



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

Efecto de la Infección por *Salmonella Typhimurium* sobre la maduración de los linfocitos T

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:
Jessica Patricia Leyva Rangel

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete, Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. Esther López-Bayghen Patiño, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Dr. Félix Recillas Targa, Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D. F. MAYO 2015



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.

Resumen.

Los linfocitos T son células protagonistas durante la activación de la respuesta inmune adquirida. Su maduración y diferenciación a partir de células precursoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea depende de la integridad del timo, dentro del cual se llevan a cabo los procesos de selección negativa y positiva para el control de la respuesta autoinmunes. Recientemente se ha identificado al timo como un órgano susceptible a diversas infecciones teniendo como consecuencia alteraciones en el desarrollo y en la salida de los timocitos. *Salmonella Typhimurium* es una bacteria capaz de infectar el intestino delgado para de allí diseminarse de manera sistémica en el hígado, bazo y médula ósea. Se ha reportado la presencia de *Salmonella* en el timo y los resultados indican que el efecto de la infección sobre el timo depende de la patogenicidad de la bacteria. En este estudio se evaluó la infección por *Salmonella* sobre el desarrollo de los linfocitos T en el timo mediante la infección con diferentes dosis así como con diferentes cepas de la bacteria. Los resultados mostraron que la infección con la cepa virulenta de *Salmonella* es capaz de alterar la arquitectura del timo y promover la selección positiva de células T CD4 y CD8 que expresan cadenas beta particulares en su TCR. El tratamiento a largo plazo con antibiótico es capaz de restablecer la estructura tímica así como el sesgo en la selección positiva sin llegar a eliminar a la bacteria. En conclusión, la modificación en la arquitectura del timo y en la selección de los linfocitos T por efecto de la infección por *Salmonella* es reversible con el tratamiento con antibiótico sin embargo no es suficiente para la eliminación de la bacteria en el órgano.

Abstract.

T cell lymphocytes are the main characters on the activation of the acquired immune response. The development and maturation of the T cells derived from hematopoietic precursor cells depend on the integrity of the thymus where the negative and positive processes take place in order to control the onset of an autoimmune response. Recently, the thymus has been identified as a susceptible organ for diverse infections having as a consequence alterations in the development and egress of the thymocytes. On the other hand, *Salmonella Typhimurium* is a gram negative bacterium capable of infecting the small intestine and disseminating towards the liver, spleen and bone marrow. In addition, *Salmonella* has been identified in thymus and reports indicate that the effect of salmonella over the thymus depends on the pathogenesis of the bacteria. In this study, we evaluated the effect of *Salmonella Typhimurium* infection over the T cell development in the thymus with different doses of infection and different strains of the bacteria. The results showed that *Salmonella* alters the thymus architecture and promotes the positive selection of TCD4 and CD8 cells that express particular TCR beta chains. Long term treatment with antibiotics restores the thymic structure as well as the skewed TCR repertoire induced by infection without eliminating the bacteria. In conclusion, the modifications in the thymus structure caused by *Salmonella* infection are reversible with antibiotics treatment however the bacterium persists in the organ.

Índice

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Desarrollo de los linfocitos T.
- 1.2 Proceso de rearreglo de la cadena β del TCR.
- 1.3 Proceso de selección positiva y negativa.
- 1.4 Alteraciones en timo causadaspor diversas infecciones.
- 1.5 *SalmonellaTyphimurium* y su efecto sobre el timo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. HIPOTESIS

4. OBJETIVOS

- 4.1 Objetivos particulares
- 4.2 Objetivos generales

5. MATERIALES Y MÉTODOS

6. RESULTADOS

7. DISCUSIÓN

8. CONCLUSIONES

9. REFERENCIAS

10. ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN.

DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.

Los linfocitos T son células que forman parte del sistema inmune y son esenciales en el establecimiento de la respuesta adquirida (1,2). Estas células maduran y se diferencian en el timo a partir de células precursoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea. El timo es un órgano bi-lobulado que se localiza debajo del esternón y delante del corazón, su arquitectura se compone de las regiones corticales y medulares las cuales están conformadas por células epiteliales tímicas (TECs/thymic epithelial cells) (3,4). La integridad de la anatomía del timo permite que el proceso de desarrollo de los linfocitos T se lleve a cabo de manera ordenada y secuencial.

