos de la cepa B6 presentaron predominantemente la subclase IgG2b, mientras que en la cepa D2 fue la subclase IgG2a. 3.- Se detectó la presencia de RNA mensajero para las citocinas IL-4 e IFN-γ en esplenocitos estimulados *in vitro*, y el RNA mensajero para la citocina IL-12 en macrófagos de peritoneo. La presencia del RNAm para la citocina IL-4 en ambas cepas, se observó al inicio (células no inmunes) y durante la estimulación. El RNAm para IFN-γ apareció en la cepa B6 a partir de las 10 horas, permaneciendo hasta las 18 horas; mientras que en la cepa D2 se detectó a partir de las 6 horas y permaneció hasta las 10 horas. El RNAm para la citocina IL-12 se presentó sólo en la cepa B6 al tercer día después de la segunda inmunización. 4.- Las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T inmunes, expresaron un fenotipo de memoria y/o

activación demostrado por la pérdida en la expresión de L-selectina (CD62L, proteína de expresión alta en linfocitos no activados, y baja expresión en linfocitos de memoria y/o activados) y un aumento en la expresión de la molécula CD44 (proteína de expresión alta en linfocitos no activados y alta expresión en linfocitos de memoria y/o activados), comportamiento que se denomina CD44^{high}/CD62L^{low}, por las moléculas que expresan. 5.- Las anteriormente mencionadas subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, expresaron además las regiones variables 17a, 8.1/8.2/8.3 en las cadenas β de su respectivo receptor.

Por los resultados obtenidos, se concluye que las porinas como inmunógenos poderosos son capaces de activar importantes mecanismos de la respuesta inmune. En primer lugar, la producción de anticuerpos con isotipos IgG2a e IgG2b pertenecientes a una respuesta de tipo celular o tipo Th1 establecida. Estos anticuerpos tienen la particularidad de ayudar a los macrófagos en algunas de sus funciones efectoras, opsonizando a los antígenos facilitando su fagocitosis, y fijando complemento para el control y erradicación de la *Salmonella* y/o sus antígenos. En segundo lugar, la presencia de los RNAm para las citocinas IFN- γ e IL-12, hace constar la diferenciación y establecimiento de células TCD4 con fenotipo Th1, que pertenecen a una respuesta inmune tipo Th1. Este tipo de respuesta se ha determinado como el principal mecanismo en contra de infecciones provocadas por bacterias intracelulares, como es el caso de *Salmonella*, participando principalmente linfocitos T y macrófagos. Y en tercer lugar, las clonas de linfocitos TCD4 y TCD8 porina-específicas pertenecientes a la población tipo Th1, mostraron el fenotipo de memoria y/o activación, y regiones específicas (V β 17a y V β 8.1/8.2/8.3) en el receptor de la célula T, que posiblemente reconocen epítopos inmunodominantes de las porinas.

En consideración a que las porinas de *S. typhi* son responsables de una potente respuesta inmune efectora y protectora en la que participan tanto anticuerpos como linfocitos T CD4 y T CD8, se propone que el efecto protector podría atribuirse a que la respuesta inmune inducida por la inmunización con las porinas estudiadas, es de tipo celular confirmado por el patrón de RNAm expresado para citocinas tipo Th1 y por los isotipos de anticuerpos propios de este tipo de respuesta. Paralelo a este mecanismo, esta la inducción de memoria de los linfocitos T específicos, además de presentar receptores restringidos para el reconocimiento de péptidos de las porinas.

L- INTRODUCCION

1.1. 1. Infección por *Salmonella*

Las *Salmonellas* ingeridas por vía oral se dirigen al intestino delgado y atraviesan el epitelio intestinal, asociándose posteriormente a las células M en las placas de Peyer, donde se diseminan vía linfática a todo el sistema sanguíneo y al sistema fagocítico mononuclear, para ser fagocitadas por los macrófagos dentro de los cuales sobreviven y se multiplican, localizándose dentro de las vacuolas endosomales ó fagosomas. Posteriormente el fagosoma se fusionará con los lisosomas para formar el fagolisosoma activándose dentro de ellos diversos mecanismos oxidativos y no oxidativos (3); de ahí son transportadas a los ganglios linfáticos regionales, el bazo y el hígado, donde la bacteria continúa multiplicándose, llegando a alcanzar una densidad de 1×10^8 bacterias/órgano, para finalmente diseminarse por vía sanguínea (4). Esto conduce a una bacteremia incontrolable y al choque endotóxico, que causa rápidamente la muerte. El mecanismo básico de patogenicidad de todas las *Salmonellas* es su capacidad de invadir (penetrar), sobrevivir y multiplicarse en diferentes tipos de células del huésped tales como células epiteliales y macrófagos. (5).

1.1.2. Fiebre Tifoidea

La fiebre tifoidea es causada por la ingestión e invasión masiva de *Salmonella typhi*. Se caracteriza por síntomas sistémicos como la fiebre, malestar general, cefalea, y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen la hemorragia intestinal en el 2 al 8 % de los casos y la perforación que se presenta en el 3 al 4% . La tasa de letalidad es de alrededor del 1%; sin embargo, en los casos complicados, como en niños, en ancianos y en pacientes desnutridos, puede ascender hasta el 30% (1).

Las investigaciones encaminadas a identificar a los antígenos de *Salmonella typhi* relacionados directamente con la protección y la respuesta inmune del humano han sido numerosas; la mayoría dirigidas hacia el estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático " O " (endotoxina o lipopolisacárido), el flagelar " H " , el capsular " Vi " y las proteínas de membrana externa (principalmente las porinas).

Salmonella typhi

Salmonella typhi es un bacilo no esporulado perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, género *Salmonellae* y especie *Salmonella typhi*, gram negativo, móvil, que mide de 2 a 3 μm , es citolítico, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido, es lactosa y sacarosa negativos. Tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno

H o flagelar y al antígeno somático O que contiene carbohidratos específicos útiles en su identificación serológica (2).

1.1. 3. Respuesta inmune contra *Salmonella*

El macrófago lleva a las *Salmonellas* al sistema linfático en donde se inicia la respuesta del hospedero. Tanto la respuesta humoral como la celular es requerida en su totalidad ante la infección por *Salmonella* (27). Los linfocitos T 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* (28-31). En ratones la inducción de la respuesta inmune citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺ se desencadena, debido a que el macrófago fagocita a la *Salmonella*, procesa los antígenos de ésta y presenta péptidos a través de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CPH); siendo aún desconocido el mecanismo del procesamiento, aunque recientemente se han propuesto algunas vías (32-35).

1.2.1. Porinas

La membrana de las bacterias Gram-negativas las protege del medio externo, pero a su vez debe permitir un intercambio de solutos y solventes necesarios para el microorganismo. Las porinas, proteínas de la membrana externa* de las bacterias Gram-negativas cumplen con ésta función, formando canales de difusión facilitada con un límite de exclusión de aproximadamente 600 Da (6,7).

Estas proteínas de membrana externa tienen un peso molecular entre 38 y 42 kDa. Las porinas *Omp C*, *Omp F* y *Pho E* fueron identificadas en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*; mientras que la porina *Omp D* está presente exclusivamente en *S. typhimurium* y hasta la fecha *Omp C* en *Salmonella typhi*. Todas ellas son muy semejantes entre sí y tan sólo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos, presentan alta estabilidad en presencia de detergentes como sales biliares y dodecil-sulfato de sodio (SDS), y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas (19,20).

a).- Estructura y función.

Las porinas están formadas por tres monómeros idénticos, cada monómero es un polipéptido de 336 residuos en promedio. Los estudios cristalográficos realizados en *Omp F* y *Pho E*, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å, respectivamente muestran que la unidad estructural es un barril beta (dibujo 1) formado por 16 regiones de bandas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas alfa-hélices intercaladas.

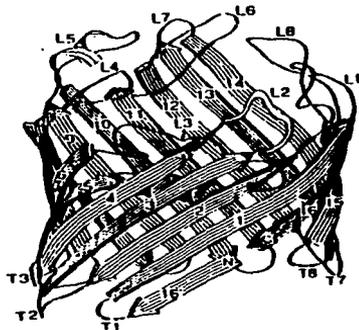
* Probablemente se refieren en la literatura a la pared celular de la bacteria.

El cilindro se forma al cerrarse las estructuras beta de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la banda beta-16 y el extremo amino de la banda beta-1(8). En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, el cual está rodeado por dos "cinturones" de aminoácidos aromáticos que le permiten una interacción con la membrana externa y anclarse a la misma (9). La entrada del poro la delimitan grandes prolongaciones del cilindro (asas largas y disparejas), que al inclinarse hacia el centro del canal generan un diámetro de 11 Å a 19 Å, reduciéndose el diámetro del poro por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior; esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones (15 x 22 Å) hasta el otro extremo, el cual desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria (8). El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas, y por tanto son estas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros. Los monómeros de las porinas se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa formando los trímeros (21). Contrariamente a lo que antes se creía, los canales no se fusionan dentro del mismo trímero, sino que están bien separados por una distancia de > 35 Å (8). La principal contribución a la formación del trímero es el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas beta 1-5 y beta 16, donde los diez residuos carboxilo de la región beta 16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y la estabilidad de la porina (22,23).

Las porinas que se encuentran en la superficie de la bacteria son muy numerosas, (hasta 1×10^9 copias por célula), por lo que constituyen una de las proteínas más abundantes en la bacteria; en términos de masa pueden representar hasta un 2% de la proteína total celular. Hasta el momento, las porinas más estudiadas son las de *E. coli* y *S. typhimurium* (20).

Las condiciones de crecimiento, así como la actividad osmótica y la temperatura, regulan la expresión de las porinas. En un medio de cultivo común (que contenga fuentes de C y N, factores de crecimiento y sales minerales) sólo se expresan Omp F, Omp C y Omp D; mientras que la porina PhoE únicamente se produce bajo condiciones de escasez de fosfatos. La expresión de Omp F se reprime por la temperatura y la osmolaridad elevadas. Por el contrario, la expresión de Omp C se ve favorecida con niveles elevados de sales (19).

Al realizar los estudios *in vitro* en los que se reconstituyen las porinas en membranas lipídicas, se ha demostrado que las porinas de *E. coli* son permeables a trisacáridos y tetrapéptidos, lo que implica que permiten el paso de nutrientes y iones a través de la membrana externa de la bacteria.



Dibujo 1 Estructura de un monómero de la porina OmpF de *Escherichia coli*. Tomado de J.P. Roscnbush. Nature 1992 Vol. 358 pp. 727-733.

Además, la medición de la conductancia (G) en estas membranas, ha permitido calcular el diámetro de los poros (19). No hay información que muestre una especificidad del poro a solutos; aparentemente las propiedades fisicoquímicas de los solutos son las que determinan su velocidad de difusión a través de la porina, principalmente el tamaño, la carga eléctrica y la hidrofobicidad del soluto (21).

b).- Inmunesogenicidad de las porinas de *Salmonella typhi*.

Las porinas de *Salmonella typhi* desempeñan un importante papel en la inducción de una respuesta inmune. Se ha demostrado que estas proteínas estimulan mecanismos efectores humorales y celulares en el modelo del ratón, además de inducir un estado de protección contra la infección por la bacteria (10-12).

Isibasi y cols. (12-17) estudiaron la capacidad de las proteínas de membrana externa (PME's) de la cepa vacunal 9,12 Vi:d de *Salmonella typhi*, de conferir protección al ratón contra el reto de la bacteria viva. Demostraron que la inmunización con extracto de 15 diferentes PME's de *Salmonella typhi*, que también contenía 4% de LPS como contaminante, induce un estado de inmunidad protectora; la protección también se logró con la transferencia pasiva de un suero de conejo anti-PME, lo que sugirió la participación de la respuesta inmune humoral; sin embargo al estudiar la respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos T, es evidente una respuesta inmune preferentemente de tipo celular.

El análisis por inmunoelectrotransferencia del suero policlonal anti-PME, demostró que los anticuerpos, estaban dirigidos en contra de las porinas, lo que sugirió que dichas proteínas podían ser los antígenos responsables de la protección observada. Esta propuesta ha sido confirmada de dos diferentes maneras; primero la inmunización con 5 µg de una preparación que contiene dos porinas y menos del 0.04 % de LPS, es capaz de conferir protección contra el reto de *Salmonella typhi* así como protección parcial contra *Salmonella typhimurium*; mientras que con 10 µg de ésta misma preparación proporciona más del 90 % de protección contra el reto de ambas cepas de *Salmonella*; ésto señala que las porinas son antígenos protectores, indicando además la preferencia de epitopos de reacción cruzada en la estructura de las porinas de *Salmonella*. Además, la administración pasiva de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas de la cepa 9,12,Vi:d de *S. typhi* confirieron protección hasta del 60% al reto con 20 DL₅₀ en el modelo del ratón (25), mientras que los anticuerpos monoclonales antilipopolisacárido no indujeron protección (26).

Además se ha identificado a la Omp C como una de las dos porinas que participan en el establecimiento de la inmunidad contra *Salmonella typhi*, ya que la porina Omp C recombinante es capaz de inducir una protección del 30% al reto con 100 DL₅₀ de la bacteria viva (15-18).

Por otro lado, los estudios realizados en pacientes en fase aguda y en fase de convalecencia de fiebre tifoidea, así como en individuos vacunados con la cepa de *S. typhi* Ty-2, evidencian en todos los casos la presencia de anticuerpos anti-porinas de isotipo IgG, concluyendo así que las PME son inmunogénicas tanto en el modelo del ratón como en el humano (13,14). Por los resultados anteriormente señalados, se ha propuesto a las porinas de *S. typhi* como candidatos en la elaboración de una vacuna contra la fiebre tifoidea.

2.1.1.- Linfocitos T y subpoblaciones.

2.1.1.1.- Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺

Los linfocitos T juegan un papel central en la respuesta inmune ya que llevan a cabo una serie de funciones efectoras y de regulación; para ello se requiere del contacto intercelular y/o de la secreción de citocinas y de algunas otras moléculas. Los linfocitos T se dividen en dos grupos según la expresión de las moléculas de superficie celular, CD4 y CD8. La expresión de estas moléculas se adquiere durante su desarrollo en el timo, que correlaciona con diferencias funcionales: los linfocitos T CD4⁺ liberan una amplia variedad de interleucinas indispensables para la inducción de una respuesta inmune por ejemplo, para la proliferación y diferenciación de linfocitos B, la actuación de macrófagos ó el reclutamiento de otras poblaciones celulares, por lo cual se dice que llevan a cabo la función "cooperadora" y se designan como linfocitos Th (h: helper, cooperadores). Las células T CD8⁺ lisan a las células blanco de manera antígeno-específica y por tanto se designan linfocitos T citotóxicos (Tc). La expresión de las moléculas CD4 y CD8 se correlaciona con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) que restringen el reconocimiento del antígeno: las células T CD4⁺ reconocen al antígeno generalmente en el contexto de moléculas clase II del CPH, mientras que la respuesta de las células T CD8⁺ está restringida por moléculas de clase I del CPH (36).

a).- Linfocitos T CD4⁺

Las células T CD4⁺ se dividen en dos poblaciones de acuerdo a las cadenas del receptor para el antígeno (TCR) que expresen.

Linfocitos T CD4⁺ αβ

El TCR que presentan estas células se compone de dos cadenas polipeptídicas llamadas α y β, unidas covalentemente entre sí por enlaces disulfuro. La cadena α es una glicoproteína ácida de

40 a 50 kDa, y la cadena β es una glicoproteína neutra o básica de 40 a 50 kDa. Existen similitudes estructurales entre las cadenas α y β del TCR y las cadenas de las Ig. Las cadenas α y β tienen un dominio variable (V) y un dominio constante (C). La región V está codificada por un gen V y uno de unión (J, del inglés joining), y sólo en el caso de la cadena β , por un gen de diversidad (D). Este TCR se encuentra asociado en la superficie al complejo CD3 constituido por las cadenas polipeptídicas γ , δ , ϵ , ζ ; es importante señalar por que se requiere de la presencia de ambos complejos (TCR-CD3) para las funciones del linfocito.

