

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CAMBIOS EN LAS POBLACIONES
CELULARES DEL INTESTINO DELGADO
DEL RATON ASOCIADOS A LOS
PROCESOS DE INMUNIZACION E
INFECCION CON *Salmonella typhimurium***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)**

PRESENTA:

FERNANDO RAMOS REYES

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CECILIA TERESA XIMENEZ GARCIA**

00346



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra Cecilia T. Ximénez García.

AGRADECIMIENTOS

A los Drs Hector Barbosa, Cecilia Ximénez y Emma Melendro por la dirección, ayuda, apoyo y estímulos proporcionados para la realización y terminación de este trabajo.

Al Dr. Raúl Mancilla y al Técnico Ismael Ramírez por la ayuda en la parte histológica del trabajo.

A Gabriela por la ayuda brindada durante todo el trabajo.

A todos los miembros del jurado por sus consejos y sugerencias.

A todas las personas que de alguna u otra forma participaron, contribuyeron ó influyeron en la realización de este trabajo.

INDICE

| | página |
|----------------------------|--------|
| Indice | 1 |
| Abreviaturas | 2 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Generalidades | 6 |
| Planteamiento del problema | 15 |
| Objetivos | 15 |
| Hipótesis | 15 |
| Material y métodos | 16 |
| Resultados | 22 |
| Discusión | 27 |
| Conclusiones | 34 |
| Tablas | 35 |
| Figuras | 39 |
| Bibliografía | 45 |

ABREVIATURAS.

| | |
|------------------|--|
| amp ^r | Resistente a ampicilina |
| CG-PP | Centro germinal de placas de Peyer |
| CST | Caldo soya tripticasa |
| D | Duodeno |
| DL-50 | Dosis letal cincuenta |
| E | Epitelio |
| EI-PP | Espacio interfolicular de las placas de Peyer |
| g | Fuerza centrifuga |
| I | Ileon |
| LP | Lámina propia |
| PBS | Solución salina isotónica amortiguada con fosfatos |
| PP | Placas de Peyer |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| SSIE | Solución salina isotónica estéril |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| Y | Yeyuno |

RESUMEN

Se estableció un proceso de inmunización altamente reproducible en el ratón que confirió protección contra el desafío oral con una cepa de *Salmonella typhimurium* virulenta (F3).

Se determinó el número de células que poseían los marcadores Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA e IgM tanto en lamina própia (LP) como en las placas de Peyer (PP) en las porciones de duodeno (D), yeyuno (Y) e íleon (I) de ratones normales, enfermos (por la infección con la bacteria *Salmonella typhimurium* F3) e inmunizados (de acuerdo al protocolo previamente establecido).

En los animales normales, las células T ayudadoras (L3T4) se encontraron en menor número en las PP del íleon comparativamente a las observadas en las PP de duodeno y yeyuno. El proceso infeccioso ocasionó una disminución en el número de células T y células B productoras de IgA en la LP del duodeno además de una disminución en el número de células T ayudadoras en las PP de todo el intestino. Por otra parte, el proceso de inmunización indujo un aumento en el número de células productoras de IgA y Ly1 en la LP del duodeno de los animales inmunes, en comparación con lo observado en los animales normales.

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas gastrointestinales son un grave problema de salud en países en vías de desarrollo porque afectan tanto al hombre como a algunas especies animales de interés pecuario (Valdespino y col 1994, Jubb y col 1985). En México durante 1990, las infecciones gastrointestinales causaron 22,196 muertes en el hombre, de las cuales el 63.3% (14,011 defunciones) ocurrieron en niños menores de 5 años (Valdespino y col 1994); asimismo, se reportaron 3'696,035 casos de gastroenteritis en 1992, siendo también los niños menores de 4 años los mas afectados con el 40.7% (Boletín Mensual de Epidemiología 1993).

En general, las infecciones gastrointestinales están asociadas a factores socioeconómicos y culturales y mejoras en las condiciones de vida y en los hábitos higiénicos de la población favorecen la disminución de este importante problema. Sin embargo, debido a la situación económica de los países en vías de desarrollo, este tipo de medidas son poco factibles. Esta problemática ha sido una de las causas por lo que el estudio de los agentes causales de las gastroenteritis así como de los posibles mecanismos de resistencia del huésped contra estos organismos, constituyen un área de investigación prioritaria en nuestro medio.

En la actualidad se conocen muchos agentes causales de gastroenteritis, entre los que podemos citar a los rotavirus, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campilobacter sp.*, etc. De varios de estos agentes patógenos se conocen ya algunos de sus mecanismos de patogenicidad, como en el caso de los rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Vibrio cholerae*.

Por otra parte, no es sino hasta relativamente hace poco tiempo que se le ha dado la importancia adecuada a los mecanismos de defensa del huésped que operan a nivel de las mucosas en contra de microorganismos enteropatógenos. Con el fin de entender la relación huésped-parásito en las infecciones gastrointestinales, se han utilizado modelos experimentales de los cuales el más ampliamente estudiado, especialmente en el caso de la infección por *Salmonella typhimurium*, es el del ratón.

En el presente trabajo lo que se pretende es establecer un modelo de infección e inmunización en el ratón en contra de *Salmonella typhimurium* y determinar los cambios en las poblaciones de células linfoides asociadas a estos procesos en el intestino delgado de los animales, lo cual podrá contribuir a entender mejor el mecanismo de daño de la bacteria así como el mecanismo de protección del huésped en contra del agente infeccioso.

GENERALIDADES

Los miembros del genero *Salmonella sp.* son organismos patógenos intracelulares facultativos causantes de gastroenteritis, fiebre entérica y septicemia en una gran variedad de especies animales. Como muchos otros microorganismos, la salmonela tiene la capacidad de responder a cambios en el medio ambiente como: la falta de alimento, la disminución de fierro, la exposición a bajo pH y a cantidades pequeñas de H₂O₂ y el aumento en la temperatura y en la presión osmótica (Foster y Spector 1995). Esta capacidad de respuesta del microorganismo es muy importante para su supervivencia.

En términos generales la infección por *Salmonella* empieza con la invasión de las células M que recubren las placas de Peyer en el ileon (Jones y col 1994). Sin embargo, para llegar a estos sitios, la bacteria que fue ingerida debe sobrevivir al pH del estómago, a la baja tensión de oxígeno del intestino, al aumento en la osmolaridad y competir con la flora normal del tubo digestivo entre otros factores. Estos hechos involucran la adaptación ó sobrevida de la bacteria a estas situaciones a través de la activación de genes y expresión de proteínas; además, muchos de estos cambios están relacionados con la virulencia de la bacteria (Foster y Spector 1995).

Por ejemplo, se ha visto que *Salmonella typhimurium* crecida en condiciones de baja osmolaridad presenta dificultades para infectar células, este hecho está relacionado con el grado de enrollamiento del DNA lo cual influye en la expresión de genes de invasión (*inv*) (Galán y Curtiss 1990). De igual forma, el grado de crecimiento de la bacteria influye en su infectividad. En este sentido, se ha visto que bacterias que se encuentran en la fase

estacionaria de su desarrollo y cultivadas en condiciones aeróbicas son poco virulentas; por el contrario, la *Salmonella* crecida con poco oxígeno tiene una capacidad mayor de infectar células (Schiemann y Shope 1991, Lee y Falkow 1990). Se ha identificado un gen (*orgA*) dentro del locus *hil* involucrado en la inducción de invasividad por anaerobiosis (Jones y Falkow 1994) y se ha visto que mutaciones en este gen reducen la virulencia de *S.typhimurium* cuando se administra por vía oral, mas no cuando se administra por vía intraperitoneal.

La interacción entre *Salmonella* y la célula epitelial induce cambios tanto en la bacteria como en la célula epitelial. En la bacteria se observa la formación de estructuras tipo apéndices que se considera están involucradas en la inducción de la ingestión de la bacteria por la célula, lo cual facilita la invasión (Ginocchio y col 1994). La célula epitelial por su parte, se hincha y forma ampollas por la reorganización de su citoesqueleto y la membrana plasmática se ondula, lo que conduce a englobar e internalizar a la bacteria (Bliska y col 1993). Se han identificado varios genes y loci en la bacteria que están involucrados en este proceso (Altmeyer y col 1993, Galán y Curtiss 1990).

La obtención de cepas mutantes de *S.typhimurium* con defectos en los procesos de infección e invasión han permitido identificar a varios genes involucrados en estos procesos (Galán y Curtiss 1989). Además, el análisis de la secuencia de nucleótidos de la región *inv* ha permitido identificar a los genes *invH*, *invF*, *invG*, *invE*, *invA*, *invB*, *invC*, *invI*, *invJ*, *spaO*, *spaP*, *spaR* y *spaS* (Galán 1996). Por otra parte, el análisis funcional de cepas de *Salmonella* con mutaciones en estos genes ha permitido establecer que con la excepción de *invB*, todos los demás son necesarios para que la bacteria entre a las células epiteliales (Galán 1996). Además, solo las mutaciones en *invH* (Altmeyer y col 1993) tienen un efecto importante en la capacidad de la bacteria de unirse a células en cultivo, lo que muestra que la unión a las células y la entrada a éstas

son eventos diferentes para el microorganismo.

Por su parte, Galán y Curtiss en 1989 identificaron una cepa de *Salmonella typhimurium* con una mutación en el gen *invA* que la hacía deficiente en la capacidad de colonizar el epitelio intestinal del ratón cuando se administraba por vía oral; este hecho resultó en una dosis letal 50 mayor para la bacteria mutante.

Se ha visto también que varias cepas de *Salmonella* poseen un plásmido (50-90 Kd) que está asociado con virulencia (Gulig y col 1993). Estos plásmidos poseen un segmento conservado de 8 Kb que es capaz de restaurar la virulencia en las cepas curadas del plásmido. Dentro de este segmento de 8 Kd se han identificado varios genes (*spvABCD* y *spvR*), algunos de los cuales son inducidos dentro del macrófago (Fierer y col 1993, Rhen y col 1993) así como en condiciones de inanición (Valone y col 1993). La función exacta de los péptidos codificados en esta región no se conoce, pero se ha visto que la velocidad de crecimiento de *S.typhimurium* es mayor en el ratón si posee los plásmidos antes mencionados (Gulig y Doyle 1993).

En estos plásmidos de virulencia se ha identificado también un gen (*rck*) que codifica para una proteína de 17 Kd que interfiere con la formación del complejo de ataque a la membrana del sistema del complemento (Heffernan y col 1992).

Por otra parte, se han identificado también genes en *Salmonella* que están involucrados en la resistencia de la bacteria frente a péptidos catiónicos como las defensinas (producidas por las células epiteliales) y las criptidinas (producidas por los macrófagos). En este sentido se ha visto que mutaciones en *phoP* y *phoQ* incrementan la susceptibilidad de la bacteria a las defensinas hasta en 1000 veces (Fields y col 1989), aunque las proteínas responsables de estos procesos todavía no se conocen. La resistencia a estos

péptidos catiónicos se considera que puede estar mediada por proteasas ya que se han identificado peptidasas periplásmicas que degradan a la maganina (Groisman 1994).

Un factor importante en la virulencia de la *Salmonella* es su capacidad de sobrevivir dentro del macrófago. Varios genes asociados con esta propiedad se han identificado (Foster y Spector 1995, Baumler y col 1994, Libby y col 1994), entre los que podemos citar: *htrA*, *purD*, *phoPQ*, *nagA* y *fliD*. De estos genes, uno de los más estudiados ha sido el *phoPQ*. Se ha visto que cepas con mutaciones en *phoPQ* sobreviven mucho menos dentro de los macrófagos en comparación con las cepas que no tienen la mutación; sin embargo, se piensa que este hecho puede ser por la capacidad de resistencia disminuida que tienen las cepas mutadas hacia los péptidos catiónicos como las defensinas. También existen reportes en el sentido de que *S.typhimurium* puede impedir la fusión del fagosoma con el lisosoma en el macrófago (Ishibashi y Arai 1990) lo que evitaría que la bacteria estuviera en contacto con todos los compuestos tóxicos presentes en los lisosomas.

Como puede verse, *S.typhimurium* es un organismo muy complejo que tiene la capacidad de responder y adaptarse al medio en el que se desarrolle y muchos de estos cambios y adaptaciones están asociadas con la generación de daño para el huésped que la alberga.

Con relación a los mecanismos específicos de defensa en las mucosas, se pensaba que la IgA podía tener alguna función por el hecho de ser la inmunoglobulina que se encontraba en mayor cantidad en las secreciones y por la gran cantidad de células productoras de IgA en las mucosas (Weisz-Carrington y col 1979, Walker e Isselbacher 1977, Crabbé y col 1970). Sin embargo, su importancia se consideraba secundaria ya que una gran proporción de las personas con hipogamaglobulinemia del isotipo IgA no presentan

afecciones y si las tienen por lo menos no son tan severas (Burrows y Cooper 1997, Lamm 1997). Además, los métodos de cuantificación de las inmunoglobulinas en secreción presentaban problemas técnicos y el hecho de que la IgG estuviera asociada a protección en contra de algunos agentes infecciosos hizo que a la IgA no se le diera la importancia adecuada. No fue sino a partir de los 80s que el papel de la IgA se revaloró (Mestecky y col 1986).