El desarrollo de los linfocitos T inicia con la movilización, a través de la sangre, de los progenitores tímicos (TPs/thymic progenitors) desde la médula ósea hacia la región cortico-medular del timo (5). La entrada de los TPs al timo, cuyo fenotipo es $\text{Kit}^+\text{IL7R}\alpha^+\text{L-selectina}^+\text{RAG}^+$, es un mecanismo análogo a la entrada de los linfocitos T maduros a los ganglios linfáticos, en cuanto a que se requiere de las moléculas selectinas, receptores de quimiocinas e integrinas para facilitar la unión a la pared endotelial y la extravasación hacia el órgano blanco (6). La glicoproteína PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), por ejemplo, es expresado en los progenitores de células T mientras que su ligando P-selectina se expresa en el endotelio tímico (7). Así mismo, se ha demostrado que los receptores de

quimiocinas CCR7 y CCR9 (receptores para quimiocinas beta) son indispensables para el arribo y permanencia de los progenitores al timo y, si bien la ausencia de uno de ellos puede ser compensada por el otro, la eliminación de ambos receptores disminuye el número de células progenitoras tímicas tempranas (ETPs/EmigrantThymic Progenitors) en la médula ósea así como su llegada al timo (8). Los estadios de maduración de los timocitos se identifican mediante la expresión de los co-receptores CD4 y CD8. Así, los timocitos doble negativos o DN(CD4-CD8-) corresponden a la población que presentan un menor compromiso hacia el linaje de linfocitos T y por lo tanto son capaces de generar otros tipos celulares como son las células dendríticas, células asesinas naturales (NK/Natural Killer) o linfocitos B. Esta capacidad se va perdiendo conforme van madurando los timocitos, de tal manera que en el estadio DN se pueden identificar con base a la expresión CD44 y CD25, cuatro subpoblaciones definidas como dn1 a dn4 (9,10). Una vez los TPs arriban al timo se transforman en células ETPs cuyo fenotipo es Lin⁻Kit⁺CD25⁻ o células dn1. Las células ETPs se expanden por el proceso de proliferación celular dando lugar a las células CD4⁻CD8⁻Kit⁺CD25⁺ ó dn2. La citocina TSLP (thymic stromal lymphopoietin) es un factor de crecimiento que promueve la proliferación y supervivencia de los timocitos en estadio dn1-dn2 así como también de los progenitores de linfocitos B (11). En dn2 la tasa de proliferación se mantiene elevada para dar origen a las células CD4⁻CD8⁻Kit^{lo}CD25⁺ ó dn3. En el estadio dn2 y dn3 (dn3a) se puede inducir la diferenciación hacia el linaje de linfocitos T gamma/delta (Tγδ) o bien, mediante la señalización de receptores como el receptor de interleucina 7 (IL7R), Notch, CXCR4 (receptor para quimiocinas alfa) y el pre-TCR se promueve la supervivencia, proliferación y

el avance al proceso de selección de la cadena beta (β) del receptor de células T (TCR/TCell Receptor), comprometiendo así a los progenitores al linaje de linfocitos T $\alpha\beta$ (dn3b)(12-15). La activación del receptor Notch, mediante la interacción con las proteínas de la familia Delta-like (DL) inhibe el compromiso hacia el linaje de células B y promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación hacia timocitos DP (doble positivos) (16). El estadio dn4 es transitorio para el paso a DP, el cual acontece en la región cortical. Una vez concluido el proceso de selección de la cadena β , los timocitos nuevamente se propagan por efecto de la proliferación celular e inducen la expresión de los co-receptores CD4 y CD8. A partir de este punto la proliferación, supervivencia y diferenciación de los timocitos DP hacia los linajes CD4 y CD8 dependen de los procesos de selección positiva y negativa, el cual se establece mediante la interacción del complejo principal de histocompatibilidad (MHC/Mayor Histocompatibility Complex) con el receptor de células T a través del contacto célula-célula(17). Una vez seleccionada, la célula CD4 o CD8 SP se localiza en la región medular del timo para culminar con su maduración y egresar a través de los vasos eferentes hacia los órganos linfoides periféricos. En la figura 1 se muestra de manera esquemática el proceso de desarrollo de los linfocitos T en el timo.