Linfocitos T CD4⁺ $\gamma\delta$

El TCR $\gamma\delta$ es un segundo tipo de heterodimero unido por enlaces disulfuro asociado al CD3, que se expresa en un pequeño subgrupo de células T periféricas negativas para el $\alpha\beta$, y en timocitos inmaduros. Las cadenas γ y δ son glicoproteínas transmembranales con estructuras similares a las cadenas α y β (36).

2.2.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺

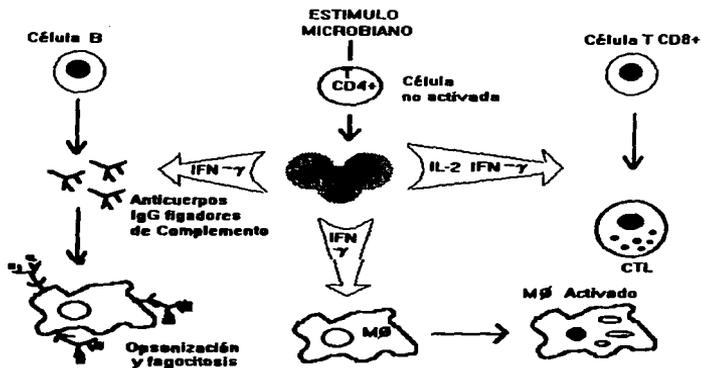
a).- Subpoblaciones Th1/Th2.

Mosmann y cols. (42), definieron en el ratón la existencia de dos subpoblaciones de clones de linfocitos T CD4⁺ con base en el patrón de citocinas que secretan y las designaron: Th1 y Th2 (39).

Linfocitos Th1

Los linfocitos Th1 producen principalmente interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral beta ó linfo toxina (TNF- β) (dibujo 2). Esta población participa en reacciones inflamatorias mediadas por células ó lo que se conoce como hipersensibilidad de tipo tardía (DTH) (41-43). El IFN- γ estimula en los linfocitos B el cambio de isotipo de anticuerpos, presentándose principalmente IgG2a, IgG2b e IgG3(46); éstas subclases de anticuerpos tienen la capacidad de opsonizar bacterias u otros antígenos particulados favoreciendo su fagocitosis, además de fijar y activar el complemento ayudando de tal manera en las funciones efectoras de los macrófagos.

Una respuesta predominante de tipo Th1 es el aumento de varios mecanismos citotóxicos, comenzando con la secreción de IFN- γ y TNF- β que activan a los macrófagos, aumentando su capacidad de destruir a los microorganismos intracelulares y células tumorales aumentando la producción, de derivados reactivos del oxígeno (ROI), óxido nítrico a través



Dibujo 2. Funciones efectoras de la subpoblación Th1 CD4⁺. Las células TCD4⁺ en reposo tras el estímulo microbiano son diferenciadas hacia Th1, teniendo como principal característica el producir IL-2 e IFN-γ; esta última citocina tiene importantes funciones efectoras en la diferenciación y mantenimiento de la respuesta Th1. Además de activar de manera importante a los macrófagos los induce a producir sustancias microbicidas. El IFN-γ induce el cambio de isotipo de anticuerpos en las células B a IgG2a principalmente, éstos anticuerpos activan el complemento y favorecen la fagocitosis. Otra importante función del IFN-γ, es activar a los linfocitos T CD8⁺ aumentando su actividad citotóxica. Tomado de A.K. Abbas. *Nature* 1996.

de la enzima óxido-nítrico-sintetasa (NOS), además de incrementarse la expresión de moléculas clase I y II del CPH, y de receptores para la Fc (Fc- γ) de anticuerpos de la subclase IgG2a, isotipo de anticuerpo involucrado en la muerte celular por fijación de complemento.

Linfocitos Th2

Esta población tiene la característica de liberar una amplia gamma de citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13). Esta población participa en la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B. En ésta respuesta humoral ó tipo Th2 existe una fuerte producción de anticuerpos de isotipo IgG1 e IgE, favorecida principalmente por la IL-4. El anticuerpo IgE favorece la función y proliferación de mastocitos y eosinófilos (dibujo 3).

b).- Factores que afectan la diferenciación Th1/Th2.

No se conoce con certeza el origen de las poblaciones Th1 y Th2 por lo que se ha propuesto dos posibles modelos. En el modelo A, se habla de un precursor individual, la célula Th0, que puede diferenciarse a Th1 ó Th2 dependiendo de la célula presentadora de antígeno (CPA). El modelo B propone la existencia de los precursores de las dos subpoblaciones: TH1P y TH2P, las cuales están comprometidas para dar el fenotipo de secreción de linfocinas antes de la estimulación inmunogénica. El modelo de Swain (41), señala la existencia de un célula precursora pTh, efectoras eTh, de memoria mTh y con fenotipo de Th1 y Th2, Th0.

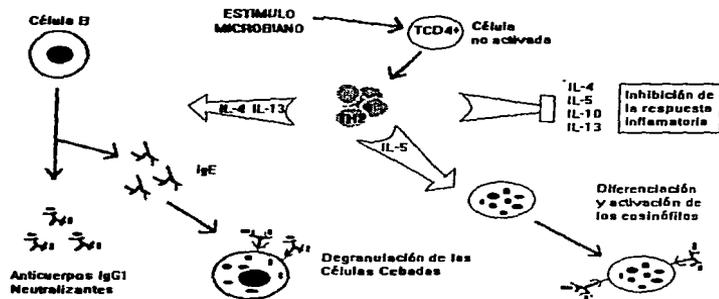
Existe una serie de factores que van a determinar la polarización de la respuesta inmune Th1/Th2, entre los que se encuentran a las citocinas, la naturaleza y dosis del antígeno, el tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), y la expresión de hormonas y de moléculas accesorias.

I.- Linfocinas y citocinas

En la diferenciación de las células CD4⁺ hacia Th1 ó Th2, intervienen una serie de citocinas, principalmente IL-12 e IL-4 como las responsables de éste balance.

IL-12 (Interleucina-12)

La IL-12 es una citocina heterodimérica de 70 kDa formada por dos cadenas glicosiladas, de 40 kDa y de 35 kDa, producida principalmente por macrófagos ó células fagocíticas en respuesta a bacterias, productos bacterianos y parásitos intracelulares, y en menor proporción por linfocitos B.



Dibujo 3 Funciones efectoras de la subpoblación Th2 CD4+. La respuesta de tipo Th2 ó respuesta inmune humoral generada tras el estímulo microbiano, se caracteriza por la presencia de las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las citocinas IL-4 e IL-13 tienen la capacidad de inducir en las célula B el cambio de isotipo de anticuerpos a IgG1 e IgE, éstos últimos favorecen la desgranulación de las células cebadas, activando además a los eosinófilos. Tomado de A.K. Abbas. *Nature* 1996.

Células T CD4⁺ y CD8⁺ clonadas en presencia de IL-12, son capaces de producir grandes cantidades de IFN- γ , mientras que la producción de IL-4 es mínimamente afectada por la presencia o ausencia de IL-12 (42,43,46), lo que indica que la IL-12 tiene un efecto directo en la diferenciación de todas las células T.

La inhibición de las células productoras de IL-4, es un efecto probablemente selectivo de la IL-12 que favorece a las productoras de IFN- γ , así como la proliferación y el establecimiento de las clonas Th1 (dibujo 4) (38).

IFN- γ (Interferón-gamma)

El IFN- γ es una glicoproteína homodimérica de 21 a 24 kDa (36), que tiene la capacidad de diferenciar a las células T CD4⁺ en células Th1 productoras del mismo. Esta linfocina es el principal factor de las células Th1, teniendo como función principal la de activar macrófagos aumentando su acción microbicida; estimula la producción de anticuerpos IgG involucrados en la opsonización y fagocitosis de microbios particulados con ayuda de IL-12 (41). Como factor de mantenimiento de la población Th1, inhibe la proliferación de células que producen IL-4 (células Th2), además de disminuir a las poblaciones que en un inicio se diferencian en linfocitos Th2.

IL-4 (Interleucina-4)

La IL-4 es un miembro de las citocinas α helicoidales. Esta interleucina estimula el cambio de isotipo de cadena pesada de las células B, produciendo anticuerpos de isotipo IgG1 e IgE principalmente. Además, inhibe la activación del macrófago y bloquea la mayor parte de los efectos activadores sobre el macrófago por efecto del IFN- γ , incluida la producción aumentada de citocinas como la interleucina-1 (IL-1), el óxido nítrico y las prostaglandinas (37,38). La IL-4 previene la diferenciación a células productoras de IFN- γ (células Th1) aún en presencia de IL-12, teniendo el mismo efecto supresor que tiene IL-12 hacia Th2.

En sistemas *in vitro* se ha demostrado que al estar presentes la IL-4 e IL-12, no disminuye la cantidad de IL-4 producida durante una reestimulación antigénica; por lo tanto se estima que la IL-4 es dominante sobre IL-12 en la inducción del fenotipo productor de citocinas (45,48,49).

IL-10 (Interleucina-10)

Citocina homodimérica de 35 kDa producida principalmente por células Th0, Th2 y en macrófagos (sólo por efecto endotóxico).

La IL-10 inhibe fuertemente la síntesis de IFN- γ y la proliferación de las células T ya que bloquea la producción de IL-2, así como las funciones efectoras de las clonas Th1. En macrófagos inhibe sus funciones incluyendo, presentación de antígenos a clonas Th1 y algunas propiedades microbicidas. Por otro lado, la IL-10 aumenta la proliferación de las células cebadas o mastocitos y la secreción de anticuerpos (44).

IL-2 (Interleucina-2)

Glicoproteína de 14 a 17 kDa producida por células T CD4 y en menor cantidad por las CD8; originalmente llamada factor de proliferación de la célula T, que funciona como factor autócrino y parácrino (36).

La IL-2 aparece como requerimiento para el desarrollo de células Th1 o Th2 pero no es determinante para su diferenciación (38,47), aunque se le ha clasificado como citocina de las clonas Th1.

2.- Dosis de antígeno

La dosis del antígeno es otro factor que afecta la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia Th1 ó Th2. A concentraciones bajas de el antígeno ó infecciones con baja dosis de antígeno tienden a inducir preferentemente respuestas de tipo Th1, mientras que con altas dosis se inducen respuestas de tipo Th2. Aun se desconocen los mecanismos que rigen éstos efectos, es posible que las principales CPA's a dosis bajas de antígeno sean células dendríticas y macrófagos, ambas producen IL-12 y promoverían la diferenciación hacia Th1; mientras que a dosis altas de antígeno las CPA's no productoras de IL-12 (células B), favorecerían el desarrollo de Th2 (41).

3.- Tipos de células presentadoras de antígeno (CPA)

Los diferentes tipos de CPA afectan la diferenciación de los linfocitos T, dentro de éstas se encuentran las células dendríticas y los macrófagos que los llevan a diferenciarse hacia Th1; mientras que las células B los conducen hacia Th2 (40).

4.- Moléculas coestimulatorias

Otro factor muy importante es el efecto de las moléculas coestimulatorias que pueden selectivamente influir en la diferenciación de la célula T.

La inducción y activación de los linfocitos T requieren de dos señales de la célula presentadora de antígeno (CPA). La primera señal es el enlace del TCR con el complejo antígeno-MHC, que provee especificidad, mientras que la segunda señal está dada por las moléculas coestimuladoras expresadas en las CPA's, B7.1 y/o B7.2 con sus ligandos en linfocitos T (CD28 y/o CTLA-4). Tanto B7.1 como B7.2 se expresan constitutivamente en células dendríticas y macrófagos. B7.1 participa en la interacción con CD28 coestimulando la proliferación del linfocito T, antígeno y mitógeno dependiente; además en la producción de IL-2 (53,54). B7.1 aparece como la molécula coestimuladora más potente en la estimulación de respuestas inflamatorias ó tipo Th1 (55); mientras que B7.2 parece ser la molécula responsable en el inicio de las respuestas humorales en los linfocitos T ó tipo Th2 (56-59).

2.3.1.- Subpoblaciones de células T CD8⁺ Tc1 / Tc2

Mosmann y cols. en un principio descubrieron la existencia de dos tipos de células T CD4⁺ que se diferencian en base al patrón de citocinas que expresan denominándose Th1 ó Th2. Recientemente se ha descrito la existencia de dos poblaciones dentro de los linfocitos T CD8⁺, que en base al patrón de citocinas encontradas se denominaron Tc1 y Tc2. Al igual que las células Th1 y Th2, las poblaciones de CD8⁺ necesitan de IL-12 ó IL-4 para diferenciarse. En los linfocitos Th1 y Th2 se tienen bien definidas sus funciones, pero no así los linfocitos Tc1/Tc2, reconociendo solamente las correspondientes citocinas que los identifican.

En sistemas *in vitro* los linfocitos T CD8⁺ muestran una fuerte desviación hacia Tc1, en comparación a los linfocitos T CD4⁺ que es menor. Contrastando con ésto los linfocitos T CD8 para diferenciarse a Tc2 requieren de IL-4, anti-IFN- γ ó ambos elementos; no así los linfocitos T CD4 que espontáneamente se diferencian hacia Th2. Las citocinas producidas por los linfocitos T CD8 son las mismas que para los linfocitos T CD4, con la única diferencia de que los primeros las producen en una menor proporción (60).

Otro rasgo importante que comparten tanto los linfocitos T CD4 como T CD8, es el fenotipo de memoria y/o activación, donde células no activadas de ambas poblaciones presentan el fenotipo CD45RB^{int}/CD62L^{int}/CD44^{low}, mientras que ésta mismas células activadas *in vitro*, presentan el fenotipo CD45RB^{high}/CD62L^{low}/CD44^{high} (61).

3.1.1.- Memoria en células T.

La memoria se define como la capacidad de generar una rápida y efectiva respuesta inmune después de exposiciones sucesivas al antígeno, protegiendo por largo tiempo a un posible reencuentro con el agente patógeno (62). A pesar de recientes evidencias en estudios y análisis que involucran al factor de diferenciación y maduración de células B y T, aún se considera

controvertido el fenotipo de las células de memoria (63). Las células de memoria al estar en contacto con el antígeno que las originó proliferan, expresando en su superficie altos niveles de las moléculas CD2, CD44, CD29, LFA-1, LFA-3, y VLA4-6 y bajos niveles de CD62L (L-selectina), CD27 y receptor de IL-2 (64).

Los linfocitos T efectores y de memoria muestran un patrón de recirculación diferente al de las células T en reposo o no activadas, diferencia que se debe en gran parte a la expresión de moléculas de unión al endotelio. La migración selectiva de los linfocitos T no activados a los órganos linfoides o de los linfocitos T memoria a los lugares de inflamación se denomina "homing".

La importancia fisiológica de estas vías de "homing" diferentes, es que los linfocitos T en reposo o no activados migran preferentemente a los órganos linfoides, donde reconocen y responden a antígenos extraños (las fases de reconocimiento y activación de una respuesta primaria) mediante la alta expresión de CD62L, receptor "homing" para adhesión a HEV. Mientras que los linfocitos T memoria a través de la alta expresión de otro receptor "homing" (CD44), migran preferentemente a los tejidos periféricos inflamados para eliminar a los antígenos (fase efectora ó respuesta secundaria).

a).- CD44 (Pgp-1, proteína de diferenciación presente en células de memoria).

Es una glicoproteína de membrana de 80-100 kDa, expresada en varias formas y con glicosilaciones variables en una variedad de tipos celulares incluidas las células T maduras, timocitos, células B, macrófagos, entre otros. El CD44 se une al hialuronato lo que en parte es responsable de la unión de la célula T al endotelio (molécula "homing") en los lugares en que tiene lugar la inflamación y quizás a las HEV de las placas de peyer. El CD44 puede actuar también en la retención de las células T en los tejidos extra vasculares (36).

b).- CD62L (L-Selectina, proteína de diferenciación presente en células no activadas).

Es una glicoproteína de 90-110 kDa que sirve como receptor "homing" en células migratorias, leucocitos, dendríticas y macrófagos principalmente. Tiene como papel importante la migración de linfocitos a nódulos linfáticos, y en el proceso de inflamación expresándose en diferentes sitios específicos. La expresión de éste marcador es alta en linfocitos T no activados o en reposo, y bajo en células de memoria; se ha reportado además ser un marcador de proliferación y maduración en células T. El anticuerpo monoclonal que reconoce ésta molécula se denomina MEL-14.