En la actualidad se sabe que la IgG es la inmunoglobulina que se encuentra en mayor concentración en suero, pero la que se produce en mayor cantidad en el hombre es la IgA (Russell y Mestecky 1988, Mestecky y col 1986). Se estima que la producción diaria de IgA en una persona adulta de aproximadamente 70 Kg es de 3.6 a 9.2 g/día contra 3 g/día de IgG (Mestecky y col 1986). Este hecho probablemente refleje la enorme superficie que representan las mucosas y en donde la IgA desempeña un papel preponderante (McGhee y Kiyono 1992).

Estudios recientes han mostrado que anticuerpos monoclonales IgA son capaces de conferir protección en ratones contra el desafío oral de *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhimurium* (Michetti y col 1992, Winner y col 1991). Se considera que el mecanismo de acción de la IgA es impidiendo que algunos microorganismos y/o sus productos tengan acceso a los tejidos del huésped, al bloquear su primer contacto con las células epiteliales. Kaetzel y col en 1991 demostraron que complejos antígeno-anticuerpo del isotipo IgA pueden ser transportados por células epiteliales *in vitro*, desde la superficie basal hasta la apical y propuso que antígenos que hayan atravesado las mucosas pueden ser eliminados *in vivo* de esta forma. Por su parte Mazanec y col en 1992 utilizando también cultivo de células epiteliales infectadas con virus Sendai, observaron que anticuerpos monoclonales IgA pueden disminuir la replicación viral dentro de las células, lo que sugiere que éste puede ser otro mecanismo de acción de

la IgA.

Actualmente se considera que los mecanismos específicos de defensa de las mucosas son responsabilidad del tejido linfoide asociado a éstas (MALT del inglés mucosa associated lymphoid tissue). Algunos autores han dividido a este tejido en una rama aferente u organizada que incluye a las placas de Peyer y demás acúmulos de tejido linfoide, y una rama eferente o difusa que involucra a linfocitos T, B y células plasmáticas que se encuentran dispersos en el epitelio y/o la lámina propia de las mucosas (Kraehenbuhl y Neutra 1992, Targan 1992).

En las placas de Peyer se han identificado 4 zonas en base al tipo de células y su distribución (Ermak y Owen 1986, Butcher y col 1982, Rouse y col 1982, Poppema y col 1981, Sobhon 1973). La primera corresponde al centro germinal constituido principalmente por linfocitos B, células dendríticas foliculares, algunos macrófagos y pocos linfocitos T; la segunda rodea al centro germinal y constituye zona folicular o corona donde se observan linfocitos B y pocos linfocitos T y células reticulares. La tercera, ubicada entre el folículo y las células epiteliales corresponde a la región subepitelial o cúpula donde se observan acúmulos pequeños de linfocitos B y T, células plasmáticas, células dendríticas y algunos macrófagos. Y finalmente, la cuarta zona localizada entre los folículos y que se denomina zona interfolicular, está formada por linfocitos T, pocos linfocitos B, algunos macrófagos y células plasmáticas. Hay que tomar en cuenta que estos órganos linfoides son estructuras dinámicas que cambian constantemente su forma, ya que son sitios donde se están llevando a cabo procesos de activación y diferenciación de células como resultado de estímulos antigénicos (Liu y col 1992, Kraal y col 1982).

Se considera que las placas de Peyer son estructuras importantes en el establecimiento y regulación de la respuesta inmune local (Enders y col

1988 y 1987). Se sabe también que los linfocitos T de placas de Peyer están involucrados en el cambio de isotipo de inmunoglobulina de IgM a IgA en linfocitos B y en su diferenciación a células plasmáticas (Benson y Strober 1988, Kiyono y col 1984, Kawanishi y Strober 1983;).

Se sabe que los antígenos en el intestino delgado son captados y transportados por las células M que se encuentran en el epitelio que recubre a las Placas de Peyer (Amerogen y col 1992, Kraehenbuhl y Neutra 1992). En este sitio, los antígenos son presentados a los linfocitos T y B que se activan y dejan las Placas de Peyer por los vasos linfáticos eferentes. Estos linfocitos activados son llevados a los ganglios linfáticos mesentéricos y posteriormente a la circulación sanguínea a través del conducto torácico y finalmente regresan a la lámina propia del tubo digestivo y en general al tejido conectivo de las mucosas (Weisz-Carrington y col 1991, Holzmann y Weissman 1989, Butcher y col 1980). Como se mencionó anteriormente, la lámina propia representa una rama eferente ó efectora del sistema inmune asociado a las mucosas y en este sitio se observan principalmente: linfocitos T y B, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y células cebadas. Los linfocitos T representan del 40-60% de las células, los linfocitos B del 20-40% (incluyendo células plasmáticas), los macrófagos el 10%, los eosinófilos el 5% y las células cebadas del 1-3% (Staats y col 1994, Parrot y col 1983, Lyscom y Brueton 1982).

Por otra parte, los linfocitos intraepiteliales constituyen una población de células muy heterogéneas que se han identificado en diferentes especies animales (Mosley y col 1994, Bucy y col 1988, Gorrell y col 1988, Wilson y col 1986, Ernst y col 1985). Asimismo, se ha visto que la mayoría de estos linfocitos expresan el dímero $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ del TcR, pero la proporción de cada una de estas poblaciones celulares depende de la edad del animal (Takeuchi y col 1993, Guy-Grand y col 1991, Maloy y col 1991, Bandeira y col 1990), la flora

microbiana del tubo digestivo (Umesaki y col 1993, Guy-Grand y col 1991, Bandeira y col 1990, Gorrell y col 1988) y de la característica genética del animal (Guy-Grand y col 1991, Viney y col 1989).

La mayoría de los linfocitos intraepiteliales expresan el marcador CD8 (Sim 1995). Sin embargo, en los humanos la mayoría de estas células CD8 expresan el dímero $\alpha\beta$ del TcR (Bucy y col 1989); en cambio en los ratones estas células CD8 expresan el dímero $\gamma\delta$ del TcR (Bonneville y col 1988, Goodman y Lefrancois 1988;) aunque como se mencionó anteriormente, su proporción puede variar dependiendo de factores como la edad y la flora microbiana del tubo digestivo. De igual forma, la proporción de linfocitos intraepiteliales varía a lo largo del intestino (Camerini y col 1993, Fukushima y col 1991)

Se piensa que los linfocitos intraepiteliales deben de ser una de las primeras barreras de defensa del organismo en contra de agentes infecciosos debido al sitio donde se localizan. Se sabe que estas células adquieren propiedades citolíticas (*in vivo*) después de estar en contacto con microorganismos y que esta propiedad está relacionada con la expresión de Thy-1 (Lefrancois y Goodman 1989).

Por otro lado, se ha visto que los linfocitos intraepiteliales $\gamma\delta$ expresan preferentemente algunos genes V tanto para cadenas γ (V γ 7) como para cadenas δ (V δ 4,5,6,7) (Sim 1995, Hass 1993, Sydora y col 1993), lo cual reduciría el repertorio de antígenos con los cuales pudieran interactuar; en cambio, no se ha reportado que los linfocitos intraepiteliales $\alpha\beta$ tengan restricciones de este tipo.

Algunos de estos linfocitos no reconocen al antígeno asociado a las moléculas clásicas del complejo mayor de histocompatibilidad (tipo I y tipo II), sino que lo reconocen asociado a moléculas 'tipo I' del complejo mayor de

histocompatibilidad como CD1 (Porcelli y col 1998, Tangri y col 1996, Bendelac y col 1995). Además, las moléculas CD1 pueden presentar antígenos al linfocito T no solo de naturaleza peptídica, sino que estos antígenos pueden ser lípidos ó glucolípidos (Porcelli y col 1998). Se sabe también que las moléculas CD1 son expresadas por células epiteliales del intestino (Panja y col 1993, Blumberg y col 1991, Bleicher y col 1990) y por ende pueden activar a los linfocitos en el epitelio.

La función de los linfocitos intraepiteliales no se conoce con precisión. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se ha visto que tienen propiedades citolíticas y que producen varias interleucinas (Sim 1995, Haas 1993) lo que les confiere la capacidad de poder modular la respuesta inmune local.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos $\gamma\delta$ representan una proporción muy importante de los linfocitos intraepiteliales. Sin embargo, hay que aclarar que no es el único sitio donde se localizan y que aunque su función tampoco se conoce con precisión, parecen ser muy importantes en la respuesta inmune local. Se ha visto que ratones deficientes en células $\gamma\delta$ presentan una respuesta inmune local humoral disminuida (Fujihashi y col 1996). Por otro lado, hay reportes contradictorios con relación al papel que estos linfocitos $\gamma\delta$ puedan tener en la resistencia y protección en contra de *Salmonella* en el ratón (Weintraub y col 1997, Mixter y col 1994).

Como podemos ver el sistema inmune asociado a las mucosas y en concreto al tubo digestivo, presenta características muy particulares. El contar con un modelo experimental de una enfermedad infecciosa asociada al tubo digestivo, así como con un método de inmunización que confiera protección nos permitirá comprender mejor los mecanismos involucrados en ambos procesos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema inmune asociado a las mucosas en el tubo digestivo, presenta características muy particulares. Por tal motivo, es necesario contar con un modelo inmunológico experimental de una enfermedad infecciosa del tubo digestivo.

OBJETIVOS

Establecer un modelo de inmunización intestinal contra *Salmonella typhimurium* en el ratón y determinar las diferencias en el número de células linfoides en el intestino delgado de estos animales con respecto a animales controles así como con animales enfermos por infección con la bacteria.

HIPOTESIS

Los procesos de infección e inmunización oral en el ratón contra *Salmonella typhimurium* producen cambios en el número de células linfoides locales como resultado del proceso al que están siendo sometidos los animales.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratones hembras BALB/c Ann de 8 a 12 semanas de edad, procedentes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM; los animales se mantuvieron en cajas, con un número máximo de 10 ratones por caja, con agua y alimento *ad libitum*. Se utilizó un conejo hembra Nueva Zelanda Blanco de aproximadamente 3 Kg de peso y varias ratas Wistar.

Cepas Bacterianas. Se ocuparon 2 cepas de *Salmonella typhimurium* (serogrupo B) aisladas de casos clínicos de gastroenteritis en niños, las cuales se denominaron en el laboratorio como F1 y F3. La bacteria F3 tiene la capacidad de utilizar al citrato como fuente de carbono y es resistente a la ampicilina (amp^r); estas características nos sirvieron para poder diferenciar ambas cepas durante los experimentos.

Dosis Leta1 50 (DL-50). Con el fin de evaluar su virulencia, se determinó la DL-50 de las cepas de *S. typhimurium* F1 y F3, al ser administradas por vía oral en ratones. Para esto, se sembraron 50 ml de caldo soya tripticasa (CST)(Bioxon de México S.A. de C.V., Oaxaca, Oax.) con 0.5 ml de un cultivo de salmonela de toda la noche. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37°C en agitación a 100 r.p.m. (Orbit Shaker, Lab-Line Instruments Inc. ,Ill.USA) durante 3 horas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7 000 x g a 4°C (Sorvall RC-5B, Dupont Co. USA) y se resuspendieron en 5 ml de solución salina isotónica estéril (SSIE). A partir de esta suspensión de bacterias se hicieron diluciones en SSIE con las cuales se infectaron ratones y se sembraron placas de agar soya tripticasa. Se registró el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en cada dilución y el número de animales muertos

a los 15 días.

Protocolos de inmunización. a) Administración de la bacteria F1 en cinco ocasiones. Un método de inmunización que se probó fue la administración de la bacteria F1, que es poco virulenta para el ratón, en grandes dosis. En este caso, 3 grupos de ratones (con 10 animales por grupo) recibieron 9×10^8 UFC de la bacteria F1 por vía oral en 5 ocasiones a intervalos de 4 días. Diez días después de la última dosis, todos los ratones fueron desafiados por vía oral con 10^2 , 10^3 , y 10^4 DL-50 de la bacteria F3 (1.26×10^6 , 1.26×10^7 y 1.26×10^8 UFC respectivamente). Los animales se observaron durante 21 días y se registró el número de muertes.

b) Otra variante de la inmunización con la bacteria F1, fue su administración por vía oral en dosis de 9×10^8 UFC en 2, 4, 6 y 8 ocasiones a intervalos de 4 días. Quince días después de la última dosis, todos los animales fueron desafiados con 100 DL-50 de la bacteria F3 (1.26×10^8 UFC); los animales se observaron durante los siguientes 21 días y se registró el número de muertes.