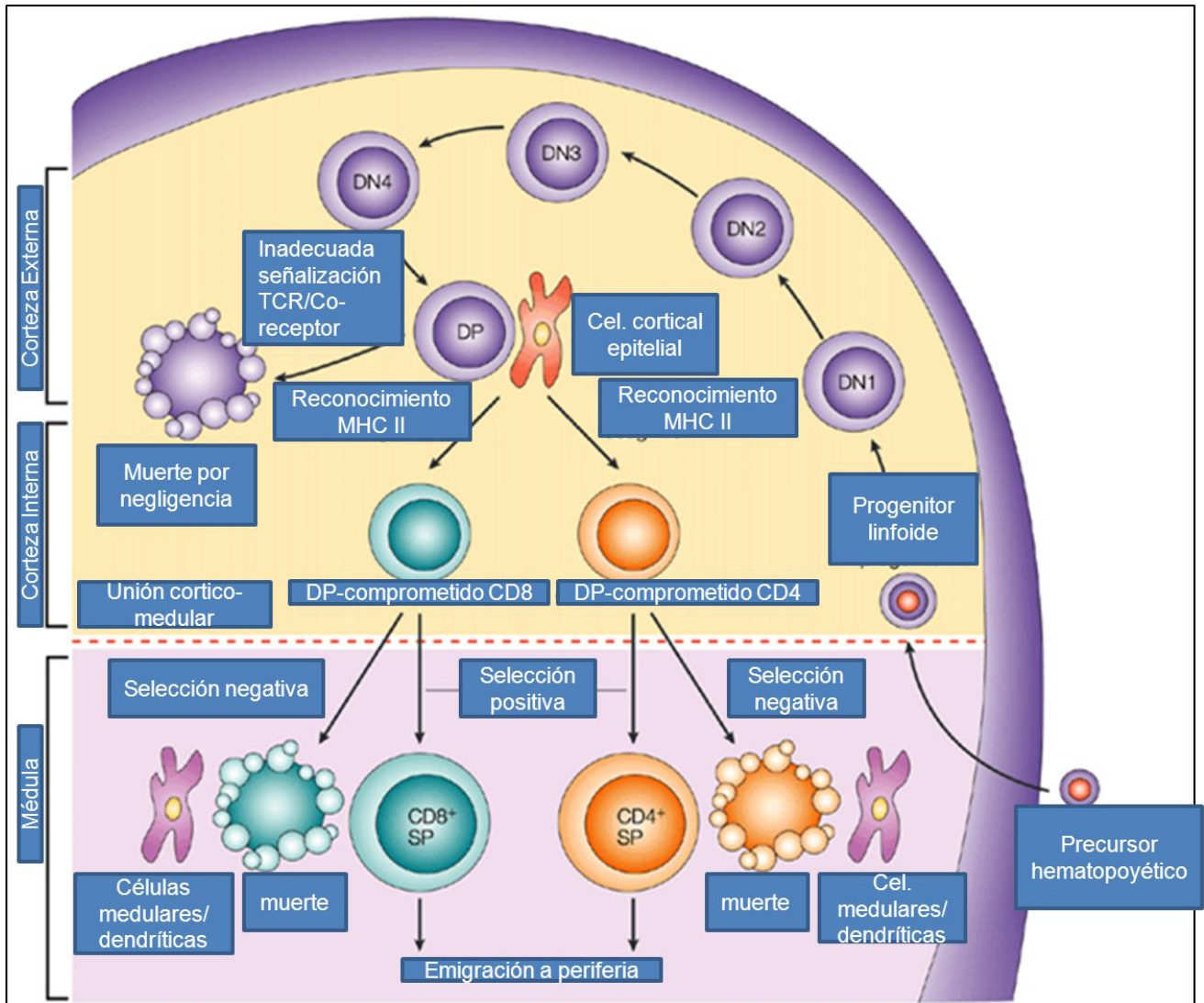


Figura 1. Esquema donde se muestra el proceso de desarrollo de los linfocitos T en el timo. Progenitores linfocitos comprometidos en la médula ósea migran hacia el timo. Células T tempranas carecen de la expresión del receptor de células T (TCR), CD4 y CD8 y se denominan timocitos doble negativos (DN/ sin CD4 y CD8). Los timocitos DN se pueden subdividir en 4 etapas de diferenciación (dn1 CD44+CD25-, dn2 CD44+CD25+, dn3 CD44-CD25+ y dn4 CD44-CD25-). Conforme el progreso de dn2 a dn4 expresan el pre-TCR, el cual está compuesto de la cadena surrogada pre-T α con la nueva cadena rearrreglada β . Los timocitos $\alpha\beta$ TCR+CD4+CD8+ (DP) interactúan con las células epiteliales corticales que expresan una alta densidad de MHC clase I y II asociadas con péptidos antigénicos. El destino de los timocitos DP depende de la señal mediada por la interacción del TCR con este complejo péptido-MHC. La baja señal resulta en apoptosis denominada, muerte por negligencia. Una elevada señalización también promueve apoptosis llamada selección negativa. Sin embargo, una señalización intermedia del TCR conlleva a una maduración efectiva

(selección positiva). Los timocitos que se unen al complejo péptido-MHCI se diferencian a células T CD8+, mientras que la unión con el complejo péptido-MHCII los convierte en células T CD4. Estas células se encuentran listas para ser exportadas de la región medular hacia los órganos linfoides periféricos. Modificada de Nature Reviews Immunology 2, 309-322

PROCESO DE REARREGLO DE LA CADENA β DEL TCR.

El TCR es un receptor tipo inmunoglobulina (Ig), es decir, contiene un dominio variable y un dominio constante, mediante el cual los linfocitos T reconocen de manera específica un antígeno procesado (péptido) y presentado por el MHC, expresado en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC's/Antigen Presenting Cells) (18). El TCR está compuesto de dos cadenas, alfa y beta para el caso de los linfocitos $T\alpha\beta$ o bien gama y delta para los linfocitos $T\gamma\delta$. La población de linfocitos T de sangre periférica y de ganglios linfáticos está principalmente representada por las células $T\alpha\beta$. Las cadenas $\alpha\beta$ se generan a partir del proceso de recombinación somática de los genes variable y unión (VJ/Variable and Joining) y VDJ (Diverso/Diverse), respectivamente. Los genes de la cadena β son los primeros en rearreglarse durante el estadio dn3 (19,20). En la figura 2 se muestra las cadenas $V\alpha$ y $V\beta$ que conforman el TCR.

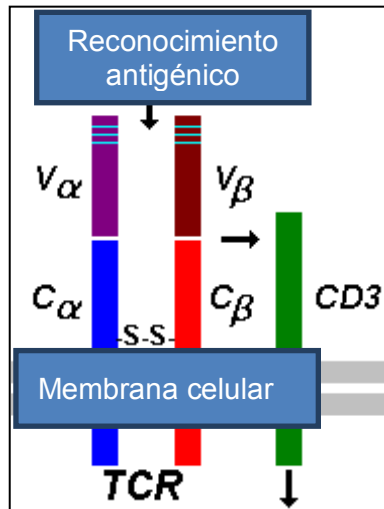


Figura 2. Representación de las cadenas alfa (α) y beta (β) que conforman el receptor de células T (TCR), unidas mediante enlaces disulfuro. El reconocimiento del TCR al antígeno se lleva a través de las regiones variables (V).

El proceso de recombinación se inicia en los genes de D_β a J_β , posteriormente el segmento del gen V_β se une al rearreglo $D_\beta J_\beta$. Los sitios de recombinación de los genes se encuentran flanqueadas por secuencias de señales de recombinación (RSS/Recombination Signal Sequences), los cuales son reconocidos por enzimas tipo recombinasas, específicas de linfocitos, denominadas RAG1 (Recombination Activating Genes) y RAG2. Los genes que contienen las secuencias RSS son escindidos de una sola cadena del DNA por las enzimas RAG lo cual conlleva a la formación de un bucle por efecto del ataque nucleofílico. Este bucle es liberado por el complejo de enzimas denominadas DNA-PK y la inserción de nucleótidos al azar finalmente lleva a la unión nuevamente del DNA (21-24). Dada la variabilidad de la posición de los cortes para escindir el bucle así como la secuencia de los nucleótidos insertados, la secuencia de DNA resultante es diversa en cada proceso de recombinación. Esto contribuye a que en cada proceso de rearreglo de

los genes VDJ se amplifique el repertorio de TCR's capaces de reconocer secuencias específicas de los diversos antígenos presentados.