El tráfico de linfocitos hacia las venas endoteliales altas (HEV) de los nódulos linfáticos es dependiente de la expresión de CD62L (65).

Por todos éstos antecedentes se propone el estudiar los mecanismos inmunes que se puedan llegar a inducir por la inmunización con las porinas de *S. typhi*, proteínas altamente inmunogénicas, que han sido profundamente estudiadas y que por sus propiedades se les ha postulado candidato vacunal.

II.- HIPOTESIS

Siendo *Salmonella typhi* un patógeno intracelular, y las porinas potentes inmunógenos responsables de una respuesta protectora, éstas podrían inducir una respuesta de linfocitos T CD4 de tipo Th1, en la cual la producción de IFN- γ y anticuerpos IgG2a opsonizantes y fijadores de complemento, colaboran en el combate de la infección.

II- OBJETIVOS

Objetivo General.

• Analizar el tipo de respuesta inmune que se induce al inmunizar con porinas de *S. typhi*, ratones de dos cepas con diferente susceptibilidad genética a *Salmonella*.

Objetivos Particulares.

- Estandarizar las condiciones de estimulación *in vitro* de células de bazo de ratón.
- Determinar si el tipo de respuesta que induce la inmunización con porinas, es humoral y/o celular mediante el análisis de los isotipos de anticuerpos y el patrón de citocinas.
- Si la respuesta es de tipo celular, analizar la capacidad de las porinas para inducir memoria inmunológica.
- Conocer el repertorio de linfocitos T específicos inducidos por las porinas, a través del análisis de las regiones variables de la cadena β (VB's) del TCR.

IV.- METODOLOGIA

1.1.1.- Animales utilizados

Grupos de 5 ratones hembras de 6-8 semanas de edad aproximadamente (peso aproximado de 20 a 25 grms.) de cada una de las cepas DBA/2 (D2) y C57BL/6J (B6) (provenientes del bioterio de la Facultad de Química, Conjunto E Cd. Universitaria).

1.1.2. Esquema de inmunización.

Día 0 : Sangía pre-inmunización a los respectivos grupos de ratones y administración por vía intraperitoneal de 30 µg de una preparación de porinas de *Salmonella typhi* existente en el laboratorio, por ratón. A los animales testigo se les administró 100 µl del amortiguador de alta fuerza iónica Nikaido pH 7.7 (Apendice)*.

Día 10: Administración de 30 µg de porinas de *Salmonella typhi* por vía i.p. Los animales testigo recibieron de nuevo 100 µl del amortiguador Nikaido.

Día 20: Sangrado de ratones y obtención del bazo y/o macrófagos.

2.1.1.- Preparación del antígeno.

Para el uso del antígeno en cultivo celular, la preparación de porinas (que contiene dos porinas, la porina OmpC y otra porina aún no caracterizada, pero con comportamientos electroforético y espectrofotométricos muy similares) se precipitó con acetona en una proporción 1:6 (porinas:acetona) en tubos Corex, dejándose a temperatura ambiente toda la noche. Los tubos se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 20 minutos y se decantó la acetona. El precipitado ya seco se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% con amortiguador N-[2-Hidroxiethyl] piperazina-N'[2-ácido etanolsulfónico] (HEPES) 25mM pH 7.4, y se ajustó a una concentración de 1 mg/ml. Para su esterilización se sometió a 10,000 rads de radiación gamma (Irradiador de cesio). Para la inmunización de los animales, el antígeno se administró en amortiguador de Nikaido.

3.1.1.- Ensayo de proliferación *in vitro* de linfocitos T.

De cada grupo de ratones inmunizados se tomó uno y se sacrificó para extraerle el bazo, el cual se disgregó, y cada suspensión celular se centrifugó a 1,200 r.p.m. durante 6 min. Los paquetes celulares se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de lisis de eritrocitos (previamente calentado a 37°C) y se incubaron a la misma temperatura por 2 ó 3 minutos. Cada paquete celular se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos (PBS) 70 mM pH 7.2 y se resuspendió en 1 ml de

* La composición y preparación de las soluciones utilizadas se encuentran en el Apendice.

medio Roswell Park Memorial Institut (RPMI) al 10% de suero fetal bovino (SFB). La suspensión celular de cada bazo se pasó individualmente por columnas con fibra de nylon y placas inmunoadsorbentes para la purificación de linfocitos T (punto 3.1.2.). Finalmente se ajustaron a 2×10^6 células/ml.

De los esplenocitos totales, el 25-30% son macrófagos, los cuales se utilizaron como células presentadoras de antígeno (CPA's); para su separación se obtuvieron a partir de bazo de un ratón no inmune, siguiendo el procedimiento anterior hasta obtener el paquete celular libre de eritrocitos. Estos esplenocitos totales se irradiaron a 1,500 rads y ajustaron a 5×10^6 células/ml. El antígeno se trabajó a diferentes concentraciones; para los linfocitos T (LT) provenientes de la cepa B6 fueron 10, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 $\mu\text{g/ml}$, y para los LT de la cepa D2 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$. En placas de 96 pozos de fondo plano, se cultivaron los linfocitos T, CPA y el antígeno. Los linfocitos T se colocaron en dos concentraciones 2×10^5 y 1×10^6 por ml, mientras que la concentración de células presentadoras fue constante (5×10^6 cel/ml). Todos las concentraciones de antígeno fueron trabajadas por triplicado. Las placas permanecieron 72 horas a 37°C / 5% CO_2 y 18 hr antes de finalizar el cultivo, se agregó 1 $\mu\text{-Ci}$ / pozo de Timidina-Tritiada ($\text{Ti}^3\text{-H}$). Para el cultivo se utilizó Dulbecco's Modified Eagle Medium (D'MEM) 20% SFB. Finalmente se congelaron las placas para favorecer el lisado celular, y con ayuda del cosechador de células se recolectó en papel de fibra de vidrio la timidina tritiada. La cuantificación se realizó con un contador Beta (Beckman LS6000 SE) utilizando líquido de centelleo.

3.1.2.- Evaluación de la pureza de los linfocitos T mediante citometría de flujo.

Esta metodología se realizó para evaluar el grado de purificación de linfocitos T, provenientes de bazo de ratones no inmunes e inmunes. Para la purificación de los linfocitos T de animales no inmunes, se realizó como se señala en el punto anterior. La suspensión celular resultante en medio RPMI 10% SFB, se pasó a través de una columna con fibra de Nylon de 10 ml (previamente incubada a 37°C durante 45 minutos) y se incubó 1 hora a 37°C / 5% CO_2 . Al término de la incubación, la columna se lavó con 20 ml de medio RPMI al 10% de SFB y las células resultantes se centrifugaron a 1 200 r.p.m. durante 8 min. El botón de células resultante se resuspendió en 5 ml de medio y se vertió en una placa inmunoadsorbente + y se incubaron durante 30 a 45 min. a 37°C / 5% CO_2 . Las células no adherentes se recuperaron con una pipeta, teniendo

+ ver preparación de placas inmunoadsorbentes.

cuidado de no desprender las células adheridas; el sobrenadante se centrifugó a 1,200 r.p.m. por 7 minutos, y el botón resultante ó linfocitos T se resuspendió en PBS al 2% de SFB y se ajustó a 1×10^5 células/pozo en placas de 96 pozos de fondo redondo (Nunc Co.), prosiguiendo con el siguiente esquema de tinción.

ESQUEMA DE DOBLE TINCIÓN PARA EL ANALISIS DE PUREZA DE LINFOCITOS T.

Condiciones	control (-)	Mφ's	Linfocitos T	
30min 4°C	PBS	anti-Mac1	PBS	1er. paso
Lavar dos veces c/ 200 µl PBS c/u a 1800 r.p.m 2 min.				
30min 4°C	Rat. Biotin	Rat. Biotin	PBS	2do. paso
Realizar el lavado como el anterior				
30min 4°C	PE	PE	PBS	3er. paso
Realizar el lavado como el anterior				
30min 4°C	PBS	PBS	Thy 1.2	4to. paso
Realizar el lavado como el anterior				
30min 4°C	rata-FITC	ratón-FITC	ratón-FITC	5to. paso
Realizar el lavado como el anterior				
300 µl	Y. P.	Y. P.	Y. P.	6to. paso

Después de agregar el Yoduro de Propidio (Y.P.) a las muestras, de inmediato se analizaron en el citómetro de flujo (FACSort Becton Dickinson).

Leyenda del esquema de tinción.

anti-Mac 1: IgG anti-Mac1 de macrófagos de ratón; Rat. Biotin: IgG de cabra anti-IgG de rata conjugado a Biotina; PE : Estreptoavidina - Ficoeritrina (naranja) FL-2; Thy 1.2: IgG anti-Thy 1.2 de ratón; ratón-FITC ó rata-FITC: IgG anti-ratón ó anti-rata conjugado a FITC (verde) FL-1 Y.P.: Yoduro de Propidio (rojo).

Nota: Las células de bazo (provenientes de animales inmunizados) estimuladas *in vitro* utilizadas para el estudio de la expresión de fenotipo de activación y/o memoria y regiones variables de la cadena δ (V δ 's) del TCR, no se pasaron a través de columnas de Nylon, solamente por placas inmunoadsorbentes.

+ Placas inmunoadsorbentes (técnica de "paning").

Para la preparación de las placas se colocaron 50 µl del fragmento F(ab')₂ de cabra anticadena Mu de ratón (µ chain), más 5 ml de PBS estéril por placa (caja petri estéril), y se incubaron por 30 min a 37°C. El PBS con el anticuerpo remanente ó no adherido se retiró, y se utilizó para nuevas placas. Las placas ya recubiertas con el anticuerpo ("paning") se sellaron con una película elástica y guardaron en el congelador Revco de -20°C.

Estas placas se utilizaron para quitar células B por inmunoadsorción, de células de bazo previamente pasadas a través de la columna de Nylon, aumentando la pureza de los linfocitos T. En células estimuladas *in vitro* se utilizaron 2 placas inmunoadsorbentes, ya que no se pasaron por columna de Nylon.

4.1.1.- Esquema de Titulación e Isotipificación de anticuerpos porina-específicos mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) directo e indirecto.

ELISA directo para la titulación

- 1.- Porinas de *S. typhi* fijadas.
- 2.- Sueros de ratones inmunes y no inmunes.
- 3.- Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa.
- 4.- Visualización con OPD.

ELISA indirecto para la isotipificación.

- 1.- Porinas de *S. typhi* fijadas y anti-isotipos de cabra.
- 2.- Sueros de ratones inmunes, no inmunes y testigos positivos.
- 3.- Anti-isotipos anti-Ig de ratón (cabra).
- 4.- Anti-Ig de cabra conjugado con PO (problemas) y anti- IgG de ratón conj. a PO.
- 5.- Visualización con OPD.

4.1.1.1. Titulación de anticuerpos por ELISA-directo.

Se tomaron muestras de sangre de la parte posterior del globo ocular de ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*, los días 1, 3, 5, 8, 17 y 30 post-segunda inmunización. Se separaron los sueros y se analizaron mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) según se describe brevemente.

Se sensibilizaron placas de poliestireno con 5 µg de porinas/pozo en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5 y se incubó durante 2 hr a 37°C. Posteriormente se retiró el amortiguador de carbonatos, la placa se lavó 4 veces con PBS-Tween al 0.1 %, y se procedió a bloquear los sitios no cubiertos por el antígeno con PBS-leche al 5%, para ello se incubó durante 2

hr a 37°C. Posteriormente se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween al 0.1 %. Después se incubó durante 2 hr a 37°C los sueros problema, testigos positivos y testigos negativos en diferentes diluciones: 1:50, 1:100 y 1:200 todos por triplicado y se lavó la placa 7-8 veces (lavado muy importante). Para revelar la presencia de anticuerpos anti-porinas de isotipo IgG, se utilizó un anticuerpo IgG de cabra acoplado con peroxidasa anti-ratón en una dilución 1:1000, incubando 2 hr a 37°C. El anticuerpo se retiró y se lavó de 8-10 veces. Finalmente se adicionó el sustrato (H₂O₂ 1:1000 + 1 mg/ml de OPD, en amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.6), dejándose desarrollar el color durante 10-15 minutos. La reacción se paró adicionando 50 µl de H₂SO₄ 2.5 N por pozo. La lectura se realizó en un lector para ELISA a 492 nm (Labsystems Multiskan Multisoft).

4.1.1.2.- Isotipificación de anticuerpos mediante ELISA-indirecto.

Esta metodología es una variante de la anterior (4.1.1.). Se utilizaron placas sensibilizadas con las porinas (5µg/pozo) y en las mismas se sensibilizaron pozos con los anticuerpos anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG2b (anti-isotipos) en dilución 1:1000 en PBS, para el corrimiento de los testigos positivos. Se retiró el amortiguador de carbonatos y el PBS, y la placa se lavó 4 veces; se bloquearon los pozos de la placa con PBS-leche al 5% y se incubó 2 hr a 37°C. De nuevo la placa se lavó y los sueros problema (utilizados en el punto 4.1.1.), testigos negativos y testigos positivos (Y3, AF6-RD.12, WG132 y BBM.1) se incubaron durante 2 hr a 37°C. Los testigos positivos se colocaron de 1 a 3 µg/pozo. La placa se lavó 8 veces y se adicionaron los diferentes anticuerpos anti-isotipos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA), tanto a los sueros problema como a los testigos negativos, incubándolos durante 2 hr a 37°C. La placa se lavó 8 veces y se adicionó el anticuerpo marcado con peroxidasa anti-Inmunoglobulinas de cabra, a los sueros problema y testigos negativos; y el anticuerpo anti-IgG de ratón a los testigos positivos, incubando la placa durante 2 hr a 37°C. Finalmente se adicionó el sustrato y se realizó la lectura a 492 nm en el lector para ELISA.

5.1.1.- Estimulación *in vitro* de células de bazo para la determinación de RNA mensajero de citocinas por RT-PCR.

Se sacrificaron ratones inmunizados con porinas de *S. typhi* de ambas cepas para la extracción de bazos, estos se disgregaron y se obtuvieron las suspensiones celulares libres de eritrocitos (punto 3.1.1.). Los esplenocitos se estimularon *in vitro* a una concentración de 3×10^6 células/ml en botellas de 25 cm² (Corning) con 100 µg/ml de porinas. El cultivo se mantuvo a 37°C / 5% CO₂ y se siguió la cinética, tomando alícuotas de 3 a 5 ml a diferentes tiempos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 18 hr. Se lavaron las células dos veces con PBS y por centrifugación se retiró

todo el líquido, finalmente se guardaron los paquetes celulares en tubos Eppendorf estériles en un congelador (Revco) de -70°C hasta su posterior análisis.

A partir de estas células se analizó la presencia de los RNA mensajeros para diferentes citocinas (punto 5.1.4.)

5.1.2.- Obtención de macrófagos de peritoneo de ratón.

Ratones de las cepas B6 y D2 inmunizados con porinas de *S. typhi* se sacrificaron al 1er, 3er y 5to día después de la segunda inmunización, para la obtención de macrófagos de peritoneo. Con ayuda de un equipo de disección se les retiró el pelaje exponiendo el peritoné, al cual se le inyectó 3 ml de PBS frío con una jeringa, hasta que estuvieran distendidos. Después de 5 minutos de frotamiento se recolectaron los macrófagos, con la misma jeringa y se colocaron en un Eppendorf estéril. El paquete celular recuperado se centrifugó a 1,200 r.p.m. y las células se lavaron dos veces con PBS. Finalmente el botón celular se guardó en un congelador de -70°C , para su posterior análisis.

Nota: A partir de los macrófagos de peritoneo se determinó la presencia de RNAm para IL-12 mediante RT-PCR.

5.1.3.- Extracción de RNA Total.