Aislamiento de *Salmonella* en ratón. Después de la administración a los ratones de la bacteria F1, se hicieron coprocultivos a diferentes tiempos para tratar de aislar a la salmonela. Para esto, las heces de los ratones se sembraron en caldo tetrionato y caldo selenito (Difco Laboratories, USA) y se incubaron 24 horas a 37°C ; a partir de este medio se sembraron placas con agar XLD, Verde Brillante, Sulfito de Bismuto y SS (Bioxon de México S.A. de C.V., Oaxaca, Oax.); a las colonias que crecieron y que presentaban las características de salmonela se les realizaron pruebas bioquímicas y determinación de resistencia a ampicilina (Finegold y Martin 1983).

Además, los ratones que sobrevivieron al desafío con la bacteria

F3, se sangraron y se sacrificaron para extraerles el bazo e hígado con el fin de determinar si la bacteria F3 estaba presente en estos órganos; el procedimiento que se utilizó para el aislamiento de la bacteria fue igual al descrito anteriormente salvo que en este caso el bazo y el hígado se sembraron directamente en las placas de agar.

Anticuerpos y Antisueros. A partir de suero de rata se obtuvo la IgG mediante precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33% de su saturación y posteriormente por cromatografía en columna de DEAE-celulosa equilibrada con fosfatos 0.01M, pH 8 (Harlow y Lane 1988). Con la IgG de rata obtenida se inmunizó un conejo Nueva Zelanda Blanco en 4 ocasiones, a intervalos de 15 días; los 2 primeros estímulos fueron con 500 μg de IgG de rata con adyuvante completo de Freund por vía subcutánea en el cojinete plantar y las 2 últimas inmunizaciones con 2 mg de IgG en PBS por vía intramuscular. Siete días después del último estímulo el conejo se sangró a blanco. Los anticuerpos específicos contra IgG de rata se separaron haciendo pasar el suero anti IgG de rata por una columna de sepharosa 4B-200 acoplada con IgG de rata (March y col 1974), equilibrada con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos (PBS); después de lavar la columna, los anticuerpos específicos se separaron con una solución de glicina-HCl 0.1M pH 2.2 (Hudson y Hay 1989). Estos anticuerpos específicos contra IgG de rata se adsorbieron con IgG de ratón, con el fin de eliminar la reacción cruzada entre las inmunoglobulinas de rata y ratón; para esto, los anticuerpos se hicieron pasar por una columna de sepharosa 4B-200 acoplada con IgG de ratón (March y col 1974); los anticuerpos que no se pegaron a la columna se colectaron y concentraron para su posterior utilización. A los anticuerpos así obtenidos se les acopló biotina de acuerdo al método descrito por Warnke y Levy (1980) que consistió en: a 10 ml del anticuerpo específico en una solución de NaHCO_3 0.1M pH 9 (1mg/ml) se le

agregaron 1.2 ml de una solución de biotin-succinimida (Sigma Chemical Co.St.Louis Mo.USA) en dimetilsulfóxido (1mg/ml) (Sigma Chemical Co.St.Louis Mo.USA); la mezcla se mantuvo en agitación por 4 horas a temperatura ambiente y se dializó contra PBS con azida de sodio al 0.2%, a 4°C. Los anticuerpos se guardaron en alícuotas y se congelaron hasta su utilización.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales de rata del isotipo IgG, dirigidos contra los antígenos linfocitarios murinos Ly1 (53-7-313), Ly2 (53-6-72) y L3T4 (GK 1.5), donados amablemente por el Dr. Guillermo Alfaro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. (Dialynas y col 1983).

Se utilizaron anticuerpos de cabra específicos contra IgG, IgA e IgM de ratón conjugados a peroxidasa (Sigma Chemical Co.St.Louis Mo.USA) y un complejo avidina-peroxidasa (Zymed Laboratories Inc.San Francisco Ca.USA).

Ensayo Inmunohistoquímico. Grupos de ratones normales, inmunes y enfermos se trataron de la siguiente manera: dos días antes de ser sacrificados los animales se dejaron sin alimento pero con agua *ad libitum*, con el fin de que el contenido intestinal no fuera tan abundante. Los animales inmunes se sacrificaron 5 días después del último estímulo antigénico (Van der Heijden y col 1989, Kosco y col 1983, Jeurissen y col 1985) y los animales enfermos hasta que presentaron síntomas de enfermedad (pelo erizado, escalofrío). Todos los animales antes de ser sacrificados se sangraron y se les extrajo el intestino delgado y se separaron las porciones de duodeno (D), yeyuno (Y) e ileon (I). Estas porciones se incluyeron en Histo Prep (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) e inmediatamente después se congelaron en una mezcla de acetona hielo seco y se guardaron a -40°C hasta su utilización. Se obtuvieron cortes del D, Y e I congelados de aproximadamente 5µm de grueso con un criostato (Cryo-cut II, American Optical Co. , Buffalo NY, USA). Los

cortes se recogieron en portaobjetos previamente tratados con albúmina al 1%, glutaraldehído al 2% y glicina 1M; se fijaron con acetona fría durante 30 segundos y se guardaron a -20°C hasta su utilización (Warnke y Levy 1980).

Antes de realizar el ensayo inmunohistoquímico, los cortes de tejido se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 minutos, se trataron con acetona fría por 20 minutos y se lavaron 3 veces con PBS (5 minutos cada vez). La peroxidasa endógena se eliminó tratando los cortes con H₂O₂-metanol (2:98) durante 20 minutos y después se lavaron 3 veces con PBS.

Para la identificación de las células T en los cortes de tejido, las laminillas se trataron de la siguiente manera: primero se incubaron con el sobrenadante del cultivo de células productoras de anticuerpos contra los antígenos Ly1, Ly2 o L3T4 durante 60 minutos; se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron 45 minutos con el anticuerpo contra IgG de rata unido a biotina (1:50); se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (1:50) por 30 minutos; se lavaron 3 veces y se incubaron durante 5 a 10 minutos con una solución de 3,3-diaminobencidina (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo, USA) 0.5 mg/ml en tris-HCl 0.05M pH 7.6 con H₂O₂ (2ul/ml de solución); la reacción de la enzima se paró lavando las laminillas con PBS. Finalmente, las laminillas se limpiaron, se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con bálsamo de Canadá (Gradwohl's 1970).

Para la identificación de las células B, después de eliminar la peroxidasa endógena las laminillas se incubaron 60 minutos con peroxidasa-anti IgG de ratón (1:25), peroxidasa-anti IgA de ratón (1:25) ó peroxidasa-anti IgM de ratón (1:25), posteriormente las laminillas se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron de 5 a 10 minutos con la solución de diaminobencidina. Después de esto, las laminillas se lavaron con PBS, se limpiaron, se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con bálsamo de Canadá, igual

que como está descrito anteriormente. En todos los casos, las incubaciones se hicieron a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Las laminillas se observaron en un microscopio óptico (American Optical Co. NY, USA) y se contó el número de células con los diferentes fenotipos por unidad de área utilizando una rejilla ocular graduada. De los grupos de ratones estudiados (normales, inmunes y enfermos) se analizaron el centro germinal de las placas de Peyer (CG-PP), el espacio interfolicular de las Placas de Peyer (EI-PP) y la lámina propia (LP) en las porciones de duodeno, yeyuno e ileon. Cada grupo de animales estaba constituido por 4 a 9 ratones y de cada laminilla se analizaron de 5 a 10 campos. En la Tabla 1 se muestra en forma resumida los datos de animales, secciones del intestino y sitios analizados, así como los marcadores fenotípicos utilizados en este trabajo. Con el fin de eliminar posibles juicios subjetivos, la cuantificación se hizo sin saber previamente de que animal, porción del intestino y anticuerpo utilizado se trataba, es decir, se hizo un estudio ciego.

Análisis Estadístico. Los resultados de los estudios de protección se procesaron y se sometieron a un análisis estadístico de χ^2 (Infante 1984). Para el caso de los estudios con los marcadores fenotípicos, el análisis estadístico se hizo con la prueba t de Student ó U de Mann-Whitney dependiendo de si los resultados de los grupos analizados presentaban una distribución normal o no (Infante 1984). En todos los casos se utilizó un nivel $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS.

DL-50. Los resultados de la mortalidad en ratones, causada por la bacteria F3, quince días después de haber sido administrada por vía oral, se muestran Figura 1. Puede verse que la dosis de 10^4 UFC, mató al 50% de los ratones y las dosis 10^5 y 10^6 UFC mataron al 83% y 100% de los animales respectivamente. Con estos datos, la DL-50 se determinó de acuerdo al método de Reed y Muench (McCarty 1978) y se encontró que fue de 1.26×10^4 UFC.

Para la bacteria F1, la DL-50 no se determinó con exactitud pero mostró ser mayor de 10^{13} UFC ya que dosis de 10^{12} UFC administradas por vía oral no mataron a ninguno de los ratones y dosis de 10^{13} UFC solo mataron al 16% de los animales (datos no mostrados).

Inmunización con la Bacteria poco Virulenta (F1). Debido a que la bacteria F1 mostró ser poco virulenta para el ratón, se decidió utilizarla como vacuna y después desafiar a los animales con la bacteria virulenta (F3). En este primer ensayo se determinó administrar a la bacteria F1 en 5 ocasiones en dosis de 9×10^8 UFC por estímulo a intervalo de 4 días y posteriormente desafiar a los animales con 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC de la bacteria F3 (aproximadamente 100, 1 000 y 10 000 DL-50 respectivamente) Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Puede verse que prácticamente el 100% de los animales controles murió, en cambio los animales experimentales desafiados con aproximadamente 100 DL-50 (10^6 UFC) se protegieron en un 89% ($P < 0.001$) y los desafiados con 1,000 y 10,000 DL-50 (10^7 y 10^8 UFC respectivamente) en un 70% ($P < 0.002$).

Después de la última administración de la bacteria F1 (pero ante

de la administración de la bacteria F3) se tomaron muestras de heces de algunos ratones a diferentes tiempos, para tratar de aislar e identificar a la bacteria. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y se observa que a medida que pasa el tiempo después de la inoculación, el porcentaje de recuperación de la bacteria F1 disminuye, siendo a las 4 horas del 100% y a los 10 días del 25%.

Además, de varios de los ratones que sobrevivieron al desafío con la bacteria F3 fue posible aislarla (a la bacteria F3) tanto de heces como de bazo y/o hígado (Tabla 4). En este caso, el porcentaje de animales de los que se pudo aislar a la bacteria fue proporcional a la dosis de desafío; es decir, los animales que se desafiaron con la dosis mas alta (10^8 UFC ó 10 000 DL-50) presentaron el porcentaje de recuperación mayor (71% en heces y 86% en hígado y/o bazo), mientras que solamente se recuperó en un 25% de los animales desafiados con 10^6 UFC (100 DL-50)

Una variante del esquema de inmunización con la bacteria F1 fue su administración en dosis de 9×10^8 UFC en 2, 4, 6 y 8 ocasiones a intervalos de 4 días; en este caso, todos los animales se desafiaron con 10^6 UFC de la bacteria F3 (aproximadamente 100 DL-50). Los resultados se muestran en la Tabla 5. Puede verse que 2 estímulos con F1 indujeron una protección del 46% y 4, 6 y 8 estímulos proporcionaron una protección del 70%. En todos los casos la diferencia con el grupo control (que no recibió ningún estímulo con F1) fue estadísticamente significativa ($P < 0.04$).

Quince días después del último estímulo antigénico con la bacteria F1 y antes del desafío con la bacteria F3, se realizaron coprocultivos de varios de los ratones. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y puede verse que en los grupos de ratones que recibieron 2 y 4 dosis fue posible aislar a la bacteria F1 en 1 de 5 animales (20%), mientras que en los otros grupos no se aisló a la bacteria en ninguno de los animales analizados. Por el contrario, fue posible

aislar a la bacteria F3 en varios de los ratones que sobrevivieron a su desafío tanto de hígado como de bazo (Tabla 7).

Con base en estos resultados, se eligió administrar la bacteria F1 en 4 ocasiones por vía oral en ratones, a intervalos de 4 días, como esquema de inmunización.

Ensayo Inmunohistoquímico. Los resultados de la cuantificación de los diferentes tipos de células linfoides a lo largo del intestino delgado de los ratones analizados, se muestran en las Figuras 2 a la 5. Cada símbolo (*, ▲, □) representa el promedio del número de células obtenido en 5 a 10 campos analizados (a 400X) por ratón. Además, para cada ratón se incluyeron controles negativos, cuyo valor se restó del valor obtenido con cada anticuerpo específico. Estos controles corresponden a cortes de tejido que fueron procesado como los demás pero en donde el primer anticuerpo utilizado fue uno no relacionado con el fin de determinar el pegado inespecífico, así como cortes en donde no se utilizó ningún anticuerpo con el fin de determinar la peroxidasa endógena residual.