Una vez rearrreglada la cadena β , se une temporalmente mediante enlaces disulfuro a una cadena subrogada ($pT\alpha$), en asociación con el complejo CD3 ($CD3\epsilon$, γ , δ y δ) se inicia la señalización para promover la exclusión alélica del locus de la cadena β , así como la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de los timocitos hacia el linaje de linfocitos $T\alpha\beta$ (25). La formación del complejo de la cadena β con el $pT\alpha$ y las cadenas CD3 se le denomina receptor pre-TCR, y es el primer punto de control importante para la transición al estadio DP. Aquellos timocitos que no son capaces de producir un pre-TCR funcional expresan proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 como Bim y Bid(26,27). La figura 3 ejemplifica el de rearrreglo de los genes que codifican para la cadena β del TCR.

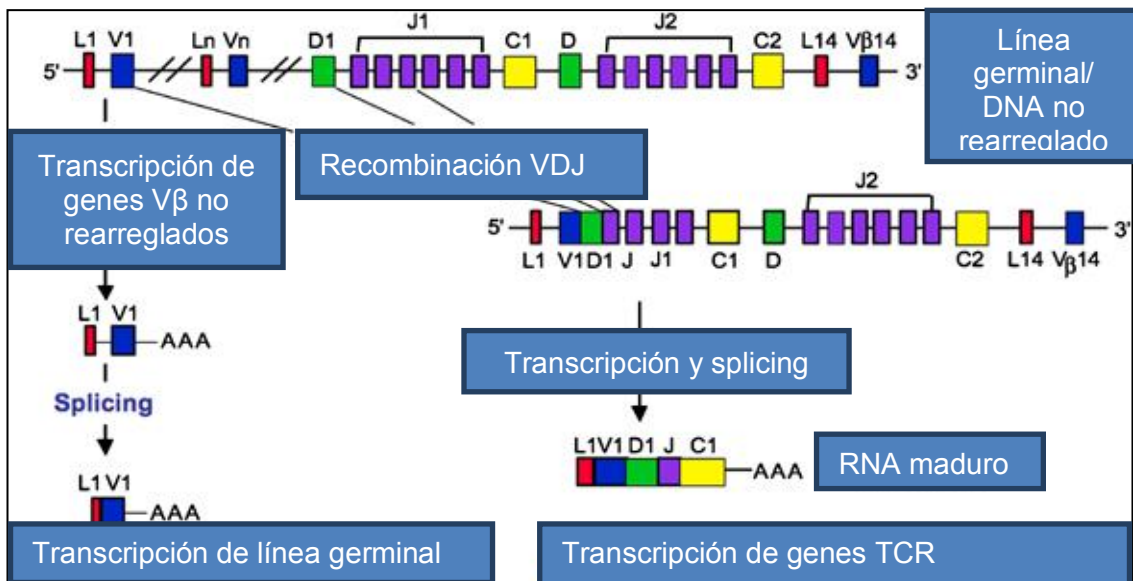


Figura 3. Representación esquemática del proceso de recombinación somática que se lleva a cabo para los genes V (variable), D (diversidad) y J (unión) durante la selección de la cadena β del TCR. Modificado de Immunology and Cell Biology (2008) **86**, 166–174.

Los timocitos DP al inicio son $\text{TCR}\beta^{\text{low}}$ debido a que aún no llevan a cabo el proceso de rearreglo de la cadena α . El rearreglo de la cadena α inicia con la activación del promotor TEA, localizado en la región 5' del gen $J\alpha$. Si la recombinación de los genes $V\alpha J\alpha$ se lleva a cabo de manera exitosa, la cadena $pT\alpha$ es reemplazada y se incrementan los niveles en superficie de la cadena β es decir, DP $\text{TCR}\beta^{\text{high}}$. Estos timocitos mantienen continuamente en rearreglo los genes $V\alpha$ a $J\alpha$, hasta que la expresión de las recombinasas RAG es inhibida por efecto de la señalización que conlleva la selección positiva (28).