Los paquetes celulares provenientes de las alícuotas de esplenocitos cultivados *in vitro* ó de macrófagos de peritoneo guardados en el congelador de -70°C , se descongelaron para la extracción del RNA. Como primer paso, se adicionó 1 ml de TRIzol^o por cada 5 a 10 millones de células, favoreciendo la lisis con ayuda del vortex; el homogeneizado se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se adicionó 0.2 ml de cloroformo frío por ml de TRIzol, se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos y se incubó durante 2 a 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14 mil r.p.m. por 15 minutos a 4°C . La mezcla presentó dos fases, una inferior de color rosa ó fase fenol-cloroformo, una interfase de proteínas totales y la fase superior incolora ó fase acuosa, donde permanece exclusivamente el RNA. La fase acuosa se transfirió a tubos estériles y se les adicionó 0.5 ml de isopropanol frío por ml de TRIzol. Se mezclaron en el vortex por 10 segundos, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14 mil r.p.m. 10 minutos a 4°C . Como último paso se decantó el sobrenadante y se lavó el RNA con 1 ml de etanol frío al 75% (por ml de TRIzol utilizado) con ayuda del vortex. Finalmente se centrifugó a 7,500 r.p.m. 5 minutos a 4°C . El etanol se removió por centrifugación-vacío durante 10 minutos y se dejó secar el RNA. El botón de RNA (transparente como gel) se resuspendió en

^o Ver Apéndice

agua estéril ó agua tratada con dietil-piro-carbonato (DEPC, inhibidor de RNAsas), incubando a 68°C para su completa disolución durante 20 ó 30 minutos. Posteriormente se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm (U.V.) haciendo una dilución 1:100. Tomando además la lectura a 280 nm para determinar contaminación por proteínas.

Aplicando la fórmula:

$$RNATotal: A_{260nm} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 100 = \mu\text{g/ml RNA}$$

A_{260nm} = Absorbancia tomada a 260 nm

40 $\mu\text{g/ml}$ = constante de concentración de RNA

100 = factor de conversión

Para conocer la contaminación por proteínas se aplicó la siguiente fórmula:

$$A_{260nm} / A_{280nm} > \text{ó} = 1.6 \text{ (RNA óptimo)}^*$$

* Es muy importante que esté casi libre de proteínas el RNA, de lo contrario no sirve para el análisis.

5.1.4.- RT-PCR (Transcripción reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Esta técnica parte de la utilización de RNA total, del cual se obtendrá cDNA por la técnica de Transcripción reversa y es amplificado por la técnica de PCR.

A partir del RNA total proveniente de las células estimuladas *in vitro* y de los macrófagos de peritoneo, se analizó la presencia de los RNA mensajeros que codifican para las siguientes citocinas: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ y GAPDH como testigo positivo, con la finalidad de conocer que patrón presentan éstas células.

Nota : El RNA antes de usarse se hirvió por 10 minutos, para desnaturalizar las estructuras secundarias que se hallan formado, colocándolo rápidamente en hielo.

RT

Reactivo	Concentración	Volumen
*RNA	1 μg	Según la concentración
*MgCl ₂	5 mM	4 μl (stock 25 mM)
*Amortiguador de reacción para la RT	1 x	4 μl (stock 5 x)
*dNTP's (mezcla de nucleótidos)	1 mM	2 μl (stock 10 mM)
*Inhibidor de RNAsas	1 U	1 μl (Dilución 1:40 del stock 40 U/ μl)
*Hexameros ó Iniciador 2	1 x	2 μl hexameros (stock 10 x) ó 3 μl iniciador 2 (Dilución 1:10 del stock 4.7 pmol/ μl)

*Transcriptasa-reversa (AMV)	5 U	2 μ l (Dil. 1:10 stock 25 U/ μ l)
*Agua estéril	c.b.p.	20 μ l (volumen total)

Condiciones de reacción: Cuando se utilizan Hexameros: 10 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C y 5 minutos 94°C \rightarrow 1 Ciclo
 Cuando se utilizó el Iniciador 2: 45 minutos a 42°C y 5 minutos a 94°C \rightarrow 1 Ciclo

Antes de terminada la corrida de RT, se prepararon las mezclas para la PCR adicionando los reactivos en nuevos tubos en la siguiente secuencia (excepto el cDNA y la enzima Taq):

PCR

Reactivo	Concentración	Volumen
*cDNA	-	20 μ l (Vol. de rx. de la RT)
*MgCl ₂	2 mM	4 μ l (stock 2.5 mM)
*Amortiguador de reacción para la Taq Pol.	1 x	8 μ l (stock 10x)
*Iniciador 1	-	3 μ l (dil. 1:10 stock 4.7 pmol/ μ l)
*Iniciador 2	-	3 μ l (dil. 1:10 stock 4.7 pmol/ μ l)
*Enzima Taq Pol.	2 U	2 μ l (dil. 1:5 stock 10 U/ μ l)
*Agua estéril	c.b.p.	100 μ l (Volumen total)
Aceite mineral	\rightarrow	30 μ l

Condiciones de reacción: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1.5 minutos a 72°C \rightarrow 40 ciclos

Al terminar la reacción se mantuvieron las muestras en hielo.

5.1.5.- Análisis de los productos de DNA obtenidos por la técnica RT-PCR de las diferentes citocinas, mediante electroforesis.

Se prepararon geles de agarosa al 1.5%, disolviendo 1.5 g de agarosa en 100 ml del amortiguador TAE⁺, calentando para favorecer la disolución. Ya fundida la agarosa se adicionaron 3 μ l de bromuro de etidio y se vertió en la cámara de electroforesis, colocando los peines para la aplicación de las muestras dejándolo solidificar. Después se agregó el amortiguador sobre el gel hasta cubrirlo, se retiraron los peines y se procedió a introducir las muestras en las ranuras, tomando 5-7 μ l de los productos de RT-PCR mezclados con amortiguador de muestra para electroforesis (stop-mix).

⁺ Ver Apéndice

Finalmente se aplicó una fuerza electromotriz de 45 ó 60 volts por espacio de 1 a 2 hr para el adecuado corrimiento de las muestras. El gel se observó en un analizador de imágenes de U.V. (IS-1000 Digital imaging system).

6.1.1.- Análisis de la expresión de moléculas de activación y/o memoria mediante inmunofluorescencia indirecta (CD62L y CD44) y de las regiones variables de la cadena β (VB's) del receptor para antígeno de la célula T (TCR) en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T.

Para el análisis de la expresión de éstas moléculas, así como la purificación de los LT (3.1.2.), se utilizó un citómetro de flujo. Este aparato se basa en incidir sobre cada una de las células de una muestra, una fuente de luz láser, determinando de manera concisa su tamaño y complejidad; mientras que si las células fueron teñidas con algún fluorocromo (FITC, PE, etc.), el mismo aparato determinará la intensidad de fluorescencia y el porcentaje de las células fluorescentes (células positivas).

Para éste análisis se partió de células de bazo que provenían de animales inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*, libres de eritrocitos y estimuladas *in vitro* por espacio de 3 y 5 días (según 5.1.1). En el momento del análisis, las células se cosecharon y purificaron pasándolas a través de dos placas inmunoabsorbentes (3.1.2.). Finalmente los linfocitos T purificados se colocaron en placas de fondo redondo, ajustados a 1×10^5 células/pozo. Los linfocitos T se resuspendieron en 200 μ l de PBS y centrifugaron a 1,800 r.p.m. 2 min., el PBS se retiró y se prosiguió con el siguiente esquema de tinción. Este esquema incluye el análisis de CD62L (L-selectina), CD44 y las regiones variables 6, 11, 17a y 8.1/2/3 de la cadena β del TCR, además del análisis de purificación de los linfocitos T (3.1.2.).

Nota: Para el análisis de las regiones 8.1/8.2/8.3, se utilizó un sólo anticuerpo que reconoce una función conservada en las tres regiones.

Leyenda del esquema para la doble tinción realizada a los linfocitos T CD4 y T CD8.

Rat.Biotin = IgG de cabra anti-rata conjugado a Biotina; Thy 1.2 = IgG anti-Thy 1.2 de linfocitos T de ratón; PE = Estreptoavidina-Ficoeritrina (naranja) FL2; anti-Mac1 = IgG anti-Mac1 de macrófagos de ratón; rat-FITC = IgG anti-rata conjugado a FITC (verde) FL1; ratón-FITC = IgG anti-ratón conjugado a FITC (verde) FL1; Y.P. = Yoduro de Propidio (rojo)

ESQUEMA DE DOBLE TINCION EN LINFOCITOS T CD4 (6.1.1.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	
Incubación	Control (-)	CD4/CD62L	CD4/CD44	CD4/CD8	CD4/Vβ6	CD4/Vβ11	CD4/Vβ17a	CD4/Vβ8	
30 min. 4°C	200µl PBS	Se adicionó 200 µl de anticuerpo anti-CD4 a cada uno de los pozos (del 2 al 8).							1er. paso

Se lavaron las células 2 veces con PBS al 2% de SFB, centrifugando a 1,800 r.p.m.

30 min. 4°C	Se adicionó 200 µl (10µg/ml) de IgG de cabra anti-rata conjugado a Biotina a todos los pozos (1-8).	2do. paso
-------------	---	-----------

REALIZAR EL LAVADO COMO SE REALIZO ANTERIORMENTE.

30 min. 4°C	Se adicionó 100µl de Estreptoavidina-Ficoeritrina (PE) a 10µg/ml a todos los pozos (1-8).	3er. paso
-------------	---	-----------

REALIZAR EL LAVADO COMO SE REALIZO ANTERIORMENTE.

30 min. 4°C	PBS	anti-CD62L	anti-CD44	anti-CD8	anti-Vβ6	anti-Vβ11	anti-Vβ17a	anti-Vβ8	4to. paso
----------------	-----	------------	-----------	----------	----------	-----------	------------	----------	-----------

30 min 4°C	A los pozos 1-6 se adicionó 100µl del IgG anti-rata conjugado a FITC (10µg/ml).	100µl de IgG ratón-FITC	5to. paso
------------	---	-------------------------	-----------

REALIZAR EL LAVADO COMO SE REALIZO ANTERIORMENTE.

Se resuspendieron las células en 500 µl de Yoduro de Propidio (Y.P.) a una concentración de (10µg/ml), pasándose a tubos individuales, y de inmediato se leyeron las muestras en el citómetro de flujo.	6to paso
---	----------

ESQUEMA DE DOBLE TINCION EN LINFOCITOS T CD8 (6.1.1.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Incubación	CD8/CD62L	CD8/CD44	CD8/Vβ6	CD8/Vβ11	CD8/Vβ17a	CD8/Vβ8	LT	Mφ's	control (-)	
30 min. 4°C	Se adicionó 200 µl de anticuerpo anti-CD8 a los pozos 1 al 6.						PBS	anti-Mac	PBS	1º paso

Se lavaron las células 2 veces con PBS al 2% de SFB centrifugando a 1,800 r.p.m.

30 min. 4°C	Se adicionó 200 µl (10µg/ml) de IgG de cabra anti-rata conjugado a Biotina a todos los pozos (1-9).	2do. paso
-------------	---	-----------

REALIZAR EL LAVADO COMO SE REALIZO ANTERIORMENTE.

30 min. 4°C	Se adicionó 100µl (10µg/ml) de Estreptoavidina-Ficoentrina (PE) a todos los pozos (1-9).	3er. paso
-------------	--	-----------

REALIZAR EL LAVADO COMO SE REALIZO ANTERIORMENTE.

30 min. 4°C	anti-CD62L	anti-CD44	anti-Vβ6	anti-Vβ11	anti-Vβ17a	anti-Vβ8	anti-Thy1.2	PBS	PBS	4to. paso
-------------	------------	-----------	----------	-----------	------------	----------	-------------	-----	-----	-----------

30 min 4°C	Pozos 1-4, 100µl del IgG anti-rata- FITC (10µg/ml).	100µl IgG anti-ratón conj. a FITC (10µg/ml)..	PBS	5to. paso
------------	---	---	-----	-----------

REALIZAR EL LAVADO COMO SE REALIZO ANTERIORMENTE.

Se resuspendieron las células en 500 µl de Yoduro de Propidio (Y.P.) a una concentración de 10µg/ml, pasándose a tubos individuales, y de inmediato se leyeron las muestras en el citómetro de flujo.

6to. paso

V. RESULTADOS

1.- Ensayo de proliferación de linfocitos T contra porinas de *Salmonella typhi*.

Con el propósito de conocer las condiciones óptimas de estimulación *in vitro*, y obtener una máxima proliferación de linfocitos T provenientes de ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*, se determinó el número de linfocitos T y concentración de antígeno que se requería para llevarlo a cabo en placas de 96 pozos. En la figura 1A se puede observar que la máxima respuesta de proliferación se obtuvo con 125 µg/ml de antígeno y 2×10^6 de linfocitos T/ml para la cepa C57BL/6J (B6); mientras que para DBA/2 (D2) esta respuesta (figura 1 B) se obtuvo con 100 µg/ml de antígeno y 2×10^6 linfocitos T/ml. Estos resultados fueron aplicados en los subsecuentes experimentos en los que se analizaron la expresión de RNA mensajero para citocinas, regiones variables de la cadena β (V β 's) del TCR, y determinación del fenotipo de linfocitos T activados y/o de memoria.

2.- Determinación del patrón de expresión de RNA mensajero de citocinas mediante la técnica de RT-PCR.

Con la finalidad de conocer el patrón de citocinas que expresan una población de esplenocitos totales estimulada *in vitro* con porinas de *Salmonella typhi*, se analizó la presencia de RNA mensajero (RNAm) para las siguientes citocinas: IL-2, IL-4, IL10 e IFN- γ y en macrófagos de peritoneo, IL-12. En la figura 2 A se muestra la cinética de expresión de RNAm para interferón gamma (IFN- γ) en la cepa B6, donde se expresa a partir de las 10 horas (carril 5) de estimulación un producto aproximadamente de 570 pb que permanece hasta las 18 horas, observándose la mayor intensidad a las 12 y 14 hr (carriles 6 y 7); mientras que en la cepa D2 el RNAm de IFN- γ apareció desde las 6 horas y permaneció hasta las 10 horas (carriles 3 al 5). La presencia del RNAm para interleucina-4 (IL-4) se dió en ambas cepas desde el inicio de la estimulación e incluso en esplenocitos de ratones no inmunes (carril 1, figuras 3A y 3B), disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de estimulación. Como testigo positivo se analizó la expresión de RNAm para GAPDH (Gliceraldehido-3-Fosfato-Deshidrogenasa), a las cero horas no detectó, pero durante la estimulación *in vitro* la expresión se mantuvo constante (figura 4).

La expresión de RNAm para IL-12 se determinó en macrófagos de peritoneo (*in vivo*) observando que en la figura 5, se detectó al 3er día después de la segunda inmunización. El testigo positivo GAPDH se detectó al primer, tercer y quinto día post-inmunización.

Nota: No se muestran resultados de la expresión de RNAm para las citocinas IL-2 e IL-10.

3.- Evaluación de la generación de anticuerpos porina-específicos de respuesta secundaria, provenientes de animales inmunizados con porinas de *S. typhi*.

Con el objeto de evaluar los títulos de anticuerpos (respuesta humoral) inducidos por la inmunización de animales con porinas de *Salmonella typhi*, se analizaron los sueros provenientes de éstos animales mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) según lo señalado en métodos (4.1.1.). En la figura 6 se presenta la curva de generación de anticuerpos y cada punto determinado representa el triplicado del título 1:100 de cada uno de los sueros. Desde el primer día después de la segunda inmunización se presentaron anticuerpos específicos; conforme el tiempo transcurría aumentaba la producción de los anticuerpos, observándose un pico de mayor respuesta al día 17 y permaneciendo hasta el día 30 en que se realizó la última determinación. Este comportamiento fue muy similar para ambas cepas.

4.- Determinación de los isotipos de anticuerpos porina-específicos inducidos por la inmunización con porinas, mediante la técnica de ELISA-indirecta.

Para determinar los isotipos de los anticuerpos anti-porinas se analizaron los sueros del experimento anterior (figura 6), mediante ensayos inmunoenzimáticos-indirectos (ELISA). En la figura 7A que corresponde a la cepa B6 se presentó una respuesta humoral mediada por anticuerpos IgG2b e IgG3 y en menor proporción IgG1 e IgM; mientras que en D2 (figura 7B), se detectó los anticuerpos IgG2a e IgG2b (figura 7B). Cabe señalar que el análisis se llevó a cabo utilizando dilución 1:100 de los sueros del pico máximo de respuesta secundaria (días 17 y 30).