En LP de los animales normales se observaron células con todos los determinantes antigénicos analizados, aunque las más abundantes fueron las que presentaron los antígenos Ly1 e IgA, y las menos abundantes las Ly2 (Figura 2A). En general, en LP no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el número de células linfoides con los diferentes fenotipos estudiados a lo largo del intestino, con excepción de las células con IgA. Las células con IgA fueron menos abundantes en ileon en comparación con duodeno y yeyuno aun cuando la diferencia solo fue significativa con respecto a duodeno ($p < 0.05$).

En los CG-PP de los animales normales (Figuras 2B), en general tampoco se encontraron diferencias en el número de células linfoides con los

distintos marcadores a lo largo del intestino. Sin embargo, las células L3T4 fueron poco frecuentes en ileon en comparación con duodeno y yeyuno, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En el EI-PP de los animales normales, las células que se encontraron en mayor cantidad a lo largo de todo el intestino fueron las que presentaron el antígeno Ly1 (Figura 2C). Las células L3T4 también fueron muy abundantes pero solo en duodeno y yeyuno ya que en ileon no se identificaron y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Los resultados de la cuantificación de células linfoides a lo largo del intestino en LP de ratones normales, inmunes y enfermos, se muestra en la Figura 3. Puede verse que en algunos casos hubo diferencias en el número de células con los diferentes fenotipos entre los ratones normales, inmunes y enfermos. En duodeno por ejemplo, el número de células Ly2 fue mayor en los animales enfermos en comparación con los animales normales ($p < 0.05$). En cambio, las células con IgG e IgA fueron menos abundantes en los animales enfermos en comparación con los animales inmunes ($p < 0.05$)(Figura 3A).

Por otro lado, el número de células Ly1 en LP de los ratones enfermos fue menor que en los animales normales, tanto en yeyuno ($p < 0.05$) como en ileon ($p < 0.005$)(Figuras 3B y 3C).

En los CG-PP de duodeno, no hubo ninguna diferencia en el número de células linfoides entre los animales normales, inmunes y enfermos (Figura 4A) Sin embargo, en los CG-PP de yeyuno, el número de células L3T4 disminuyó en los animales enfermos en comparación con los animales normales ($p < 0.05$)(Figura 4B). Por su parte, las células Ly1 en los CG-PP de ileon fueron menos abundantes en los animales enfermos en comparación con los animales normales ($p < 0.001$) e inmunes($p < 0.05$)(Figura 4C). Además, en ileon también se observó un ligero aumento en el número de células productoras de IgA en los

animales inmunes, en comparación con los animales normales y enfermos, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo.

Con respecto a EI-PP, se observó una disminución en el número de células L3T4 a nivel de duodeno en los ratones enfermos en comparación con los ratones normales e inmunes (Figura 5A), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. De igual forma, en EI-PP de yeyuno de los animales enfermos se observó una disminución en el número de células L3T4 en comparación con los animales normales (Figura 5B) y en este caso la diferencia sí fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). En cambio, en EI-PP de íleon no se observó ninguna diferencia en el número de células con los diferentes marcadores entre los animales normales inmunes y enfermos (Figura 5C).

A manera de ejemplo, en la Figura 6 se encuentran las fotos del corte histológico del duodeno de un ratón normal a 40 y 200 aumentos. En este caso se utilizó un anticuerpo monoclonal contra el antígeno Ly 1 y se pueden ver las células marcadas en lámina propia y en una placa de Peyer.

DISCUSIÓN

Las enfermedades infecciosas gastrointestinales son un problema de salud en países como el nuestro, lo que ha ocasionado que se propongan métodos de vacunación para su prevención y/o control. Algunos modelos experimentales han utilizado la administración de dosis subletales del agente patógeno como método de inmunización con resultados alentadores (Smith y col 1980, Angerman y Eisenstein 1978). Sin embargo, en este trabajo la administración de dosis subletales de la bacteria virulenta F3 en ratones BALB/c no funcionó como método de inmunización (datos no mostrados). Aunque no se determinaron las causas de las discrepancias con lo reportado por otros autores, algunos factores que pudieron contribuir a estas diferencias son la especie animal utilizada, la vía de administración y la dosis administrada.

Por otro lado, existen cepas de *Salmonella* con mutaciones en algunas de sus vías metabólicas que las hacen no virulentas y que además han demostrado ser seguras y eficaces como vacunas en algunas especies animales (Nnalue y Lindberg 1990, O'Callaghan y col 1990 y 1988, Hackett y col 1988, Robertsson y col 1983, Hoiseth y Stocker 1981). También se ha descrito una cepa de *Salmonella typhi* atenuada para uso en humanos, pero su eficacia no ha sido en todos los casos la esperada (Edelman y Levin 1986). Además, en la naturaleza se pueden encontrar cepas de *Salmonella* con diferente grado de patogenicidad y algunas de ellas son avirulentas en ciertas especies animales, tal es el caso de la bacteria F1 que aunque fue aislada de un caso clínico de gastroenteritis infantil, en el ratón no causó ningún daño aparente, aun cuando se administró en dosis de 9×10^8 UFC por vía oral en repetidas ocasiones. Sin

embargo, fue posible aislar a la bacteria F1 a partir de heces (Tablas 3 y 6) lo cual correlaciona con lo reportado en otros sistemas (Srisart y col 1985, Robertsson y col 1983). De igual forma, la frecuencia de recuperación de la bacteria F1 disminuyó conforme pasó el tiempo después de su administración (Tabla 3), lo cual parece lógico y correlaciona también con lo reportado por Robertsson y col (1983). La permanencia del microorganismo en el huésped parece ser un factor importante en la inducción de una respuesta inmune (O'Callaghan y col 1988, Srisart y col 1985), por lo menos ante procesos de inmunización e infección por vía oral.

La bacteria F1 funcionó bien como vacuna ya que confirió una protección del 70% ante el desafío con 10,000 DL-50 de una bacteria altamente virulenta como es la F3 (Tabla 2). También se observó que el número de estímulos fue un factor importante en la inducción de protección (Tabla 5) y que 4 estímulos fueron suficientes para conferir un 70% de protección. Por lo anterior, se decidió adoptar la administración de la bacteria F1 en 4 ocasiones como método de inmunización para ensayos posteriores.

Aun cuando la bacteria F1 fue capaz de conferir protección, no fue capaz de evitar que la bacteria F3 pasara a nivel sistémico e infectara el hígado y bazo de los ratones (Tablas 4 y 7); este fenómeno llama la atención ya que los animales presentaban una apariencia normal después de 3 semanas de haber sido desafiados, a pesar de estar infectados. Estos resultados sugieren que el paso de la bacteria a nivel sistémico, depende de la dosis de desafío (Tabla 4) ya que a medida que se aumentó la dosis, la frecuencia de recuperación de la bacteria a partir de bazo e hígado también fue mayor. Es necesario tomar en cuenta este tipo de fenómenos para el diseño de vacunas, sobre todo si se van a utilizar en humanos.

Con el fin de ampliar la investigación sobre el papel que

desempeña la inmunidad local en la protección conferida por la bacteria F1 en este modelo, se decidió estudiar el cambio en las poblaciones de células linfoides del intestino delgado del ratón asociados a los procesos de infección e inmunización con *Salmonella*.

Los anticuerpos en contra de los diferentes Ag de superficie que se utilizaron, fueron probados por métodos inmunohistoquímicos en cortes histológicos de bazo de ratón. Todos los anticuerpos identificaron zonas que concordaban con lo reportado en la literatura en relación a la localización principal de los linfocitos T ó B y en que proporción se encuentran tomando en cuenta las subpoblaciones de cada uno de ellos. Por esta razón se decidió utilizarlos para el estudio inmunohistoquímico del tubo digestivo del ratón.

El hecho de haber realizado la cuantificación de las células linfoides del intestino delgado del ratón en forma ciega, permitió evitar predisposiciones o tendencias que pudieran presentarse en el momento de analizar las laminillas. Los resultados obtenidos arrojan datos interesantes a pesar de mostrar una gran dispersión.

En el análisis de las laminillas correspondientes a LP de los animales normales (Figura 2A) se encontró una gran cantidad de células productoras de anticuerpos, principalmente del isotipo IgA, lo cual concuerda con los reportes de que la IgA es la principal inmunoglobulina involucrada en la protección de las mucosas (Mazanec y col 1993, McGhee y Kiyono 1992, Mestecky y col 1986). También encontramos que el número de células con IgA disminuye a lo largo del tubo digestivo y que aunque esta disminución no fue en todos los casos significativa, concuerdan con lo reportado por Van der Heijden quién cuantificó el número de células productoras de IgA en aislados celulares de LP del tubo digestivo del ratón (Van der Heijden y col 1987).

Asimismo, se observaron linfocitos T en LP lo cual concuerda con

lo reportado por Van der Heijden y Stok (1987), Parrott y col (1983) y Lyscom y Brueton (1982). Lyscom observó que en células aisladas de rata, existía prácticamente la misma proporción de linfocitos T que de linfocitos B; en cambio, Van der Heijden y Stok (1987) y Parrott y col (1983) encontraron un número ligeramente mayor de linfocitos B que de linfocitos T en células aisladas de LP de ratón. En este trabajo se encontraron proporciones prácticamente iguales de células T y células B en la LP de ratón. Las diferencias en los datos reportados entre estos trabajos pueden deberse a los diferentes métodos empleados en esos estudios.

En EI-PP de los animales normales (Figura 2C), las células que se encontraron en mayor cantidad fueron los linfocitos T, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Ermak y Owen 1986, Sminia y col 1983, Rouse y col 1982). Algo que llamó mucho la atención fue la ausencia de células L3T4 en el EI-PP en el íleon; la diferencia en el número de estas células entre el íleon y las otras porciones analizadas del intestino (duodeno y yeyuno) fue tan marcada que es difícil considerar que sea debida a artefactos o al número de animales analizados. Además, esta falta de células L3T4 en EI-PP también se observó en íleon de animales enfermos y en 2 de 3 animales inmunizados (Figura 5C).

Se sabe que el tipo de células linfoides a lo largo del intestino puede cambiar dependiendo de las condiciones y carga antigénica presentes (Gorrell y col 1988, Van der Heijden y col 1987). Por otro lado, se sabe que en caprinos, bovinos y ovinos, las PP del yeyuno y del íleon son muy diferentes entre sí; estas diferencias radican en su estructura, en las células que las constituyen y en su ontogenia (Griebel y col 1992, Aleksandersen y col 1990). Aun cuando en el ratón no se han identificado diferencias de ese tipo, pudieran existir diferencias más sutiles como la ausencia de células L3T4 en el espacio interfolicular de las placas de Peyer de íleon y su estudio podría arrojar más

información sobre la fisiología de la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal.

Se sabe que en los CG de los folículos linfoides, tanto en los ganglios linfáticos como en las PP, las células que se encuentran en mayor cantidad son los linfocitos B (Liu y col 1992, Ermak y Owen 1986, Buchter y col 1982). En este trabajo, en los CG-PP se observaron linfocitos B pero en baja cantidad, usando como marcadores las inmunoglobulinas (Figura 2B). Los CG son sitios de gran importancia en el proceso de activación de los linfocitos B y se ha visto que durante su activación, los linfocitos B dejan de expresar inmunoglobulinas de superficie (Liu y col 1992); este hecho pudo haber sido uno de los factores que contribuyeron a que el número de células B con inmunoglobulinas que nosotros encontramos en los CG haya sido tan bajo. En cambio, el número de células T (Ly1) que se encontraron en los CG fue mucho mayor que el de linfocitos B, lo cual difiere de lo reportado por otros investigadores (Ermak y Owen 1986, Buchter y col 1982). Estos resultados son difíciles de explicar, pero creemos que pueden deberse a que el Ag. Ly1 que nosotros identificamos se ha visto asociado tanto a linfocitos T como a cierta población de linfocitos B (Abbas y col 1995), sin embargo, habría que probar que este es el caso.

Con respecto a las células linfoides de la LP en los diferentes grupos de animales estudiados, se observó una disminución de células con IgA e IgG en duodeno y de células T en yeyuno e íleon de los animales enfermos. Esto parece lógico ya que los animales sufren un proceso infeccioso. Se sabe que *Salmonella typhimurium* afecta principalmente al íleon (Finlay y Falkow 1989, Tannock y col 1975, Carter y Collins 1974) y por eso, el número de células Ly1 debió verse afectado en esta parte del intestino. Las alteraciones observadas en duodeno y yeyuno pueden haber sido causadas también por el mismo

proceso infeccioso (Sprinz y col 1966) o a una alteración del sistema inmune secretor que comprende a todas las mucosas (Pierce 1980, Weisz-Carrington y col 1979). Existen pocos reportes con relación al cambio de células linfoides del tubo digestivo, asociado a un proceso infeccioso. En borregos se ha reportado la disminución de células CD8 en la LP y en el epitelio de duodeno después de la infección con *Trichostrongylus colubriformis* (Gorrell y col 1988). Por el contrario se ha observado su aumento en ratas y ratones después de la infección con *Nippostrongylus braziliensis* y *Giardia muris* respectivamente (Ferguson 1977).