PROCESO DE SELECCIÓN POSITIVA Y NEGATIVA

La calidad del $\text{TCR}\alpha\beta$ generado en los timocitos DP se determina a través de la intensidad de señal que éste induce al interactuar con el complejo MHC-péptido presente en las APCs (18,29). A partir del estadio DP, el estroma tímico y las células dendríticas determinan el destino de los timocitos mediante los procesos denominados selección negativa y positiva (30). La expresión en superficie del TCR y de los co-receptores CD4 y CD8 en los timocitos DP permite este contacto célula-célula. El reconocimiento específico de los aminoácidos que conforman la secuencia peptídica así como la clase de MHC que lo presenta, MHCII o MHCI, son factores determinantes para permitir el paso al siguiente estadio de maduración y al establecimiento del fenotipo CD4 o CD8, respectivamente.

El péptido es reconocido por el TCR a través de los dominios hipervariables del TCR (CDR). Existen tres dominios CDRs, los dominios CDR1 y CDR2 se localizan

en el amino terminal (N-terminal) de la región variable (V) de las cadenas α y β . Mientras que el dominio CDR3 incluye las regiones V, D y J; lo que da como resultado una mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos de éste último dominio. Se ha establecido que el dominio CDR1 hace contacto tanto con el péptido como con el MHC que lo presenta, el dominio CDR2 se une principalmente al MHC mientras que el dominio CDR3 interacciona directamente con el péptido (31,32). El TCR reconoce a la molécula de MHC una vez que se haya establecido el contacto con el péptido. La señalización del TCR depende de la unión del co-receptor (CD4 o bien CD8) con las regiones invariantes del MHC, es decir, para la selección positiva el dominio variable del co-receptor CD4 debe reconocer el dominio $\beta 2$ del MHC tipo II mientras que el dominio variable del co-receptor CD8 a la porción $\alpha 3$ del MHC tipo I(33). El factor de transcripción ThPOK, también conocido como ZBTB7B (Zinc finger and BTB domain-containing protein 7B), promueve el linaje de célula T cooperadora CD4 (33,34). En cambio, Runx3 (Runt-related transcription factor 3) favorece el linaje citotóxico CD8 y el regulador transcripcional MAZR (Myc-Associated Zinc-finger protein-Related factor) mantiene inactiva la transcripción para el loci CD8 en el estadio DN y para ThPOK en el estadio DP(35,36). Los timocitos incapaces de reconocer el complejo MHC-péptido mueren por apoptosis fenómeno también conocido como muerte por negligencia, o bien los timocitos sufren apoptosis porque la interacción TCR-péptido es de elevada afinidad, fenómeno denominado selección negativa (37). La expresión de las moléculas Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), Bid (BH3 interacting-domain) y Bim (BCL2L11) favorece la muerte por negligencia mientras que Bim se expresa durante la selección negativa (38,39). Debido a que

los péptidos presentados en el timo provienen de proteínas propias, la selección negativa evita la generación de células potencialmente autoreactivas (39). Por otro lado, para promover la selección positiva se requiere que durante el reconocimiento del complejo, la fuerza de la señal del TCR se mantenga en el umbral de intermedio a bajo (40). Las señales del TCR se inician con la activación de dos clases de cinasas de tirosina, Lck(lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), asociado al co-receptor CD4 y ZAP-70(Zeta-chain-associated protein kinase 70), asociado al complejo TCR/CD3, por efecto de la fosforilación de Lck.El inicio de la cascada de señalización del TCR involucra el reclutamiento y activación de la molécula adaptadora LAT(Linker for Activation of T cells), Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) y SLP-76(SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kD) para la subsecuente activación de moléculas PLC γ (Phospholipase C, gamma), PKC θ (Protein kinase C theta), calcineurina, Vav y MAP cinasas (figura 4) (41). En los ratones con deficiencias en LAT se observa un bloqueo de los timocitos en el estadio dn3 y defectos en la respuesta de los DP ante la estimulación vía TCR, generando defectos en la diferenciación hacia células maduras (42). Para el caso de la molécula Cbl ésta participa como regulador negativo en la señalización del TCR mediante la interacción con Lck, Vav, PLC γ (Phospholipase C γ) y Grb2(Growth factor receptor-bound protein 2). En el ratón deficiente de Cbl se incrementa la expresión de las moléculas CD3 y CD4 así como la actividad de ZAP-70 y de las MAP cinasas (Mitogen-activated protein kinases), lo que favorece la selección positiva (43,44). En concordancia, la ausencia de ZAP-70, SLP-76 o de alguna molécula que participa en la

señalización del TCR resulta en un bloqueo en el desarrollo a partir del estadio DP(45-47).