5.- Evaluación de la pureza de linfocitos T totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi*.

Para el análisis de la expresión de moléculas involucradas en la generación de memoria inmunológica de linfocitos T, se necesitaba contar con una población que presentara una elevada pureza, por lo que mediante por inmunofluorescencia indirecta se determinó el porcentaje de células contaminantes. Para el análisis se utilizó el anticuerpo anti-Mac1 para conocer el porcentaje de macrófagos contaminantes, observándose en la figura 8 A que un 6% correspondía a dicha población, el 1% a linfocitos B y el 92% de células negativas que corresponde a linfocitos T; mientras que cuando se utilizó el anticuerpo anti-Thy 1.2 contra linfocitos T totales (figura 8B), se obtuvo entre el 90% y 92% de linfocitos T o Thy 1.2+ y el 8% células No T, este porcentaje correspondía a los macrófagos y linfocitos B mostrados en la figura 8A. Este análisis se realizó a los 0,1,3 y 5 días post-estimulación *in vitro* para ambas cepas (según métodos 3.1.2. y 6.1.1.), presentando todos ellos patrones de purificación muy similares.

6.- Determinación del fenotipo de memoria y/o activación en linfocitos T purificados de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi*.

Con la finalidad de conocer el fenotipo de memoria y/o activación en linfocitos T provenientes de ratones inmunizados con porinas, se realizó una cinética en donde se estimularon los linfocitos T (LT) *in vitro*, y a los días 0, 3, y 5 se tomaron y analizó, por inmunofluorescencia indirecta, la expresión de las moléculas CD62L y CD44 involucradas con el fenotipo de memoria inmunológica. Estas moléculas indican la migración selectiva de los LT en reposo ó activados y/o de memoria, hacia los diferentes sitios donde se encuentre el antígeno.

Nota: En todos los histogramas de las figuras 9 a la 16, se mide en las abscisas la intensidad de fluorescencia I (FL1-Height) que corresponde a la cantidad de moléculas analizadas, expresadas en las células; mientras que en las ordenadas se muestra el número de eventos ó número de células. M1 y M2 corresponden a las regiones (ó poblaciones) 1 y 2, siendo la M1 la población "positiva" para la molécula que se está analizando, donde debe colocarse entre 10^2 y 10^4 de FL1; y la M2 es la población "negativa" ó la que expresa en menor proporción dicha molécula, colocándose entre 10^0 y 10^2 de FL1. En cada región se representa el porcentaje de la población, así como la media de fluorescencia (MF), ésta última es la media de la intensidad del canal de fluorescencia (que en forma práctica significa un promedio de la cantidad de moléculas presentes en las células "positivas").

La pérdida en la expresión de la molécula CD62L ó L-selectina indica la presencia del fenotipo de memoria y/o activación en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T provenientes de las cepas B6 y D2 inmunizados con porinas de *S. typhi*.

En la figura 9 se presentan las cinéticas (A y B) de expresión de la molécula CD62L ó L-selectina en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa B6.

La cinética A corresponde a linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) que corresponde a linfocitos no inmunes, observándose una sola población con el 78% (M1) que expresa gran cantidad de la molécula CD62L, presentando una media de fluorescencia de 668. La población M2 con tan sólo el 22% se considera que no expresa CD62L. Al día 3 (A2) se observa que la población M1 aumentó de 78% a 92% y la media de fluorescencia de 668 a 758, aumentando el número de

células que expresa CD62L en mayor proporción. Al día 5 (A3) M1 disminuyó de 92% a 45%, aumentando a la media de fluorescencia de 758 a 816. Mientras que la población M2 que no expresa CD62L aumentó a 55%.

La cinética B que corresponde a los linfocitos T CD8, presenta un comportamiento semejante a la cinética A. Al día 0 (B1) la región M1 presenta la población que expresa una elevada concentración de CD62L con 95% y media de fluorescencia de 1241, siendo mayor la expresión de esta molécula a la presentada por los linfocitos TCD4 (A1). Al día 3 (B2) la población M1 disminuyó ligeramente de 95% a 92%, así como la MF de 1241 a 891; esto da como resultado un aumento ligero de la población M2, que presenta baja expresión de CD62L (8%). Al día 5 (B3) se observa la misma tendencia a los días anteriores, donde el porcentaje de la población M1 que expresa CD62L disminuyó a 52% así como la intensidad de fluorescencia a 756.

En la figura 10 se presentan las cinéticas (A y B) de expresión de la molécula CD62L en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa D2. Esta cinética presenta un comportamiento similar a la cepa B6.

La cinética A corresponde a linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) el 75% de la población total o M1 expresó una gran cantidad de CD62L con una fluorescencia media de 701. Al día 3 (A2) la población M1, disminuyó de 75% a 67% sin cambio significativo en la intensidad de fluorescencia (790); mientras que la población con baja expresión de CD62L ó M2 aumentó de 25% a 33%. Al día 5 (A3) se presenta la misma tendencia a los días anteriores, la población M1 disminuyó de 67% a 54%, así como la media de fluorescencia a 576; en tanto que la población M2 aumentó de 33% a 46%.

La cinética B corresponde a la cinética de expresión de CD62L en los linfocitos T CD8. Al día 0 (B1) se presenta una población mayoritaria (M1) que expresa gran cantidad de CD62L con el 88% y 995 de media de fluorescencia. Al día 3 (B2) M1 aumentó ligeramente de 88% a 90% disminuyendo la MF a 604. Al día 5 (B3) esta misma población disminuyó de 90% a 59% aumentando ligeramente las unidades de fluorescencia a 714.

En las cinéticas A y B correspondientes a las figuras 9 y 10 (de ambas cepas), en las dos subpoblaciones de células T (CD4 y CD8), se presenta el mismo efecto en la disminución en la expresión de CD62L, al aumentar el tiempo de estimulación con el antígeno.

El aumento en la expresión de la molécula CD44 en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T específicos, pone de manifiesto un fenotipo de memoria y/o activación en contra de las porinas de *S. typhi* en ratones inmunizados de las cepas B6 y D2.

En la figura 11 se presentan las cinéticas (A y B) de expresión de la molécula CD44 en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa B6.

La cinética A corresponde a la expresión de CD44 en linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) se presentan dos poblaciones una de ellas más grande (M1) con el 54% y 1232 de media de fluorescencia, la cual expresa la molécula CD44 en mayor proporción; mientras que la población M2, no es totalmente negativa a expresar CD44 ya que presenta 90 de media de fluorescencia. Al día 3 (A2) la población M1 prácticamente se mantuvo (53%) pero la intensidad de fluorescencia aumentó de 1232 a 1316. Al día 5 (A3) M1 aumentó ligeramente de 53% a 56%, presentando una media de fluorescencia máxima de 2102. El aumento en la media de fluorescencia registrado, significa una mayor concentración de moléculas CD44 en la superficie celular.

En la cinética B se observa el comportamiento de CD44 en los linfocitos T CD8. Al día 0 (B1) se observan dos poblaciones, M1 que expresa gran cantidad de moléculas CD44 con 66% y 1203 de MF y M2 con 34% presentando baja expresión por tener 119 de media de fluorescencia. Al día 3 (B2) las poblaciones M1 y M2 no presentaron cambio en los porcentajes, pero la media de fluorescencia de la población M1 disminuyó casi dos veces su valor, de 1203 a 698. Al día 5 (B3) la población M1 disminuyó de 66% a 62%, aumentando la MF casi 3 veces su valor de 698 a 1862, por lo que el número de moléculas CD44 aumentó 3 veces más con respecto al día 3.

En la figura 12 se presentan las cinéticas (A y B) de expresión de la molécula CD44 en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa D2.

La cinética A corresponde a la expresión de CD44 en linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) se presenta sólo una población bien definida con el 77% (M1) y 1285 de media de fluorescencia, la cual expresa CD44 en alta proporción; mientras que la otra población (M2) con 23% y 120 de MF, expresa en menor proporción la misma molécula. Al día 3 (A2) la población M1 aumentó de 77% a 89%, así como la MF de 1285 a 1686. Al día 5 (A3) M1 disminuyó de 89% a 39%, mientras que la media de fluorescencia aumentó de 1686 a 2192, por lo que ésta población al parecer pequeña

expresa una mayor concentración de moléculas en la superficie celular. La población M2 aumentó de 11 a 61%, expresando baja cantidad de CD44 por presentar 80 de media de fluorescencia.

La cinética B presenta el comportamiento de CD44 en linfocitos T CD8. Al día 0 (B1) la población M1 con 75% que expresa en mayor proporción CD44, presenta 1307 de intensidad de fluorescencia. Al día 3 (B2) M1 disminuyó de 75% a 66%, mientras que la media de fluorescencia aumentó de 1307 a 1740. Al día 5 (B3) las dos poblaciones que se presentan al día 3 se encuentran más definidas; M1 disminuyó de 66% a 28%, disminuyendo la MF a 1566. Mientras que M2 aumentó de 34% a 72% y la MF disminuyó de 180 a 129, presentando una expresión media de CD44.

El comportamiento de la molécula CD44 es muy similar en las cinéticas A y B de las dos cepas correspondientes a las figuras 11 y 12, aumentando la expresión a medida que el tiempo de estimulación transcurría.

La tendencia en las subpoblaciones de los linfocitos T (CD4 y CD8) en la disminución de la expresión de CD62L, y por lo consecuente el aumento en la expresión de CD44 al aumentar el tiempo de estimulación, le hemos asignado el fenotipo CD44^{low}/CD62L^{low}.

7.- El análisis de la expresión de regiones variables de la cadena β del TCR, determina un repertorio restringido de linfocitos T-específicos en ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*.

De acuerdo con los resultados anteriores, para el análisis de las regiones variables de la cadena β del TCR, se partió de linfocitos T estimulados *in vitro* con las porinas a los días 0, 3 y 5. Las regiones de estudio fueron 6, 11, 17a y 8.1/8.2/8.3. Como en el análisis anterior, los histogramas presentan en las ordenadas, # de eventos y en la abscisas, la intensidad de fluorescencia 1 (FL1-height).

Linfocitos T CD4 y T CD8 provenientes de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi* de las cepas B6 y D2 expresan la región VD17a en el receptor de la célula T, restringido para el reconocimiento ciertos epitopos de las porinas.

En la figura 13 se presentan las cinéticas (A y B) de expresión de la región variable 17a de la cadena β del TCR en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa B6.

La cinética A corresponde a linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) linfocitos no inmunes, se presenta la población M2 con el 98% y media de fluorescencia de 6 que no expresa la región variable 17a de la cadena β en el TCR. Al día 3 (A2) M1 con el 16%, expresa la región VB17a con 325 de media de fluorescencia. Al día 5 (A3) M1 aumentó del 16% a 80% sin cambio significativo en la media de fluorescencia.

La cinética B muestra la expresión de la misma región VB17a en los linfocitos TCD8. Al día 0 (B1) la población M2 con el 96% no expresa la región VB17a. Al día 3 (B2) la población M1 aumentó de 4% a 31% presentando 362 de intensidad de fluorescencia, por lo que la región VB17a se expresa en alta proporción. Al día 5 (B3) M1 aumentó ligeramente de 31% a 36% expresando VB17a en una mayor cantidad, por el aumento de la media de fluorescencia de 362 a 840.

En la figura 14 se observan las cinéticas (A y B) de expresión de la región variable 17a de la cadena β TCR en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa D2.

La cinética A corresponde la expresión de VB17a en linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) la población M1 con 97% y 5 de MF no expresa la región VB17a. Al día 3 (A2) la población M1 con 14% expresa VB17a en mayor concentración, presentando 455 de intensidad de fluorescencia. Al día 5 (A3) M1 aumentó de 14% a 81% disminuyendo la media de fluorescencia de 455 a 312.

La cinética B muestra la expresión de la región VB17a en linfocitos TCD8. Al día 0 (B1) la mayor parte de la población CD8 con 96% (M2) no expresa la región VB17a. Al día 3 (B2) M1 aumentó de 4% a 72%, expresando VB17a en elevada proporción presentando una MF de 460. Al día 5 (B3) M1 se incrementó de 72% a 85% manteniéndose alta la MF.

En las cinéticas A y B (de ambas cepas) se observa el aumento en el número de células T, tanto CD4 como CD8, que expresan la región VB17a; así como el número de receptores en la superficie celular. Este cambio es muy significativo al día 5.

La inmunización de ratones de las cepas B6 y D2 con porcinas de *S. typhi*, induce la proliferación de linfocitos T CD4 y T CD8 que expresan las regiones VB8.1/8.2/8.3.

En la figura 15 se observan las cinéticas (A y B) de expresión de las regiones variables 8.1/8.2/8.3 de la cadena β del TCR en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa B6.

La cinética A corresponde al comportamiento de VB8.1/2/3 en linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) linfocitos no inmunes, M2 con el 57% no expresan la región VB8.1/2/3; mientras que M1 con el

43% y 102 de media de fluorescencia si expresa la región. Al día 3 (A2) M1 aumentó de 43% a 68% manteniéndose la media de fluorescencia. Al día 5 (A3) M1 aumentó de 68% a 78%, así como la media de fluorescencia 3 veces más, de 115 a 355.

En la cinética B se presenta la expresión de la región V β 8.1/2/3 del TCR en linfocitos TCD8. Al día 0 (B1) M2 con 92% no expresan la región V β 8.1/2/3. Al día 3 (B2) M1 con 13% si expresan la región V β 8.1/2/3, presentando una media de fluorescencia de 432. Al día 5 (B3) M1 aumentó de 13 % a 92%, así como dos veces la MF, de 432 a 853.

En la figura 16 se observan las cinéticas (A y B) de expresión de las regiones variables 8.1/8.2/8.3 de la cadena β del TCR en las subpoblaciones CD4 y CD8 de los linfocitos T, de la cepa D2.

La cinética A corresponde a la expresión de V β 8.1/2/3 en linfocitos T CD4. Al día 0 (A1) M2 con 92% no expresaron la región V β 8.1/2/3. Al día 3 (A2) M1 aumentó de 8% a 64% expresando la región V β 8.1/2/3 presentando 110 de MF. Al día 5 (A3) M1 aumentó de 64% a 92%, así como la media de fluorescencia 3 veces más, de 110 a 386.

En la cinética B se presenta la expresión de la región V β 8.1/2/3 del TCR en linfocitos TCD8. Al día 0 (B1) el 60% de los linfocitos TCD8 (M2) no expresaron en el TCR la región V β 8.1/2/3, mientras que el 40% (M1) con 138 de MF, si la expresaron. Al día 3 (B2) M1 disminuyó a 22%, aumentando la media de fluorescencia más de 3 veces (454). Al día 5 (B3) ésta misma población aumentó hasta el 90%, registrando 359 de MF.

En las cinéticas A y B (ambas cepas) de las figuras 15 y 16, se observa como aumenta el número de células T, tanto CD4 como CD8, que expresan la región ó regiones V β 8.1/8.2/8.3, siendo mayor al día 5; así como el número de receptores (TCR's) que presentan dicha región ó regiones en la superficie celular.

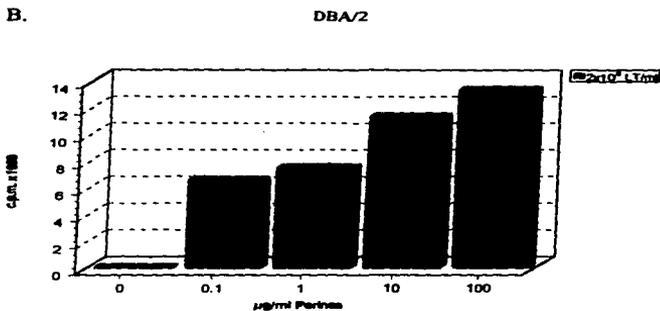
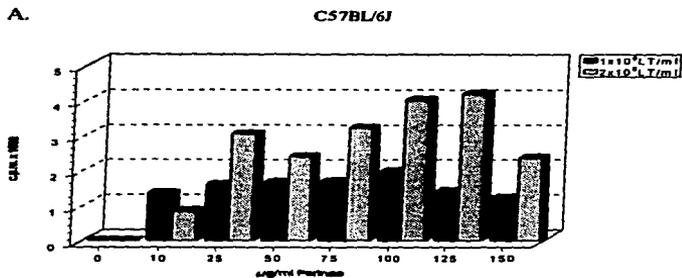
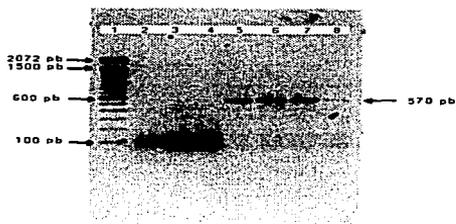


Figura 1.- Proliferación *in vitro* de linfocitos T (LT) provenientes de ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis se determinó por incorporación de Timidina tritiada (Td-³H) según métodos (3.1.1.) A. cepa C57BL/6J; B. cepa DBA/2. Las barras representan una sola determinación por triplicado. (Para el trazo de las figuras se utilizó el programa Harvard-Graphics para Windows y Word).