En el caso de las PP, nuevamente se observó que en los animales enfermos hubo una disminución en algunas poblaciones celulares como consecuencia del proceso infeccioso; en este caso, fueron las células L3T4 las que disminuyeron en los CG-PP de yeyuno y en el EI-PP de duodeno y yeyuno, lo que sugiere que estas células deben jugar un papel muy importante en la prevención del proceso infeccioso. En el caso de los animales inmunizados el único cambio observado fue el aumento del número de células con IgA en los CG-PP del íleon, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo probablemente por el número de PP analizadas.

Haciendo una síntesis de los resultados, no se observaron cambios en el número de células linfoides en el intestino delgado de los animales inmunizados comparado con el número de células en los animales controles. Creemos que si bien el proceso de inmunización no indujo cambios en el número de células totales en el intestino, es evidente que el procedimiento de inmunización utilizado indujo un estado de resistencia en los ratones, que les permitió sobrevivir al desafío con dosis altas de una cepa virulenta administrada por vía oral. Este hecho hace necesario el estudio de las poblaciones de células linfoides específicas para el antígeno en el intestino de estos animales, con el

objeto de evaluar los posibles cambios en las poblaciones celulares así como su estado funcional. Todo esto permitiría comprender mejor los mecanismos involucrados en el proceso de protección a nivel intestinal.

Por otro lado, sería importante determinar si durante la inmunización con la bacteria F1, esta bacteria coloniza solamente el tubo digestivo o si además invade la mucosa intestinal y posteriormente es eliminada. De igual forma, sería importante saber si la bacteria F3 en los animales inmunizados está siendo eliminada por una respuesta inmune a nivel sistémico y/o local, así como la posible relación que pudieran tener ambas respuestas en la resistencia a la infección. En este mismo sentido, sería recomendable cuantificar el número de bacterias F3 que pasan a nivel sistémico en los animales inmunizados y compararlo con el número de bacterias que pasan a la circulación en los animales controles que se infectan. Finalmente, sería importante determinar si los animales inmunizados con la bacteria F1, administrada por vía oral son capaces de sobrevivir a un desafío con la bacteria F3 administrada por vía parenteral.

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se desarrolló un sistema de inmunización en ratones contra *Salmonella typhimurium* que es altamente reproducible.
- Este sistema tiene la ventaja de que al utilizar la vía oral, favorece la estimulación del sistema inmune de las mucosas, lo cual proporciona un buen modelo para estudiar la respuesta inmune en el intestino delgado del ratón.
- En los animales normales no existen células L3T4 en el espacio interfolicular de las placas de Peyer de íleon.
- No se observaron cambios en el número de células con los marcadores Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA e IgM en el intestino de los ratones inmunizados, con respecto a lo observado en los animales normales.
- Se observó una disminución de las células Ly1 en los animales enfermos en yeyuno e íleon en lámina propia así como en los centros germinales de las placas de Peyer de íleon.
- Se encontró una disminución de células L3T4 en el espacio interfolicular de las placas de Peyer en los animales enfermos a nivel de duodeno y yeyuno.
- Se observó un aumento en el número de células Ly2 en lámina propia de duodeno de los animales enfermos.
- Estos datos sugieren que las células L3T4 desempeñan un papel muy importante en la protección en contra de la infección con *Salmonella typhimurium*.

TABLA 1

Dato sobre grupo de animales estudiados, sitio y sección analizadas y marcadores fenotípicos utilizados.

| | |
|-----------------------|---|
| Grupos de animales* | Normales, Inmunes, Enfermos |
| Sección analizada | Duodeno, Yeyuno, Ileon |
| Sitio analizada | Lamina propia Centro germinal de placas de Peyer Espacio Interfoloicular de placas de Peyer |
| Marcadores utilizados | Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA, IgM |
| Campos observados | 5-10 por laminilla |

* 4-9 ratones por grupo.

TABLA 2

Sobrevida[&] de ratones inmunizados con la cepa de *Salmonella typhimurium* F1^ψ en 5 ocasiones y retados con la cepa de *Salmonella typhimurium* F3 amp[†].

| Dosis de Reto (UFC) | Grupo Control * | Grupo Experimental * | Protección (%) | P ** |
|---------------------|-----------------|----------------------|----------------|---------|
| 10 ⁶ | 0/10 (0) | 8/9 (89) | 89 | < 0.001 |
| 10 ⁷ | 1/10 (10) | 8/10 (80) | 70 | < 0.001 |
| 10 ⁸ | 0/10 (0) | 7/10 (70) | 70 | < 0.002 |

& a los 21 días después de haber administrado la dosis de reto.

ψ 5 estímulos a intervalos de 4 días con 9X10⁶ UFC cada uno

* número de animales vivos/ número de animales retados (%)

** χ^2

TABLA 3

Detección de *Salmonella typhimurium* F1 en heces después de haber sido administrada en 5 ocasiones a ratones por vía oral

| Tiempo * | N° de animales de los que se aisló la bacteria | |
|----------|--|--|
| | N° de animales analizados | |
| 4 horas | 5/5 (100%) | |
| 24 horas | 4/4 (100%) | |
| 4 días | 3/5 (60%) | |
| 7 días | 2/6 (33%) | |
| 10 días | 2/8 (25%) | |

* tiempo en el que se tomó la muestra de heces después de la última administración de la bacteria F1

TABLA 4

Aislamiento[&] de *S. typhimurium* F3 amp^r de los ratones que sobrevivieron al reto con esta misma bacteria y que habían sido previamente inmunizados con la bacteria *S. typhimurium* F1^ψ.

| Dosis de Reto (UFC) | Aislamiento de F3 amp ^r en: | |
|---------------------|--|------------------|
| | Heces * | Bazo y/o Hígado* |
| 10 ⁶ | 2/8 (25%) | 2/8 (25%) |
| 10 ⁷ | 4/8 (50%) | 5/8 (63%) |
| 10 ⁸ | 5/7 (71%) | 6/7 (86%) |

& a los 21 días después de haber administrado la dosis de reto

ψ los ratones fueron inmunizados con 5 dosis de 9×10^8 UFC de F1 a intervalos de 4 días por vía oral

* número de animales de los que se aisló la bacteria/ número de animales sobrevivientes

TABLA 5

Sobrevida* de ratones retados con 100 DL-50 de *Salmonella typhimurium* F3 amp[†] previa inmunización con diferente número de estímulos de *Salmonella typhimurium* F1^ψ

| Número de estímulos | Sobrevida * | Protección (%) | P ** |
|---------------------|-------------|----------------|---------|
| 0 | 1/10 (10%) | | |
| 2 | 5/9 (56%) | 46 | < 0.04 |
| 4 | 8/10 (80%) | 70 | <0.003 |
| 6 | 8/10 (80%) | 70 | <0.003 |
| 8 | 4/5 (80%) | 70 | < 0.008 |

& a los 21 días después de haber administrado la dosis de reto.

ψ 0,2,4,6,y 8 estímulos a intervalos de 4 días con 9×10^8 UFC cada uno por vía oral

* número de animales vivos/ número de animales retados (%)

** χ^2 .

TABLA 6

Aislamiento de *Salmonella typhimurium* F1 de heces* después de haber sido administrada en diferente número de ocasiones por vía oral.

| Nº de estímulos antigénicos | Nº de animales de los que se aisló la bacteria | |
|-----------------------------|--|--|
| | Nº de animales analizados | |
| 0 | 0/5 (0%) | |
| 2 | 1/5 (20%) | |
| 4 | 1/5 (20%) | |
| 6 | 0/6 (0%) | |
| 8 | 0/8 (0%) | |

* los coprocultivos se realizaron: 15 días después del último estímulo.

TABLA 7

Aislamiento[&] de *S. typhimurium* F3 amp^r de los ratones que sobrevivieron al desafío con esta misma bacteria y que previamente habían sido inmunizados mediante la administración de *S. typhimurium* F1^ψ en diferente número de ocasiones.

| Número de estímulos | Aislamiento de la bacteria F3 amp ^r de bazo y/o hígado* |
|---------------------|--|
| 0 | 0/1 (0%) |
| 2 | 2/5 (10%) |
| 4 | 2/8 (25%) |
| 6 | 4/8 (50%) |
| 8 | 4/4 (100%) |

& a los 21 días después de haber administrado la dosis de reto

ψ 0,2,4,6,y 8 estímulos a intervalos de 4 días con 9×10^8 UFC cada uno por vía oral.

* núm de animales de los que se aisló la bacteria de reto/núm de animales que sobrevivieron.

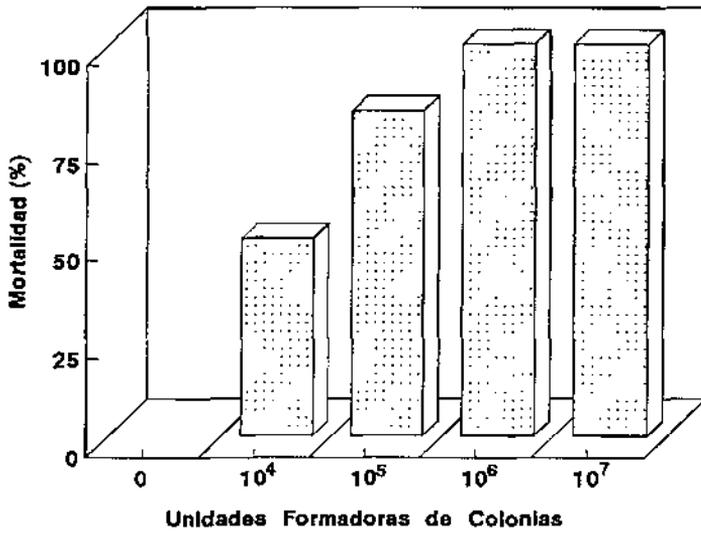


Figura 1. Mortalidad causada por la bacteria *Salmonella typhimurium* F3 amp^r a los 15 días después de haber sido administrada en diferente cantidad por vía oral a ratones Balb/c.

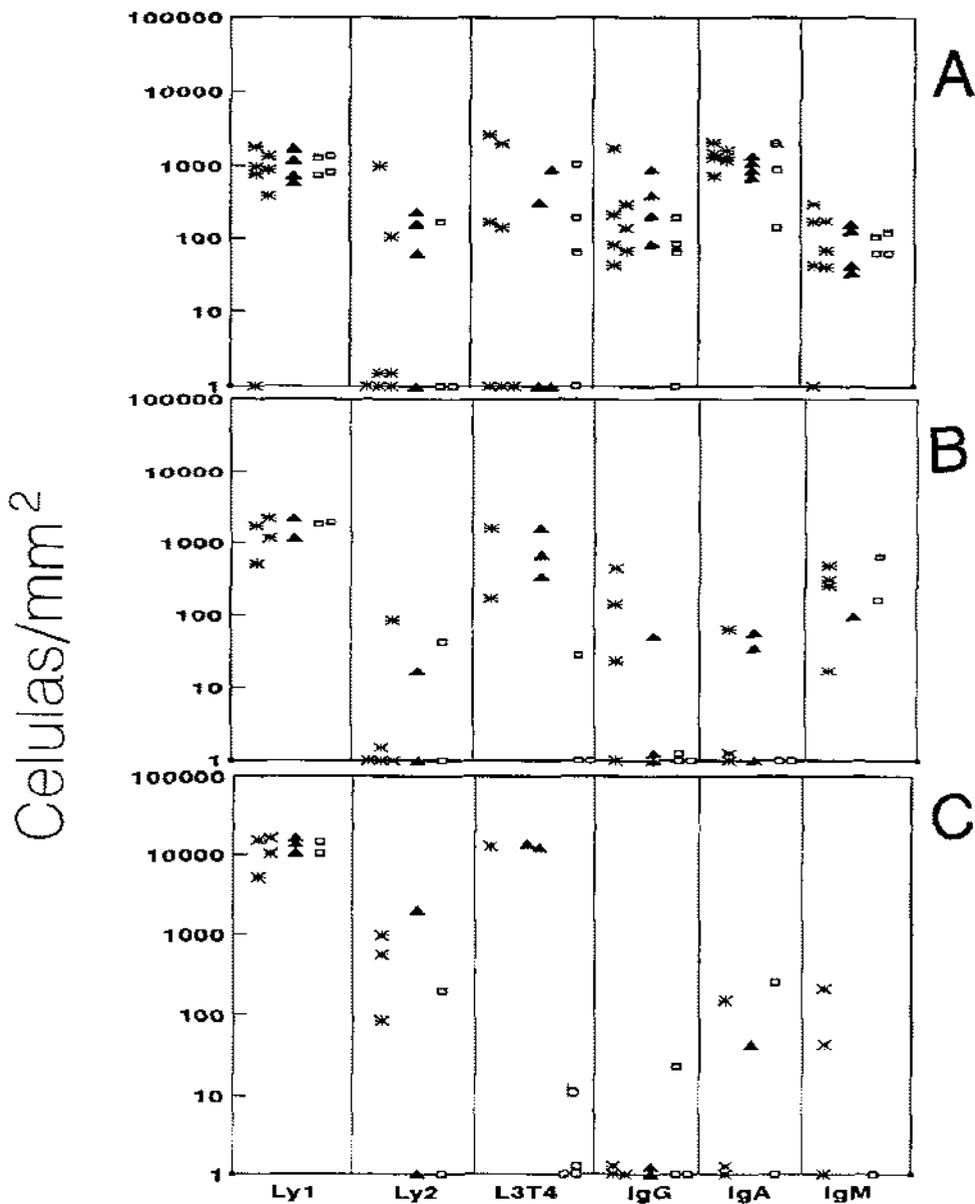


Figura 2. Número de células Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA e IgM por mm² en Lámina Propia (A), Centro Germinal de Placas de Peyer (B) y Espacio Interfollicular de Placas de Peyer (C) de Animales Normales en Duodeno (*), Yeyuno (▲) e Ileón (◻). ^a p<0.05 con respecto a duodeno ^b p<0.05 con respecto a yeyuno.

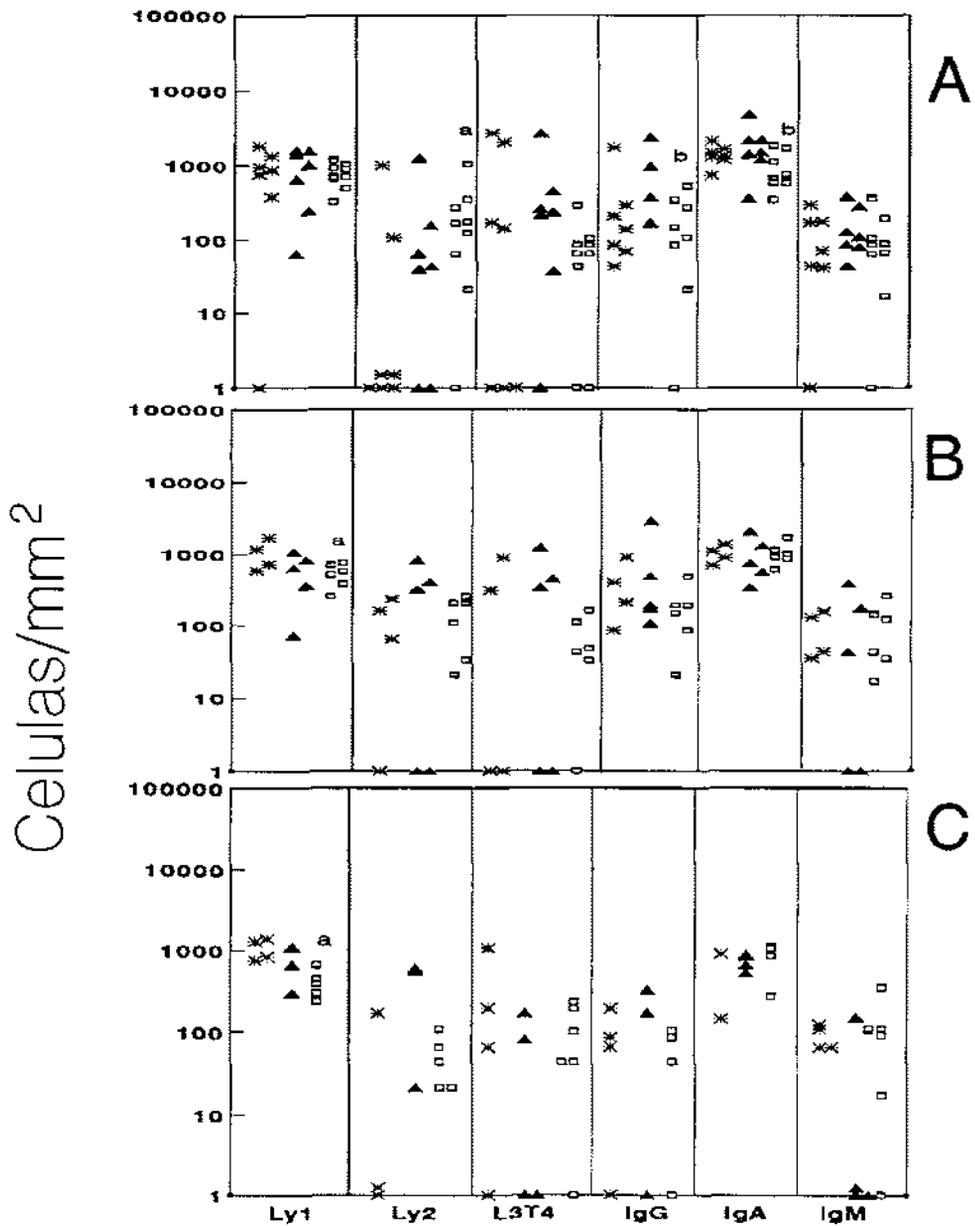


Figura 3. Número de células Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA e IgM por mm² en Lámina Propia de Duodeno (A), Yeyuno (B) e Ileon (C) de Animales Normales (*), Inmunes (▲) y Enfermos (◻).
 * p<0.05 con respecto a animales normales ◻ p<0.05 con respecto a animales inmunes.

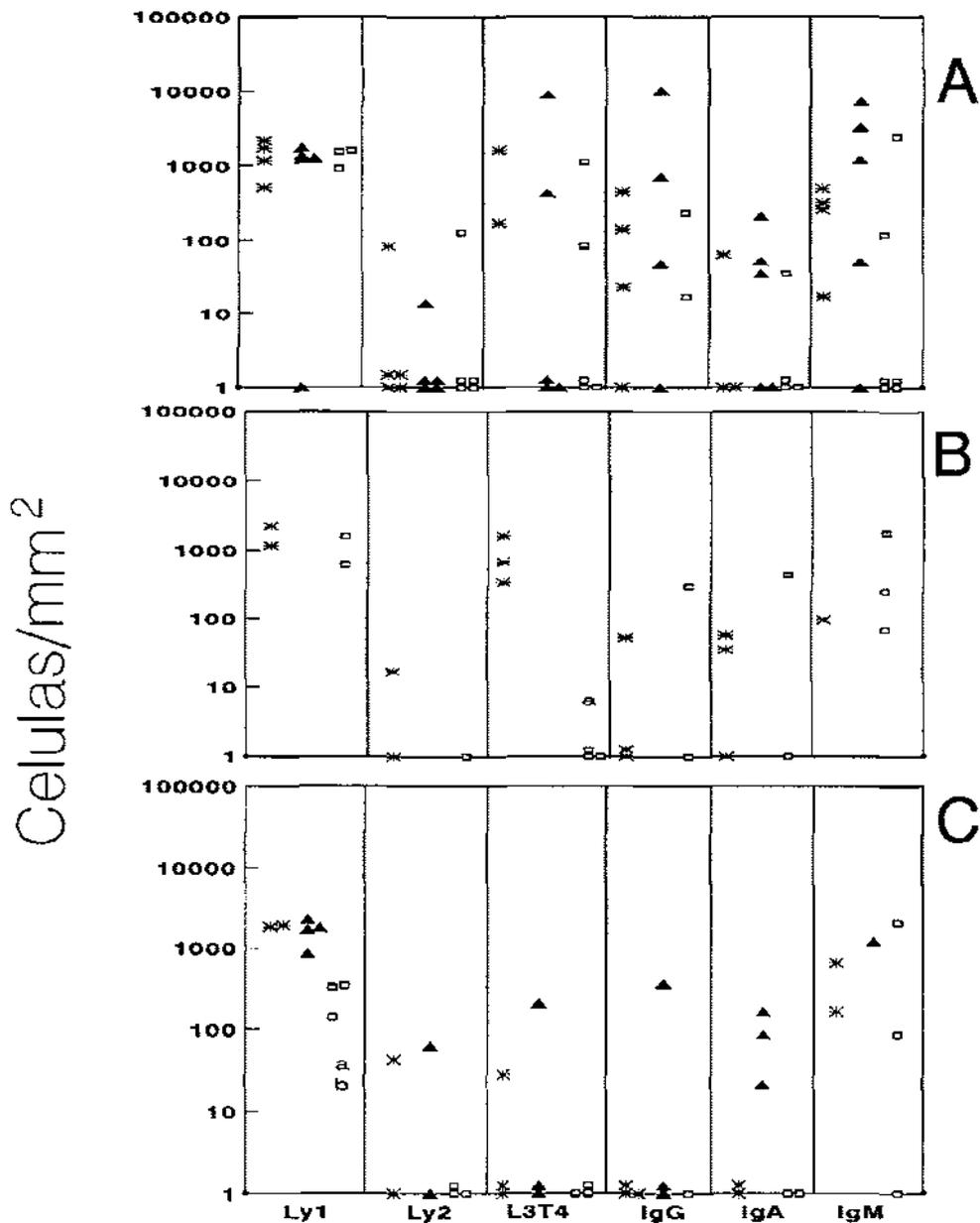


Figura 4. Número de células Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA e IgM por mm² en el Centro Germinal de Placas de Peyer en Duodeno (A), Yeyuno (B) e Ileón (C) de Animales Normales (*), Inmunes (▲) y Enfermos (◻). * p<0.05 con respecto a animales normales. ◻ p<0.05 con respecto a animales inmunes.

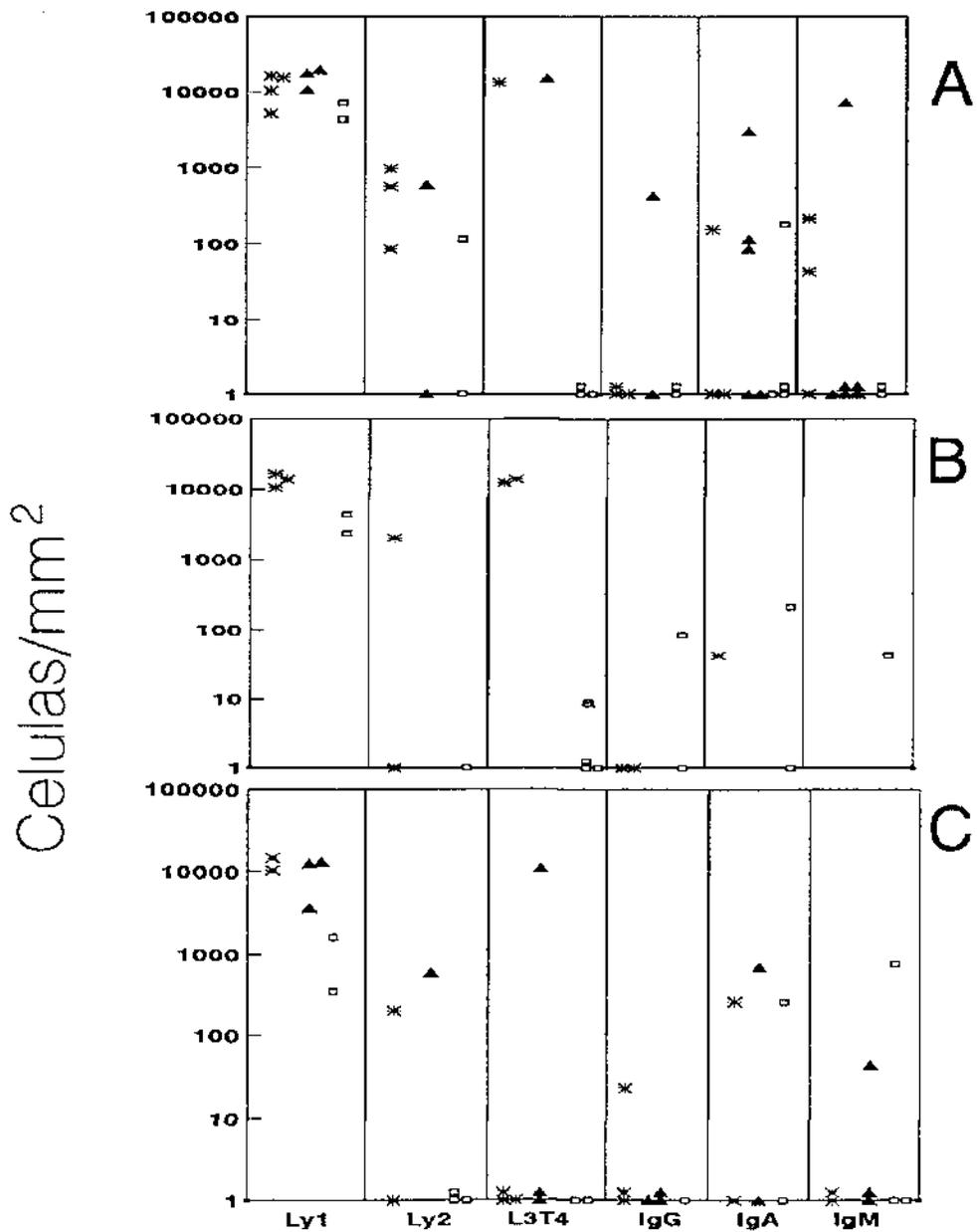


Figura 5 Número de células Ly1, Ly2, L3T4, IgG, IgA e IgM por mm² en el Espacio Interfollicular de Placas de Peyer en Duodeno (A), Yeyuno (B) e Ileon (C) de Animales Normales (*), Inmunes (▲) y Enfermos (◻) [†] p<0.05 con respecto a animales normales.