A.

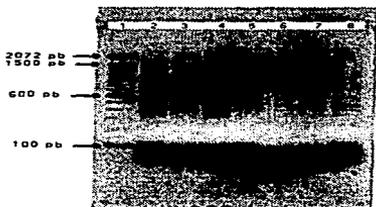


B.



Figura 2. Cinética de expresión de RNA mensajero para IFN- γ en células de bazo totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis se llevo a cabo por RT-PCR de acuerdo a lo descrito en métodos. A) cepa C57BL/6J; B) cepa DBA/2. Carril 1: P.M. 2: 0 hr linfocitos no inmunes; 3 al 8: 6, 8, 10, 12, 14 y 18 hr post-estimulación *in vitro*, respectivamente. (Para la edición de las imágenes se utilizó el programa Fotostyler y Word para Windows).

A.



B.

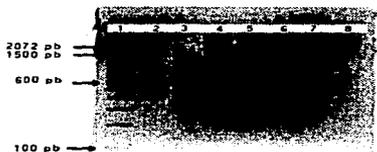


Figura 3. Cinética de expresión de RNAm para IL-4 en células de bazo totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis se llevo a cabo por RT-PCR de acuerdo a lo descrito en métodos. A) cepa C57BL/6; B) cepa DBA/2. Carril 1: P.M. 2: 0 hr linfocitos no inmunes; 3 al 8: 6, 8, 10, 12, 14 y 18 hr post-estimulación *in vitro*, respectivamente.

A.



B.

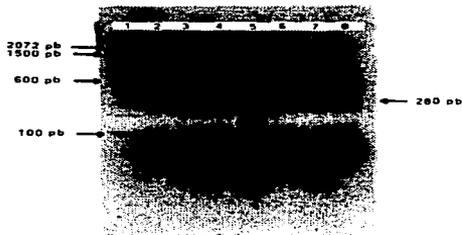


Figura 4. Cinéticas de expresión de RNAm para GAPDH (testigo positivo) en células de bazo totales provenientes de ratones inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis se llevo a cabo por RT-PCR de acuerdo a lo descrito en métodos. A) cepa C57BL/6J; B) cepa DBA/2J. Carril 1: P.M. 2: 0 hr linfocitos no inmunes; 3 al 8: 6, 8, 10, 12, 14 y 18 hr post-estimulación *in vitro*, respectivamente.

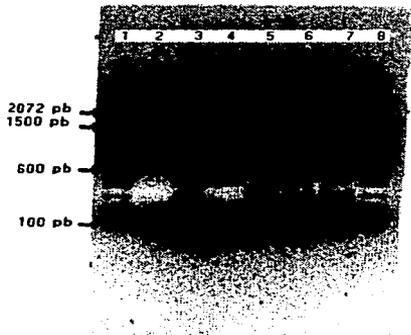


Figura 5. Cinética de expresión de RNA mensajero para IL-12 en macrófagos peritoneales provenientes de ratones C57BL/6J inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. Carriles 1 y 8 P.M.; 2 al 4. IL-12 a los días 1, 3 y 5 después de la segunda inmunización. 5 al 7 GAP 1, 3 y 5 días post-2da. inmunización.

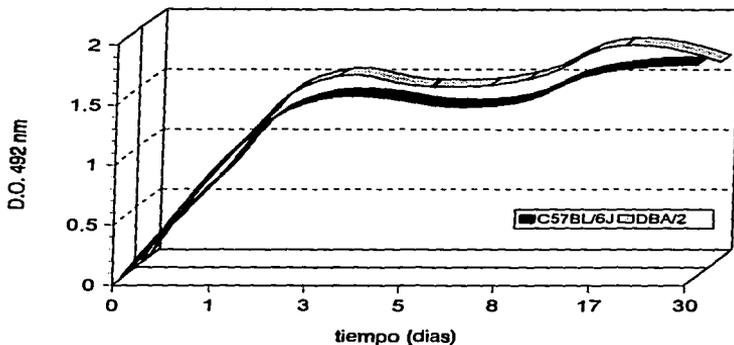
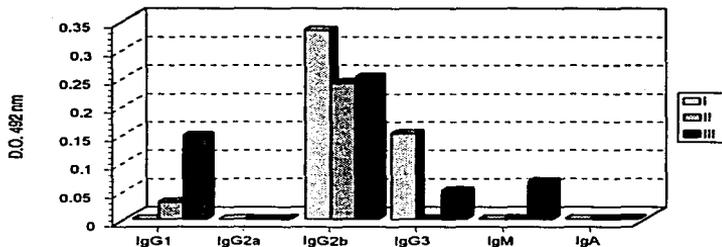


Figura 6.- Cinética de producción de anticuerpos porina-específicos de respuesta secundaria (IgG) analizados por medio de la técnica de ELISA-directa. Los sueros provienen de ratones inmunizados con porinas de *S. typhi*, tomados post-segunda-inmunización (1, 3, 5, 8, 17 y 30 días). Cada punto de la curva representa una determinación realizada por triplicado, de la titulación de anticuerpos, provenientes de una dilución 1:100 de los sueros.

A.

C57BL/6J



B.

DBA/2

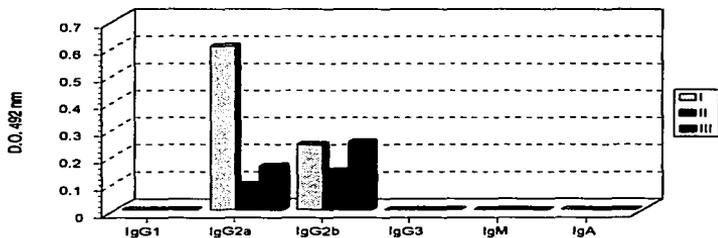
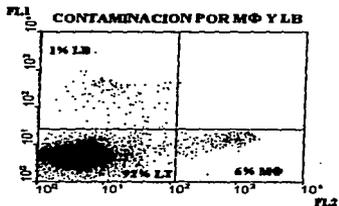


Figura 7.- Isotipificación de los anticuerpos porinas - específicos mediante la técnica de ELISA-indirecta. La determinación se realizó en los sueros de los días 17 y 30 (mayor respuesta) en dilución 1:100. A. cepa C57BL/6J; B. cepa DBA/2. Las barras son el resultado de una determinación realizada por triplicado, en 3 ratones de cada cepa.

A.



B.

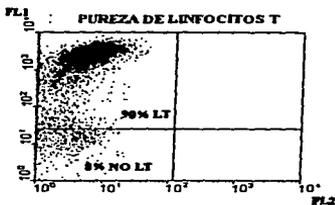


Figura 5.- Citometría de flujo de la pureza de linfocitos T por inmunofluorescencia indirecta. **A.** Contaminación por Macrófagos (Mφ's) y linfocitos B identificados por el anti-Mac1 (FL-2) y anti-IgG de ratón (FL-1), respectivamente. **B.** Población de linfocitos T totales identificados por el anti-Thy 1.2 (positivos para FL-1). Nótese que éste patrón de purificación, se presentó de manera semejante en todos los casos en que se realizó el estudio de las moléculas de memoria y regiones VB's en los linfocitos T.

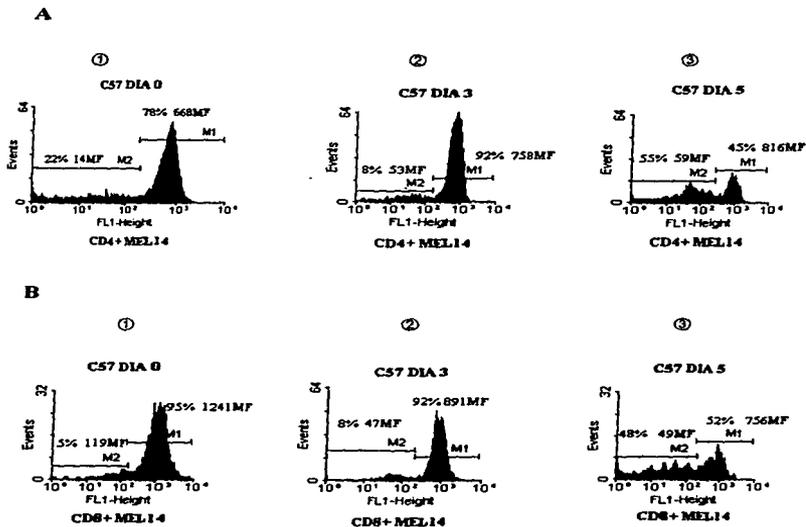


Figura 9.- Citimetría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD62L (MEL14) en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa CS7BL/6J inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+; ① Día 0, linfocitos T de bazo de ratones no inmunizados; ② y ③ días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia 1 (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+MEL14 / CD8+MEL14: linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo MEL14 (anti-CD62L).

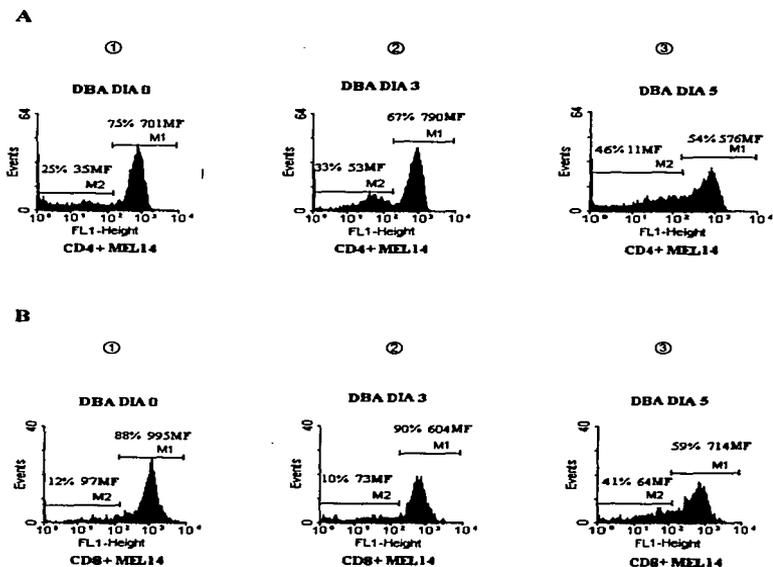
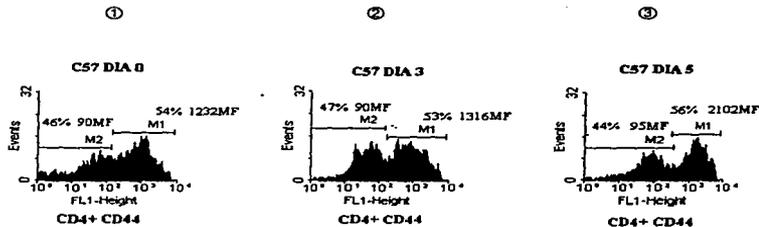


Figura 10.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD62L (MEL-14) en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+. ○ Día 0, linfocitos T de bazo de ratones no inmunos; ⊙ y ⊚ días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia I (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+MEL14 / CD8+MEL14: linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo MEL14 (anti-CD62L).

A



B

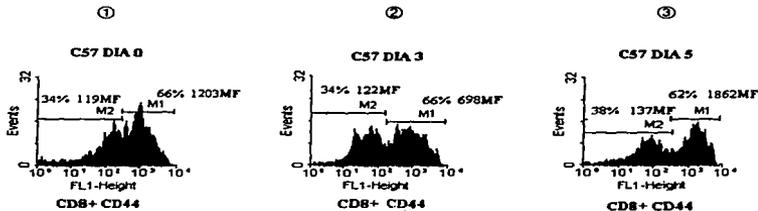


Figura 11.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD44 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+. ① Día 0, linfocitos T de bajo de ratones no inmunizados; ② y ③ días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia I (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+CD44 / CD8+CD44; linfocitos TCD4+ & TCD8+ analizados con el anticuerpo anti-CD44.

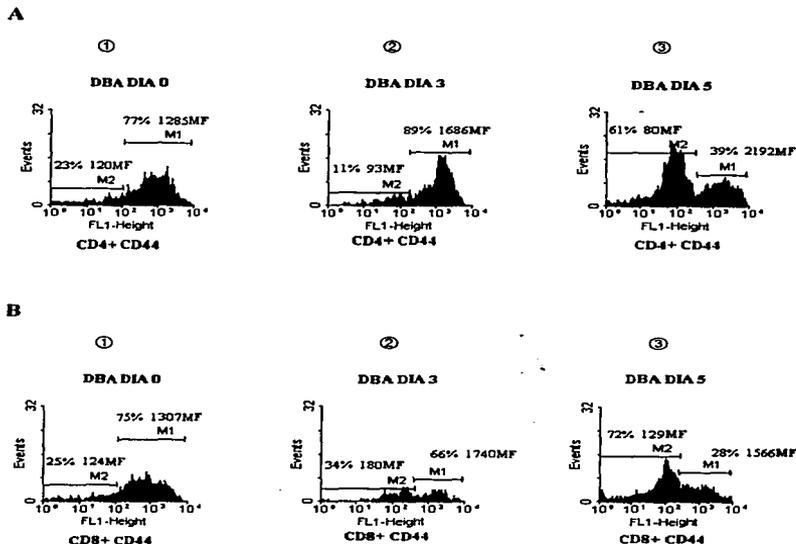


Figura 12.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de CD44 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) Linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+ de bazo de ratones no inmunes; (2) y (3) días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia 1 (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+CD44 / CD8+CD44: linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo anti-CD44.

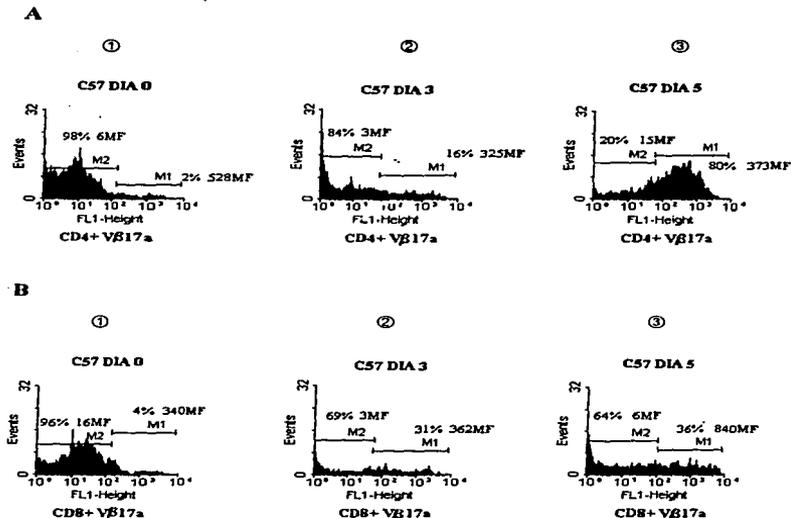


Figura 13.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de VB 17a en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+. Ⓞ Día 0, linfocitos T de bazo de ratones no inmunes; Ⓜ y Ⓜ días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 μ g/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia I (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+VB17a / CD8+VB17a: linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo anti-VB17a. Es necesario hacer notar que las poblaciones al día 0 son negativas para expresar la región 17a, encontrándose entre 10^0 y 10^2 de FL-1.