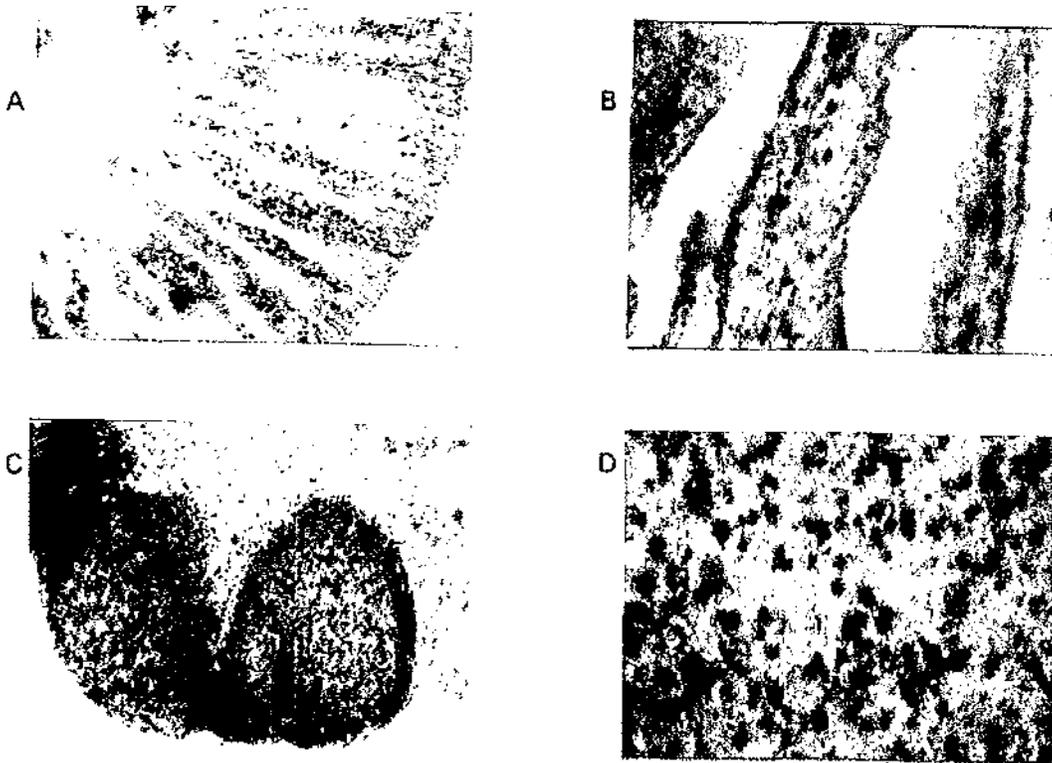


Figura 6. Microfotografía con microscopio de luz de la tinción inmunohistoquímica del duodeno de un ratón normal utilizando el anticuerpo monoclonal contra Ly1. A y B muestran las células marcadas en las vellosidades a 40 y 200 aumentos respectivamente y C y D muestran las células marcadas en las placas de Peyer a 40 y 200 aumentos respectivamente. Todas las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina.

BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. y J.S. POBER.** Inmunología celular y molecular. 2ª edición. Interamericana-McGraw Hill, 1995, pags 103 y 173.
- ALEXANDERSEN, M., HEIN, W.R., LANDSVERK, T. y S. McCLURE.** 1990. Distribution of lymphocyte subsets in the large intestine lymphoid follicles of lambs. *Immunology* 70: 391-397.
- ALTMAYER, R.M., McNERN, J.K., BOSSIO, J.C., ROSSENSHINE, I. y B.B. FINLAY.** 1993. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol Microbiol* 7: 89-98.
- AMERONGEN, H.M., WELTZIN, R., MACK, J.A., WINNER, L.S., MICHETTI, P., APTER, F.M., KRAEHENBUHL, J.P. Y M.R. NEUTRA.** 1992. M cell mediated antigen transport and monoclonal IgA antibodies for mucosal immune protection. *Ann N Y Acad Sci* 664: 18-26.
- ANGERMAN, C.R. y T.K. EISENSTEIN.** 1978. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, acetone-killed cells, lipopolysaccharide and a live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 19:576-582.
- BANDEIRA, A., MOTA-SANTOS, T., ITOHARA, S., DEGERMANN, S., HEUSSER, C., TONEGAWA, S. y A. COUTINHO.** 1990. Localization of g δ T cell to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 172: 239-244.
- BAUMLER, A.J., KUSTER, J.G., STOLILJKOVIC, I. y F. HEFFRON.** 1994. *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect Immun* 62: 1623-1630.
- BENDELAC, A., LANTZ, O., QUIMBLY, M.E., YEWDELL, J.W., BENNIN, J.R. y R.R. BRUTKIEWICZ.** 1995. CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. *Science* 268: 863-865
- BENSON, E.B. y W. STROBER.** 1988. Regulation of IgA secretion by T cell clones derived from the human gastrointestinal tract. *J Immunol* 140:1874-1882.
- BLEICHER, P.A., BALK, S.P., HAGEN, S.J., BLUMBERG, R.S., FLOTTE, T.J. y C. TERHORST.** 1990. Expression of murin CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250: 679-682.
- BLISKA, J.B., GALAN, J.E. y S. FALKOW.** 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73: 903-920.
- BLUMBERG, R.S., TERHORST, C., BLEICHER, P.A., McDERMOTT, F.V., ALLAN, C.H., LANDAU, S.B., TRIER, J.S. y S.P. BALK.** 1991. Expression of A nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 157: 2518-2524.
- Boletín Mensual de Epidemiología de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. Vol 8 N°5 mayo 1993, pag75. Informe anual de casos nuevos de enfermedades 1991-1992
- BONNEVILLE, M., JANEWAY, C.A., ITO, K., HASER, W., ISHIDA, I., NAKANISHI, N. y S.**

- TONEGAWA.** 1988. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 336: 479-481
- BUCY, R.P., CHEN, CH.H., CIHAK, J., LÖSCH, U. y M.D. COOPER.** 1988. Avian T cells expressing $\gamma\delta$ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* 141: 2200-2205.
- BUCY, R.P., CHEN, CH.H. y M.D. COOPER.** 1989. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T $\gamma\delta$ cells in humans. *J Immunol* 142: 3045-3049.
- BURROWS, D.P. y M.D. COOPER.** 1997. IgA deficiency. *Advances in immunology* 65: 245-276.
- BUTCHER, E.C., SCOLLAY, R.G. y I.L. WEISSMAN.** 1980. Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* 10: 556-561.
- BUTCHER, E.C., ROUSE, R.U., COFFMAN, R.L., NOTTENBURG, C.N., HARDY, R.R. y I.L. WEISSMAN.** 1982. Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implication for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J Immunol* 129:2698-2707.
- CAMERINI, V., PANWALA, CH. y M. KRONENBERG.** 1993. Regional specialization of the mucosal immune system. Intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. *J Immunol* 151: 1765-1776.
- CARTER, P.B. y F.M. COLLINS.** 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* 139:1189-1203.
- CRABBE, P.A., NASH, D.R., BAZIN, H., EYSSEN, H. y J.F. HEREMANS.** 1970. Immunohistochemical observation on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. *Lab Invest* 22:448-457.
- DIALYNAS, D.P., WILDE, D.B., MARRACK, P., PIERRES, A., WALL, K.A., HAVRAN, W., OTTEN, G., LOKEN, M.R., PIERRES, M., KAPPLER, J. y F.W. FITCH.** 1983. Characterization of the murine antigenic determinant designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of the L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol Rev* 74:30-56.
- EDELMAN, R. y M.M. LEVIN.** 1986. Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev Infect Dis* 8:329-351.
- ENDERS, G.A., DELIUS, M., BALLHAUS, S. y W. BRENDEL.** 1987. Role of Peyer's patch in the intestinal immune response to cholera toxin in enterically immunized rats. *Infect Immun* 55:1997-1999.
- ENDERS, G.A., BALLHAUS, S. y W. BRENDEL.** 1988. The influence of Peyer's patches on the organ-specific distribution of IgA plasma cells. *Immunology* 63: 411-414.
- ERNST, P.B., BEFUS, A.D. y J. BIENENSTOCK.** 1985. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment. *Immunology today* 6: 50-55.
- ERMAK, T.H. y R.L. OWEN.** 1986. Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. *Anat Rec* 215:144-152.

- FERGUSON, A.** 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18:921-937.
- FIELDS, P.I., GROISMAN, E.A. y F. HEFFRON.** 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243: 1059-1062.
- FIERER, J., ECKMANN, L., FANG, R., PFEIFFER, C. y B.B. FINLAY.** 1993. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. *Infect Immun* 61: 5231-5236.
- FINEGOLD, S.M. y W.J. MARTIN.** Diagnóstico Microbiológico, BAILEY-SCOTT. 6a Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 1983, pages 236-237.
- FINLAY, B.B. y S. FALKOW.** 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 53:210-230.
- FOSTER, J.W. y M.P. SPECTOR.** 1995. How *Salmonella* survive against the odds. *Ann Rev Microbiol* 49: 145-174.
- FUJIHASHI, K., MCGHEE, J.R., KWEON, M-N., COOPER, M.D., TONEGAWA, S., TAKAHASHI, I., HIROI, T., MESTECKY, J. y H. KIYONO.** 1996. $\gamma\delta$ T cells-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J Exp Med* 183: 1929-1935.
- FUKUSHIMA, K., MASUDA, T., OHTANI, H., SASAKI, I., FUNAYAMA, Y., MATSUNO, S. y H. NAGURA.** 1991. Immunohistochemical characterization, distribution and ultrastructure of lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor in the human gut. *Virchows Archiv B Cell Pthol* 60: 7-13.
- GALAN, J.E. y R. CURTISS III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6383-6387.
- GALAN, J.E. y R. CURTISS III.** 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun* 58: 1879-1885.
- GALAN, J.E.** 1996. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 209: 43-60.
- GINOCCHIO, CH.C., OLMSTED, S.B., LEWIS, C.L. y J.E. GALAN.** 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 76: 717-724.
- GOODMAN, T. y L. LEFRANÇOIS.** 1988. Expression of the $\gamma\delta$ T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333: 855-858.
- GORRELL, M.D., WILLIS, G., BRANDON, M.R. y A.K. LASCELLES.** 1988. Lymphocyte phenotypes in the intestinal mucosa of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Clin Exp Immunol* 72: 274-279.
- GRADWOHL'S.** Clinical laboratory methods and diagnosis. A textbook on laboratory procedures and their interpretation. Ed: Sam Frenkel, Stanley Reitman, Alex C. Sonnenwirth 7th edition. The C.V. Mosby Company, 1970, páginas: 1329-1342.

- GRIEBEL, P.J., KENNEDY, L., GRAHAM, T., DAVIS, W.C. y J.D. REYNOLDS. 1992. Characterization of B-cell phenotypic changes during ileal and jejunal Peyer's patch development in sheep. *Immunology* 77: 564-570.
- GROISMAN, E.A. 1994. How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol* 2: 444-449.
- GULIG, P.A., DANBARA, H., GUINEY, D.G., LAX, A.J. y F. NOREL. 1993. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* 7: 825-830.
- GULIG, P.A. y T.J. DOYLE. 1993. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* 61: 504-511.
- GUY-GRAND, D., CERF-BENSUSSAN, N., MALISSEN, B., MALASSIS-SERIS, M., BRIOTTET, C. y P. VASSALLI. 1991. Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 173: 471-481.
- HACKETT, J., ATTRINGE, S. y D. ROWLEY. 1988. Oral immunization with live, avirulent *fla*⁺ strains of *Salmonella* protects mice against subsequent oral challenge with *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis* 157:78-84.
- HARLOW, E. y D. LANE. *Antibodies; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, pags 298-302.
- HASS, W. 1993. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol*. 11: 637-685.
- HEFFERNAN, E.J., REED, S., HACKETT, J., FIERER, J. y C. ROUDIER. 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gen rck. *J Clin Invest* 90: 953-954.
- HOISETH, S.K. y B.A. STOCKER. 1981. Aromatic dependant *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239.
- HOLZMANN B. y I.L. WEISSMAN. 1989. Integrin molecules involved in lymphocyte homing to Peyer's patches. *Immunol Rev* 108: 45-61.
- HUDSON, L. y F.C. HAY. *Practical immunology*, 3^{er} edition. Blackwell Scientific Publications, 1989, pag 325.
- INFANTE, S. *Métodos estadísticos; un enfoque interdisciplinario*. Ed.Trillas; 1984.
- ISHIBASHI, Y. y T. ARAI.1990. Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64: 35-44.
- JEURISSEN, S., CLAASSEN, E., VAN ROIJEN, N. y G. KRAAL. 1985. Intra-intestinal priming leads to antigen-specific IgA memory cells in peripheral lymphoid organs. *Immunology* 50: 417-423.
- JONES, B.D. y S. FALKOW. 1994. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun* 62: 3745-3752.