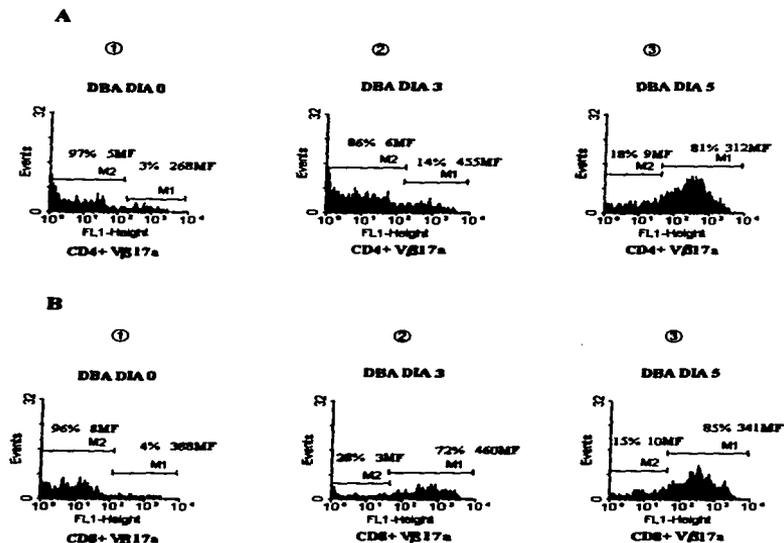


Figura 14.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 17a en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porcinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+; ① Día 0, linfocitos T de bazo de ratones no inmunes; ② y ③ días: 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia 1 (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+Vβ17a / CD8+Vβ17a: linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo anti-Vβ17a.

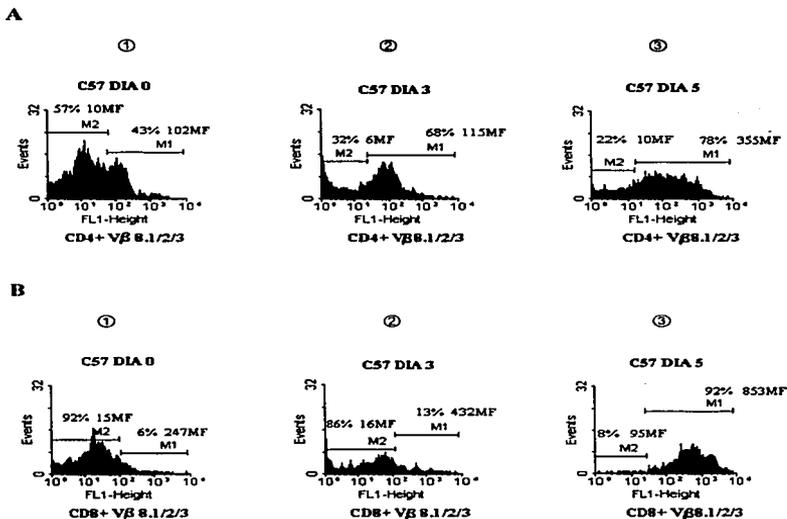


Figura 15.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 8.1/2/3 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa C57BL/6J inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+, linfocitos T de bazo de ratones no inmunes; ∞ y ∞ días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia 1 (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2: población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+Vβ8.1/2/3 / CD8+Vβ8.1/2/3 : linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo anti-Vβ8.1/2/3.

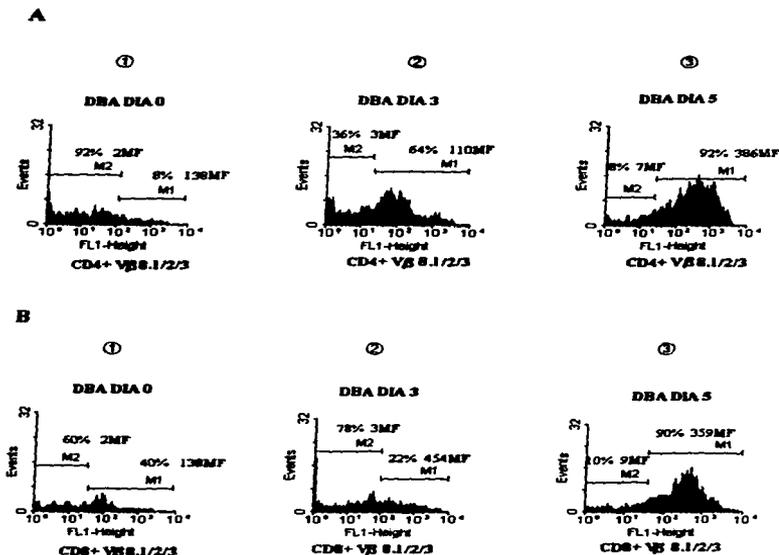


Figura 16.- Citometría de la inmunofluorescencia indirecta de las cinéticas de expresión de Vβ 8.1/2/3 en linfocitos T CD4 y CD8 provenientes de ratones de la cepa DBA/2 inmunizados con porinas de *Salmonella typhi*. El análisis de la expresión se determinó por inmunofluorescencia indirecta, cuantificada por citometría de flujo. (A) linfocitos CD4+ y (B) linfocitos CD8+. ① Día 0, linfocitos T de bazo de ratones no inmunos; ② y ③ días 3 y 5 post-estimulación *in vitro* de esplenocitos totales con el antígeno (100 µg/ml). Abscisas, intensidad de fluorescencia 1 (Height FL1); ordenadas, número de eventos. M1 y M2, población 1 y 2. MF: media de fluorescencia. CD4+Vβ8.1/2/3 / CD8+Vβ8.1/2/3 : linfocitos TCD4+ ó TCD8+ analizados con el anticuerpo anti-Vβ8.1/2/3. Es necesario hacer notar que las poblaciones al día 0 son negativas para expresar la región 8.1/2/3, encontrándose entre 10⁰ y 10² de FL-1.

VI. DISCUSION

En el estudio de la inmunidad contra bacterias intracelulares como *Mycobacterium* y *Listeria*, se ha determinado que la respuesta inmune de tipo Th1 es la encargada principal para su control y eliminación. En la infección por *Salmonella*, aún cuando se ha determinado la participación de linfocitos T CD4 y T CD8 y una importante respuesta de anticuerpos, se desconocen los mecanismos inducidos por los antígenos bacterianos, en particular las porinas, por lo cual el presente trabajo abordó el estudio de estos mecanismos, tras inmunizar a animales de laboratorio con porinas de *Salmonella typhi*.

En éste contexto los resultados aquí obtenidos revelan tres puntos importantes. a) en primer lugar la inducción de una respuesta inmune celular o de tipo Th1, evidenciado por la presencia de RNAm para IFN- γ e IL-12 en linfocitos T y macrófagos, respectivamente; además, la inducción de una respuesta humoral muy importante, con la producción de anticuerpos de las subclases IgG2a e IgG2b principalmente. b) en segundo lugar, se genera un incremento importante en las poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 con fenotipo de memoria y/o activación (CD44^{high}/CD62L^{low}). c) y en tercer lugar, existe un repertorio restringido de linfocitos T específicos, que expresan las regiones variables 17a y 8.1/8.2/8.3 de las cadenas β del TCR.

(A) Inducción de una respuesta inmune celular o de tipo Th1 al inmunizar ratones de las cepas (con diferente fondo genético de susceptibilidad hacia *Salmonella*), B6 (Ity') y D2 (Ity'), con porinas de *Salmonella typhi*.

Se encontró que los linfocitos T provenientes de éstos ratones estimulados *in vitro*, expresaban RNAm para IFN- γ a partir de las 10 horas en la cepa B6, y en la cepa D2 a las 6 horas. Por otro lado, macrófagos de peritoneo expresaron el RNAm para IL-12 al tercer día post-segunda inmunización, sólo en ratones de la cepa B6. Estas dos citocinas son las responsables de inducir una respuesta de tipo Th1, participando linfocitos T y macrófagos principalmente. Los macrófagos, al contacto con el antígeno se activan y producen IL-12, la cual estimula la producción de IFN- γ en linfocitos T y células NK. El IFN- γ activa a los macrófagos induciéndolos a producir sustancias microbicidas, como derivados reactivos del oxígeno (ROI), óxido nítrico por la enzima óxido-nítrico-sintetasa (NOS) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); además

provoca el cambio de isotipo en linfocitos B, produciendo inmunoglobulinas propias de una respuesta de tipo Th1 (46). Este efecto se observa en la cepa D2 predominando la subclase IgG2a y en la cepa B6 la subclase IgG2b. Estas subclases de anticuerpos tienen la capacidad de opsonizar, favoreciendo la fagocitosis de antígenos particulados, entre ellos la *Salmonella* y sus antígenos, existiendo receptores contra la fracción Fc (Fc- γ) para éstos anticuerpos en macrófagos y neutrófilos. Estos anticuerpos tienen además la capacidad de fijar y activar al complemento, contribuyendo de tal manera, a la eliminación de éstos antígenos.

En el caso de la expresión del RNA mensajero para IL-4 (citocina de tipo Th2) en linfocitos T no inmunes (día 0), al inicio y durante la estimulación *in vitro* en ambas cepas de ratones sugiere dos posibilidades a) exposición a algún antígeno que estimule su expresión, ó b) presentan un "fondo genético" para ésta citocina. La expresión de RNAm para IL-4, disminuye cuando aparece el RNAm para IFN- γ , produciendo un efecto negativo sobre la expresión del RNAm de la IL-4, efecto clásico de antagonismo entre las citocinas de tipo Th1 y Th2 (42,43).

En cuanto a la respuesta humoral, se induce la producción de anticuerpos de respuesta secundaria desde el primer día después de la segunda inmunización y se mantiene hasta el día 30. En estudios anteriores éste tipo de respuesta ya se había reportado, por lo cual se consideran inmunógenos muy poderosos (12-15,17). Estos anticuerpos como ya se había mencionado, son de las subclases IgG2a e IgG2b principalmente.

(B) Poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 con fenotipo de memoria y/o activación. El comportamiento en la expresión de las moléculas CD62L (L-selectina) y CD44 en los linfocitos TCD4 y TCD8 no inmunes presenta una relación inversa ya que expresó una importante concentración de CD62L, y una baja de CD44 (CD44^{low} / CD62L^{high}); éste fenotipo refleja células no activadas. Mientras que los linfocitos T inmunes estimulados con las porinas manifestaron el fenotipo de memoria y/o activación, es decir aumentó la expresión de CD44 y disminuyó la de CD62L conforme aumentaba el tiempo de estimulación, presentando el fenotipo CD44^{high}/CD62L^{low} que caracteriza a células activadas y/o de memoria.

Este fenotipo de memoria y/o activación adquirido por éstas células, se caracteriza por la pérdida en la expresión del receptor "homing" CD62L, para las células endoteliales venosas altas (HEV); aumenando la expresión del receptor "homing" CD44, en los tejidos periféricos. Esto

puede deberse a que los linfocitos T ya no migran a los órganos linfoides para la presentación de la *Salmonella* y/o sus antígenos (respuesta primaria), sino ahora se dirigen a los órganos periféricos para su control y eliminación (respuesta secundaria ó memoria inmune).

(C) Repertorio restringido de linfocitos T específicos, que expresan las regiones variables 17a y 8.1/8.2/8.3 de las cadenas B del TCR. Estas poblaciones de linfocitos T, expresan de manera preferencial dos regiones variables (17a y 8.1/2/3) de las cadenas B del TCR, indicando un repertorio limitado de linfocitos T CD4 y T CD8 específicos. La alta expresión éstas regiones, es una evidencia del posible reconocimiento de epitopos inmunodominantes de las porinas.

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos inducidos por la inmunización con porinas de *S. typhi* sugiere la posibilidad de proponerlas como nueva vacuna contra la fiebre tifoidea, debido a su capacidad de proteger a ratones al reto con la bacteria viva y por inducir una respuesta posiblemente protectora de tipo celular y humoral de memoria. Llama la atención de ser las porinas las posibles responsables de inducir una respuesta de tipo Th1, y no otros antígenos de la *Salmonella*, como pudiera ser el lipopolisacárido de la pared celular, al cual se le había atribuido ésta respuesta.

VII. CONCLUSIONES

- Las porinas son poderosos inmunógenos que tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune de tipo Th1 ó celular, con base en el patrón de expresión de RNAm para las citocinas IL-12 e IFN- γ .
- Las porinas inducen una fuerte respuesta de anticuerpos de memoria de clase IgG, de las subclases IgG2a e IgG2b principalmente que forman parte de una respuesta inmune celular ó tipo Th1; con la característica de ser excelentes opsonizantes y fijadores de complemento.
- Las porinas provocan un incremento de las poblaciones de linfocitos T CD4 y TCD8 con fenotipo de memoria y/o activación (CD44^{high} CD62L^{low}).
- El repertorio de los linfocitos T específicos, se encuentra restringido para la expresión de las regiones VB17a y VB8.1/2/3 del TCR. Estos linfocitos T posiblemente reconocen epítops inmunodominantes de las porinas, que al contacto con ellos proliferan.

VIII.- APENDICE

I.- EQUIPO

- Espectrofotómetro Modelo DU-640 (Beckman)
- Campanas de flujo laminar (VECO)
- Incubadora con CO₂ (Lab-line)
- Termociclador (Stratagene Robocycler 40)
- Contador de centelleo LS 6000SE (Beckman)
- Irradiador gamma (GAMMACELL)
- Lector de ELISA (Labsystems Multiskan Multisoft)
- Citómetro de Flujo FACSort (BECTON DICKINSON)
- Centrifuga-vacio (HetoVac Modelo VR-1 Heto Lab Equipment)
- Analizador de imagenes (IS-1000 Digital imaging system Modelo TM-20. Alpha Innotech Corporation).

II.- REACTIVOS BIOLÓGICOS

- Fragmento F(ab')₂ de cabra anti cadena Mu de ratón (CAPPEL)
- IgG de conejo anti-cabra marcado con peroxidasa (DAKO)
- IgG de conejo anti ratón marcado con peroxidasa (SIGMA)
- Estuche para la determinación de isotipos de anticuerpos de ratón (SIGMA)
- IgG de cabra anti-rata conjugado a Biotina F(ab')₂ 200µg/1 ml (BOEHRINGER MANNHEIM)
- Estreptoavidina-Ficoeritrina 50µg/1 ml (BOEHRINGER MANNHEIM)
- IgG anti-rata marcado con isotiocianato de fluoresceína, FITC (GIBCO BRL)
- IgG anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína, FITC (GIBCO BRL)
- IgG anti-Thy 1.2 de ratón (SIGMA Immuno Chemicals)

Híbridomas productoras de anticuerpos monoclonales:

- ATCC TIB-207 Clona GK 1.5 productora de IgG de rata anti-CD4.
- ATCC TIB-105 Clona 53.672 productora de IgG de rata anti-CD8.
- ATCC HB-128 Clona M1/70.15.11.5.HL productora de IgG de rata anti mac-1 (unidad α)
- ATCC HB-132 Clona MEL-14.D54 productora de IgG de rata anti-CD62L.
- Clona NIMR8 productora de IgG de rata anti-CD44 (Ref. 66)
- Clona 44.22.1 productora de IgG de rata anti-Vβ 6 (Ref. 67)
- Clona KT11 productora de IgG de rata anti-Vβ 11 (Ref. 68)
- Clona KJ23 productora de IgG de ratón anti-Vβ 17a (Ref. 69)
- Clona F23.1 productora de IgG de ratón anti-Vβ 8.1/8.2/8.3 (Ref. 70)

Anticuerpos utilizados como testigos positivos para la isotipificación.

- Anticuerpo Y3 de isotipo IgG2a (1 mg/ml).
- Anticuerpo AF6-RD.12 de isotipo IgG1 (0.34 mg/ml).
- Anticuerpo WG1.32 de isotipo IgG2a (1 mg/ml).
- Anticuerpo BBM.1 de isotipo IgG2b (1 mg/ml).

Reactivos para RT-PCR.