JONES, B.D., GHORI, N. y S. FALKOW. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of Peyer's patches. *J Exp Med* 180: 15-23.

JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C. y N. PALMER. Pathology of domestic animals. Vol 2, 3ª edition, Academic Press Inc., 1985.

KAETZEL, C.S., ROBINSON, J.K., CHINTALACHARUVU, K.R., VAERMAN, J.P. y M.E. LAMM. 1991. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci* 88: 8796-8800.

KAWANISHI, H. y W. STROBER. 1983. T cell regulation of IgA immunoglobulin production in gut-associated lymphoid tissues. *Molecular Immunology* 20: 917-930.

KIYONO, H., COOPER, M.D., KEARNEY, J.F., MOSTELLER, L.M., MICHALEK, S.M., KOOPMAN, W.J. y J.R.McGHEE. 1984. Isotype specificity of helper T cell clones: Peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA B cells for IgA responses. *J Exp Med* 159: 798-811.

KOSCO, M.H., SZAKALA, A.H. y J.G. TEW. 1988. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J Immunol* 140: 354-360.

KRAAL, G., WEISSMAN, I.L. y E.C. BUTCHER. 1982. Germinal center B cells: antigen specificity and changes in heavy chain class expression. *Nature* 298: 377-379.

KRAEHNBUHL, J.P. y M.R. NEUTRA. 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 72:853-879.

LAMM, M.E. 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51: 311-340.

LEE, C.A. y S. FALKOW. 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4304-4308.

LEFRANCOIS, L. y T. GOODMAN. 1989. In vitro modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression in TCR- $\gamma\delta^+$ intraepithelial lymphocytes. *Science* 243: 11716-1718.

LIBBY, S.J., GOEBEL, W., LUDWIG, A., BUCHMEIER, N. y F. BOWE. 1994. A cytotoxin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 489-493.

LIU, Y.-J., JOHNSON, G.D., GORDON, J. y I.C.M. McLENNAN. 1992. Germinal centers in T-cell-dependent antibody responses. *Immunology Today* 13: 17-21.

LYSCOM, N. y M.J. BRUETON. 1982. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 45: 775-783.

MALOY, K.J., MOWAT, A.M., ZAMOYSKA, R. y I.N. CRISPE. 1991. Phenotypic heterogeneity of intraepithelial T lymphocytes from mouse small intestine. *Immunology* 72: 555-562.

MARCH, S.C., PARIKH, I. y P. CUATRECASA. 1974. A simplified method for cyanogen-bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem* 60. 149-152.

MAZANEC, M.B., KAETZEL, C.S., LAMM, M.E., FLETCHER, D. y J.G. NEDRUD. 1992. Intracellular neutralization of virus immunoglobulin antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 89: 6901-6905.

MAZANEC, M.B., NEDRUD, J.G., KAETZEL, C.S. y M.E. LAMM. 1993. A three-tiered view of the role of the IgA in mucosal defense. *Immunology Today* 14: 430-435.

MCCARTY, M. Determinación de los puntos finales del 50% (DL₅₀ o DI₅₀) por el método de Reed y Muench. En *Tratado de Microbiología*; Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, W.B. & M. McCarty; Salvat editores, S.A., 2ª edición, España; 1978.

MCGHEE, J.R. y H. KIYONO. 1992. Mucosal immunity to vaccines. Current concepts for vaccine development and immune response analysis. *Adv Exp Med Biol* 327: 1-12.

MESTECKY, J., RUSSELL, M.W., JACKSON, S. y T.A. BROWN. 1986. The IgA system: a reassessment. *Clin Immunol Immunopath* 40: 105-114.

MICHETTI, P., MAHAN, M.J., SLAUCH, J.M., MEKALANOS, J.J. y M.R. NEUTRA. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 60: 1786-1792.

MIXTER, P.F., CAMERINI, V., STONE, B.J., MILLER, V.L. y M. KRONENBERG. 1994. Mouse T lymphocytes that express a $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor contribute to resistance to *Salmonella* infection in vivo. *Infect Immun* 62: 4618-4621.

MOSLEY, R.L., WANG, J., HAMAD, M. y J.R. KLEIN. 1994. Functional heterogeneity of murine intestinal intraepithelial lymphocytes: studies using TcR $\alpha\beta^+$ IEL lines and fresh IEL isolates reveal multiple cytotoxic subsets differentiated by CD5, CD8 $\alpha\alpha$, and CD8 $\alpha\beta$ expression. *Devel Comp Immunol* 18:155-164.

NNALUE, N.A. y A.A. LINDBERG. 1990. *Salmonella choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parental inoculation but are avirulent by oral administration. *Infect Immun* 58: 2493-2501.

O'CALLAGHAN, D., MASKELL, D., LIEW, F.Y., EASMON, C.S.F. y G. DOUGAN. 1988. Characterization of aromatic and purine dependant *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence and ability to induce protective immunity in Balb/c mice. *Infect Immun* 56: 419-423.

O'CALLAGHAN, D., MASKELL, D., TITE, J. y G. DOUGAN. 1990. Immune response in Balb/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependant *Salmonella typhimurium* strains. *Immunology* 69: 184-189.

PANJA, A., BLUMBERG, R.S., BALK, S.P. y C. MAYER. 1993. CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med* 178: 1115-1119.

PARROTT, D.M.V., TAIT, C., MCKENZIE, S., MOWAT, A.M., DAVIES, M.D.J. y H.S. MICKLEM. 1983. Analysis of the effector functions of different populations of mucosal lymphocytes. En: *The secretory immune system*. *Ann N Y Acad Sci* 409: 307-320.

PIERCE, N.F. 1980. Suppression of the intestinal immune response to cholera toxin by specific serum antibody. *Infect Immun* 30: 62-67

POPPEMA, S., BHAN, A.K., REINHERZ, E.L., McCLUSKEY, R.T. y S.F. SCHLOSSMAN. 1981. Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. *J Exp Med* 153: 30-41.

PORCELLI, S.A., SEGELKE, B.W., SUGITA, M., WILSON, I.A. y M.B. BRENNER. 1998. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunology today* 19: 362-368.

RHEN, M., RIHKONEN, P. y S. TAIRA. 1993. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* virulence plasmids genes in cultured macrophages. *Mol Microbiol* 10: 45-56.

ROBERTSSON, J.A., LINDBERG, A.A., HOISETH, S. y B.A.D. STOCKER. 1983. *Salmonella typhimurium* infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 41: 742-750.

ROUSE, R.V., LEDBETTER, J.A. y I.L. WEISSMAN. 1982. Mouse lymph node germinal centers contain a selected subset of T cells-the helper phenotype. *J Immunol* 128: 2243-2246.

RUSSELL, M.W. y J. MESTECKY. 1988. Induction of the mucosal immune response. *Rev Infect Dis* 10(supl 2): S440-S446.

SCHIEMANN, D.A. y S.R. SHOPE. 1991. Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect Immun* 59: 437-440.

SIM, G.K. 1995. Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol* 58: 297-341.

SMINIA, T., DELEMARRE, F. y M. JANSEN. 1983. Histological observations on the intestinal immune response toward horseradish peroxidase in rats. *Immunology* 50: 53-56.

SMITH, B.H., HABASHA, F.G., REINA-GERRA, M. y A.J. HARDY. 1980. Immunization of calves against-salmonellosis. *Am J Vet Res* 41: 1947-1951.

SOBHON, P. 1973. The light and the electron microscopic studies of Peyer's patches in non germ-free adult mice. *J Morph* 135: 457-482.

SPRINZ, H., GANGAROSA, E.J., WILLIAMS, M., HORNICK, R.B y T.E. WOODWARD. 1966. Histopathology of the upper small intestine in typhoid fever. *Am J Dig Dis* 11: 615-624.

SRISART, P., REYNOLDS, B.L. y D. ROWLEY. 1985. The correlation between serum IgA antibody levels and resistance to infection with *Salmonella typhimurium* after oral immunization with various *Salmonellae*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 63: 177-182.

STAATS, H.F., JACKSON, R.J., MARINARO, M., TAKAHASHI, I., KIYONO, H. y J.R. MCGHEE. 1994. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Op Immunol* 6: 572-583.

SYDORA, B.C., MIXTER, P.F., HOULDEN, B., HERSHBERG, R., LEVY, R., COMAY, M., BLUESTONE, J. y M. KRONENBERG. 1993. T-cell receptor gamma delta diversity and specificity of intestinal intraepithelial lymphocytes: analysis of IEL- derived hybridomas. *Cell Immunol* 152: 305-322.

TAKEUCHI, M., MIYAZAKI, H., MIROKAWA, K., YOKOKURA, T. y Y. YOSHIKAI. 1993. Age-related changes of T cell subsets in intestinal intra-epithelial lymphocytes of mice. *Eur J Immunol* 23:

1409-1411.

TANGRI, S., HOLCOMBE, H.R., CASTAÑO, A.R., MILLER, J.E., TEITELL, M., HUSE, W.E., PETERSON, P.A. y M. KRONENBERG. 1996. Antigen presenting functions of the mouse CD1 molecule. *Ann NY Acad Sci* 778: 288-296.

TANNOCK, G.W., BLUMERSHINE, R.V. y D.C. SAVAGE. 1975. Association of *Salmonella typhimurium* with, and its invasion of the ileal mucosa in mice. *Infect Immun* 11:365-370.

TARGAN, S.R. 1992. The lamina propria: a dynamic complex mucosal compartment. *Ann N Y Acad Sci* 664: 61-68.

UMESAKI, Y., SETOYAMA, H., MATSUMOTO, S. y S. OKADA. 1993. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intra-epithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 79: 32-37.

VALDESPINO, J.L., GARCÍA, M.de L., del RIO, A. y R.A. SALCEDO. Magnitud y trascendencia de las infecciones gastrointestinales. Medidas de intervención. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaría de Salud, INDRE, 1994, pags 12-20. Editado por: GIONO, S., ESCOBAR, A. y J.L. VALDESPINO

VALONE, S.E., CHIKAMI, G.K. y V.L. MILLER. 1993. Stress induction of virulence proteins (SpvA,-B y -C) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella dublin*. *Infect Immun* 61: 705-713.

VAN DER HEIJDEN, P.J. y W. STOK. 1987. Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine. *J Immunol Methods* 103: 161-167.

VAN DER HEIJDEN, P.J., STOK, W. y A.T.J. BIANCHI. 1987. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total background immunoglobulin production. *Immunology* 62: 551-555.

VAN DER HEIJDEN, P.J., BIANCHI, A.T.J., BOKHOUT, B.A., BOL, M., SCHOLTEN, J.W. y W. STOK. 1989. Quantification of antigen-specific antibody secreting cells in the small intestine and other lymphoid organs of mice after oral booster immunization. *Immunology* 66: 404-409.

VINEY, J.L., MACDONALD, T.T., y P.J. KILSHAW. 1989. T-cell receptor expression in intestinal intra-epithelial lymphocyte subpopulations of normal and athymic mice. *Immunology* 66: 583-587.

WALKER, W.A. y K.J. ISSELBACHER. 1977. Intestinal antibodies. *N Eng J Med* 297: 767-773.

WARNKE, R. y R. LEVY 1980. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 28(8): 771-776

WEINTRAUB, B.C., ECKMANN, L., AKAMOTO, S., HENSE, M., HEDRICK, S.M. y J. FIERER. 1997. Role of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the host response to *Salmonella* infection as demonstrated in T-cell receptor deficient mice of defined *Jty* genotype. *Infect Immun* 65: 2306-2312.

WEISZ-CARRINGTON, P., ROUX, R.E., McWILLIAMS, M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M. y M.E. LAMM. 1979. Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral immunization: evidence for a general secretory immune system. *J Immunol* 123: 1705-1708.

WEISZ-CARRINGTON, P., EMANCIPATOR, S. y P.R. KELEMEN. 1991. Specific attachment of mesenteric IgA lymphoblasts to specialized endothelium of intestinal mucosa lamina propria capillaries. *Cell Immunol* 132: 494-504.

WILSON, A.D., STOKES, C.R. y F.J. BOURNE. 1986. Morphology and functional characteristics of isolated porcine intraepithelial lymphocytes. *Immunology* 59: 109-113.

WINNER, L.S., WELTZIN, R.A., MEKALANOS, J.J., KRAEHENBUHL, J.L. y M.R. NEUTRA. 1991. New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect Immun* 59: 977-982.