- Cloruro de magnesio 25mM (BOEHRINGER MANNHEIM)

- Amortiguador de la RT-AMV 5X que se compone de Tris-HCl 250 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 150 mM, ditiotreitil 5 mM; pH 8.5; y enzima RT-AMV (Avian-Myeloblastosis-Virus) (BOEHRINGER MANNHEIM)
- Inhibidor de RNAsas, molécula de 51 kDa que se encuentra en un amortiguador que contiene HEPES-KOH 20 mM, KCl 50 mM, ditiotreitil 5 mM, 50% v/v de glicerol y pH 7.6 (BOEHRINGER MANNHEIM)
- Mezcla Hexanucleotidos 10X que contiene Tris-HCl 0.5 M, MgCl₂ 0.1M, ditiotreitil (DTE) 1 mM, 2 mg/ml de albúmina sérica bovina, hexanucleotidos y pH 7.2 (BOEHRINGER MANNHEIM)
- Mezcla de Nucleotidos trifosfatados (dNTP's) en una solución de NaCl, que contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP cada uno en concentración 10 mM a un pH 7.0 (BOEHRINGER MANNHEIM)
- Enzima Taq (Thermus-aquaticus) y amortiguador de la enzima que contiene: Tris-HCl 20 mM, ditiotreitil 1 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 0.1 M, 0.5% Nonidet P40* (v/v), 0.5% Tween 20* (v/v), 50% glicerol (v/v), pH 8.0 (BOEHRINGER MANNHEIM)

Secuencias iniciadoras para citocinas utilizadas para PCR (National Biosciences, Inc.)

IL-2

Iniciador 1: 5'CAG CTC GCA TCC TGT GTC ACA 3'

Iniciador 2: 5'GAT GAT GCT TTG ACA GAA GGC 3'

IL-4

Iniciador 1: 5'GTA CCA GGA GCC ATA TTC ACG 3'

Iniciador 2: 5'GAG TCT CTG CAG CTC CAT GAG 3'

IL-10

Iniciador 1: 5'CTG GAA GAC CAA GGT GTC TAC 3'

Iniciador 2: 5'GAG CTG CTG CAG GAA TGA TGA 3'

IL-12

Iniciador 1: 5'ATG GCC ATG TGG GAG CTG GAG 3'

Iniciador 2: 5'TTT GGT GCT TCA CAC TTC AGG 3'

IFN-γ

Iniciador 1: 5'TCA GGA AGC GGA AAA GGA GTC 3'

Iniciador 2: 5'TCA AGT CAA TTG AGA CAC TGC 3'

GAPDH

Iniciador 1: 5'GAT GAC ATC AAG GTG GT 3'

Iniciador 2: 5'TCT TGC TCA GTG TCC TTG CTG 3'

- Yoduro de Propidio (SIGMA)

- TRIzol para uso en tejidos y células. Solución mono-fásica de isotiocianato de guanidina y fenol (GIBCO BRL)

- Medio de cultivo RPMI-1640 con L-Glutamina, Hepes 25 mM (GIBCO BRL)

- Medio de cultivo D'MEM con glucosa, L-glutamina, Hepes 25 mM, NaCl 0.08 mM (GIBCO BRL)

- Timidina tritiada (metil-³H) 5 ml de solución acuosa (6.70 Ci /nmol) (DUPONT)

- Solución Antibiótica-antimicótica 100X (SIGMA)

- Coctel de líquido de centelleo (Insta-Gel® XF Packard Instrument Company INC.)

III. PREPARACION DE SOLUCIONES

1.- Amortiguador de alta fuerza iónica pH 7.7 (Nikaido).

NaCl 0.4 M	23.4 gr.
Tris-HCl 50 mM	7.83 gr.
SDS 1%	10.0 gr.
EDTA 5 mM	0.185 gr.
2-mercaptoetanol 0.05%	0.5 mL.
Agua destilada	c.b.p. 1Lt.

2.- Amortiguador de Fosfatos (PBS) pH 7.2

NaCl 150 mM	8.5 gr.
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O 50mM	8.2 gr.
KH ₂ PO ₄ 18 mM	2.48 gr.
Agua destilada	1 Lt.

Finalmente la solución se esterilizó a 121°C.

3.- Amortiguador de HEPES 25 mM pH 7.4

HEPES (N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'[2-ácido etanolsulfónico])

(Sal de sodio)

6.5 gr.

Agua destilada

1 Lt.

Se esteriliza la solución pasandola a través de un filtro de 0.22 µm

4.- RPMI 10% de SFB

Medio RPMI estéril	500 mL.
Suero Fetal Bovino (GIBCO BRL)	50 mL.
Piruvato de sodio 10 mM (SIGMA)	5 mL.
β- Mercaptoetanol 50 mM (SIGMA)	0.5 mL.
Solución Antibiótica-antimicótica	5 mL.

que contiene 10,000 U. de Penicilina, 10mg Estreptomcina, 25 µg/ml Anfotericina B y NaCl 0.9% (SIGMA).

5.- D'MEM 20% de SFB

Medio DMEM estéril	500 mL.
Suero Fetal Bovino (GIBCO BRL)	100 mL.
Piruvato de sodio 10 mM (SIGMA)	5 mL.
β- Mercaptoetanol 50 mM (SIGMA)	0.5 mL.
MEM Aminoácidos no esenciales 10mM (GIBCOBRL).....	5 mL.
Solución Antibiótica-antimicótica	5 mL.

que contiene 10,000 U. de Penicilina, 10mg Estreptomcina, 25 µg/ml Anfotericina B y NaCl 0.9% (SIGMA).

6.- Amortiguador de Carbonatos 0.1 M a pH 9.5

NaHCO ₃ 80 mM	7 gr.
Na ₂ CO ₃ 20 mM	2.8 gr.
Agua destilada	c.b.p. 1 Lt.

7.- Amortiguador de Citratos 0.1 M a pH 5.6

Citrato de Sodio 110 mM	29 gr.
Acido citrico 20 mM	4.1 gr.
Agua destilada	c.b.p. 1 Lt.

8.- Amortiguador de Lisis pH 7.4

NH ₄ Cl 0.15 M	8.025 gr.
KHCO ₃ 1 mM	0.1 gr.
Na ₂ EDTA 0.1 mM	3.7 mg.
Agua destilada	c.b.p. 1 Lt.

9.- Amortiguador Tris-acético-EDTA (TAE)

Tris base 40 mM	9.68 gr.
Acido acético glacial	1.142 mL.
EDTA 0.5 M pH 8	2 mL.
Agua destilada	c.b.p. 1 Lt.

Nota: Las soluciones 6 a la 9 fueron esterilizadas a 121°C.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Pegues DA, Miller SI. Salmonellosis, including typhoid fever. *Current Opinon in Infectious Diseases*. 1994; 7: 616-623.
- 2.- Gallin, J.J. 1993. Inflammation. In *Fundamental immunology*. Ed. Paul W.E. Raven Press. pp 105-1032
- 3.- Hormeache, C.E: 1992. *Salmonella*, infection and immunity. In *Encyclopedia of Immunology*. Ed(s). Roit, I.M. and Delves, P.J. *Academic Press*. pp 1350-1352.
- 4.- Eisenstein, T.K.; Deakins, L.W; Saluk, p.h. and Sultzter, B.M. 1982. Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3HeB/FcJ mice and others strains in the C3H lineage. *Infect. Immun.* 36:696-703
- 5.- Liev, F.Y. and Cox F.E.G. 1992. *Fundamental immunology*. Ed. W.E. Raven Press. pp. 105-1032
- 6.- Nikaído, H., Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 1985; 49: 1-32.
- 7.- M.S. Weiss, U. Abele, J. Weckesser, W. Welte, E. Schiltz, G.E. Schulz. Molecular Architecture and Electrostatic Properties of a Bacterial Porin. *Science* 1991; 254:1627-1630.
- 8.- W. Cowvan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, N. Janssonius, J. P. Rosenbusch. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*. 1992; 358: 727-733.
- 9.- J. Kyte, R.F. Doolittle. A simple method for displaying the hidrophathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982;157: 105-132.
- 10.- T. Schirmer, S. W. Cowan. Prediction of membrane spanning beta-strands and its application to maltoporin. *Protein Sci.* 1993; 2: 1361-1363.
- 11.- S. W. Cowan, J.P. Rosenbusch. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science*. 1994;264: 914-916.
- 12.- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., González, C., Paniagua, J., Moreno, J. and Kumate, J. Protection against *Salmonella typhi* infection after immunization with outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi*. 9, 12, d.Vi. *Infect. Immun.* 1988; 56: 2953-2959.
- 13.- Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C. R., García, J. A., and Kumate, J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine*. 1992; 10: 811-813.
- 14.-González, C. R., Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., García, J. A., Blanco, F. and Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 1993; 37:793-799
- 15.- Ortiz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E. and Kumate, J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27: 1640-1645.
- 16.- Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguin, C. and Kumate, J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scan. J. Infect. Dis.* 1993; 25:73-80.
- 17.- Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M.P., Martín, N., Ramírez, G., González, C.R., López-Macias, C., Sánchez, J., Kumate, J. and Ortiz-Navarrete, V. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 1994; 730: 350-352.
- 18.- Jeantur, D., Lakey, J.H., The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 2153-2164.

- 19.- Puente, J. L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., Calva, E. Isolation of an Omp C - like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene*. 1987; 61:1867-1872.
- 20.- Mizuno, T., Chou, M.H., Inouye, M. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer-membrane: DNA sequence of the osmoregulated *omp c* gene. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:6932-6940.
- 21.- Nikaïdo, H., y Vaara, M. Outer membrane. En : Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schechter, M. and Umberger, H.E. (Eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA. págs: 7-22.
- 22.- Nikaïdo, H., Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* 1983; 97:85-100.
- 23.- Benz, R., and Bauer, K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* 1988; 176: 1-19.
- 24.- Bosh, D., Schoten, M., Verhagen, C., and Tommassen, J. The role of the carboxy-terminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein Pho E. *Mol. Gen. Genet.* 1989; 216: 144-148
- 25.- Struyv, M., Moons, M., and Tommassen, J. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* 1991; 218: 141-148.
- 26.- Overbeek, N., Bergmans, H., van Maxsfeld, F. and Lugtemberg, B. Complete nucleotide sequence of *pho E*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer-membrane por protein of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 1983; 163: 513-532.
- 27.- Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C., and Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccine with special emphasis in typhoid fever: monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. En: Cañedo, L.E., Tood, L.E., Packer, L. and Jaz, J. (Eds.) *Cell function and disease*. Plenum Press. N.Y. págs: 281-292.
- 28.- Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muiy, M., González, C., García, J.A., Islas, S., y Kumate, J. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12. Vid : análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 1989; 20: 315-320.
- 29.- Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B., Hormaeche, C.E. Transfer of immunity oral challenge with virulent *Salmonella* in naturally susceptible Balb/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect Immun.* 1993; 68: 3981-84.
- 30.- 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.
- 31.- Fukazawa, Y., Kagaya, K., Ishibashi, Y. 1993. Effect of delayed-type hypersensitivity action and transferred lymphokine on resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection. 9: 986-989.
- 32.- Killar, L.M., Esenstein, T. K., 1986. Delayed-type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 52:504-508.
- 33.- Tite, J.F., Gao, X. M., Hughes-Jenkins, C.M., Lipoombe, M., O'Callaghan, D., Dougan, G., Liew, F.Y. 1990. *Immunology.* 70:701-708.
- 34.- Pfeiffer, J. D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findley, 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.
- 35.- M. Kovacsovic-Bankovski and K.L., Rock. 1995. A phagosome to cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 267:243-246.

- 36.- N. Martin, I., Ochoa, A., Isibasi, V., Ortiz-Navarrete. 1995. Processing and presentation of exogenous antigens by class I molecules. *Memorias: 9th International Congress of Immunology. Resúmen No. 4211 p. 709.*
- 37.- J.B. Ulmer, J.J. Donnelly, M.A. Liu. 1994. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *J. Eur. Immunol.* 24: 1590-96.
- 38.- Tite, J.P., Dougan, G., Chatfield, S.N. 1991. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 147(9):3161-64.
- 39.- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman and Jordan S. Pober. Interamericana McGraw-Hill. Segunda edición. 1995. pp. 150-183, 268-292.
- 40.- F. W. Fitch, M.D. McKisic, D.W. Lancki, and T.F. Gajewski. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11:29-48.
- 41.- Robert A. Seder and William E. Paul. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:635-73
- 42.- T.R. Mosmann and R.L. Coffman. TH1 AND TH2 CELLS: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7:145-73
- 43.- T.R. Mosmann and Subash Sad. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today.* 1996; 17(3):138-146
- 44.- 29.- Abul K. Abbas, Kenneth M. Murphy and Alan Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996; 383:787.
- 45.- 30.- Giorgio Trinchieri. Interleukin-12. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13:251-76.
- 46.- 31.- Germann T, Bongartz M, Dlugonca H, Hess H, and Schmitt E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses *in vivo.* *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 823-29.
- 47.- Tim R. Mosmann. Properties and functions of interleukin-10. *Advance in immunology.* 1994; 56: 1-26.
- 48.- Y. Kamogawa, L. E. Minasi, S.R. Carding, K. Bottomly and R.A. Flavell. The relationship of IL-4 and IFN- γ producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells. *Cell.* 1993; 75:985-95.
- 49.- R.A. Seder, R. Gazzinelli, A. Sher and W. E. Paul. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 10188-10192.
- 50.- S. Sad and T. R. Mosmann. Single IL-2 secreting precursor CD4 T cell develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol.* 1994; 153: 3514-22.
- 51.- O. A. Anar, M. Gibert, M. Jolly, J. Théze and D. Lj. Jankovic. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2. *J. Immunol.* 1992; 148: 3820-29.
- 52.- M. Assenmacher, J. Schmitz and A. Radbruch. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon- γ and interleukin-4 expressing cells. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24:1097-1101.
- 53.- S. Romagnani. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:227-57.
- 54.- Thomson B.C. Distinct Roles for the Costimulatory Ligand B7-1 and B7-2 in T helper Cell differentiation? *Cell.* 1995. 81: 979-982.
- 55.- Jeffrey A. Bluestone. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity.* 1995; 2:555-559.
- 56.- Craig. B. Thompson. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 y B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell.* 1995; 81:979-982.

- 57.- Vijay K. Kuchroo, Mercy Prabhu Das, Julia A. Brown, Ann M. Ranger, Scott S. Zamvil, Raymond A. Sobel, Howard L. Weiner, Nasrin Nabavi, and Laurie H. Glimcher. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 1995; 80:707-718.
- 58.- Deborah J. Lenschow, Theresa L. Walunas, and Jeffrey A. Bluestone. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14:233-58.
- 59.- Peter S. Linsley and Jeffrey A. Ledbetter. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11:191-212
- 60.- Subash Sad, Rita Marcotte and Tim R. Mossmann. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into Cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. 1995. *Immunity*. 2:271-279.
- 61.- Croft M, Carter L, Susan L. Swain, and Richard W. Dutton. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin IL-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* 1994; 180:1715-28.
- 62.- Kromenger, M., G. Siv, L.E. Hood, and N. Scharf. The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 1986; 4:529.
- 63.- Gray D. Immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11:49.
- 64.- Vitetta E.S., Berton M.T., Burger C., Kepron M., Lee W.T., Yin X.M. 1991. Memory B and T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 9:193.
- 65.- Douglas A. Steeber, Nathan E. Green, Shinichi Sato and Tomas F. Tedder. Lymphocyte migration in L-Selectin-Deficient Mice Altered Subset Migration and Aging of the immune system. *J. Immunol* 1996. 157: 1096-1106.
- 66.- L. Santos Argumedo, P.W. Kincade, S. Partida-Sánchez and M.E. Parkhouse. CD44-stimulated dendrite formation ("spreading") in activated B cells. *Immunology*. 1997; 90:147-153.
- 67.- Hans Acha, Orbea, Rolf, M. Zinkernagel and Hans Hengartner. Citotoxic T cell clone-specific monoclonal antibodies used to selected clonotypic antigen-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* 1985; 15:31-36.
- 68.- Kyuhei Tomonaris, and Erin Lovering. T cell receptor specific monoclonal antibodies against a Vβ11-positive mouse T cell clone. *Immunogenetics*. 1988; 28,445.
- 69.- Kappeler, J., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N., and Marrack, P. A T cell receptor Vβ segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell*. 1987; 49, 263.
- 70.- Uwe D. Staerz, Hans-Georg Rammensee, James D. Benedetto and Michael J. Bevan. Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on T cell antigen receptor. *J. Immunol.* 1985; 134, 3994.