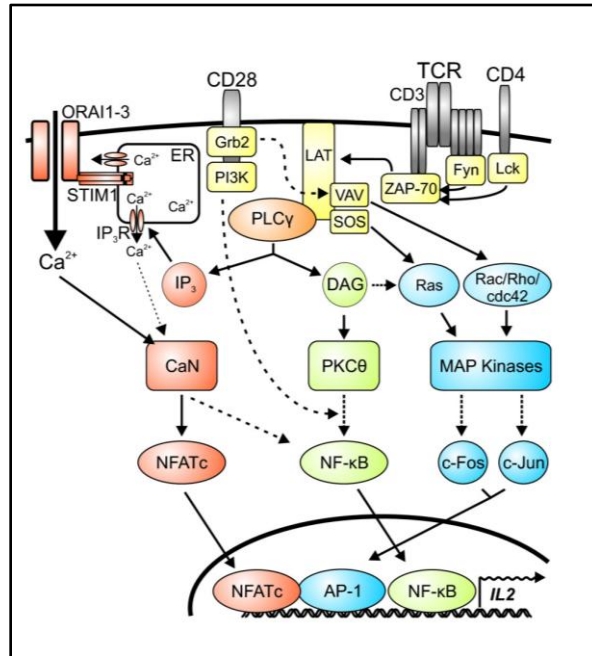


Figura 4. Esquema de las moléculas que se activan en respuesta a la señalización del TCR y el complejo CD3. La señalización a través de la molécula de coestimulación CD28 resulta en la activación de factores de transcripción que cooperan para el incremento en los niveles de calcio intracelular por efecto de la activación, modulando así la respuesta del TCR. Cell Communication and Signaling 2009 7:25

La molécula de coestimulación CD28 también participa en la selección de los timocitos y, su efecto depende de la intensidad con la que se activa la vía de las MAP cinasas (48). Se ha reportado que CD28 se expresa a partir de dn3 y su señalización favorece la expresión de CD69 en los timocitos seleccionados de manera positiva (49). Los timocitos SP son CD69-, lo cual indica que la señalización del TCR ha concluido en este estadio. En ratones deficientes de CD28 se observa una sobreproducción de timocitos DP sin embargo, presentan anomalías en la secreción de citocinas (50). Al igual, los factores de transcripción c-Myc y RORγ (RAR-related orphan receptor gamma) promueven la

sobrevida de los timocitos DP y la molécula anti-apoptótica Bcl-xL la diferenciación hacia las células CD4 SP(51,52).

Así mismo, una gran variedad de citocinas y quimiocinas que se secretan a lo largo de los diferentes estadios de maduración participan tanto en la migración como en la diferenciación de los timocitos DP. Mutaciones en las vías de señalización de IL-7 conllevan a una inmunodeficiencia combinada severa (SCID/Severe Combined Immunodeficiency) (53,54). El receptor de IL-7 consiste de la cadena α y la cadena gamma común (γ_c). La señalización inducida por TSLPR (Thymic stromal lymphopoietin) y por el receptor γ_c promueven la activación de la señalización vía Jak/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), específicamente STAT 5 (55). La cadena γ_c (CD132) por su parte, es un receptor común para las citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, las cuales están involucradas en promover la supervivencia y diferenciación celular (56).

Con respecto a las quimiocinas, la quimiocina CCL25 producida por las células dendríticas y TECs (Thymic epithelial cells) facilita la migración en la médula de los timocitos que expresan a su receptor CCR9. La expresión máxima de CCR9 se observa en los timocitos DP y disminuye conforme la maduración y emigración de las células (57). La quimiocina CXCL12 es producida principalmente por las TECs de la región subcapsular y medular y los timocitos deficientes de su receptor, CXCR4, no presentan defectos en su proliferación pero son incapaces de sostener la expresión de Bcl2 (B-cell lymphoma 2) (58-60). Por otro lado, en ratones deficientes de CCR7 ($CCR7^{-/-}$) o con anticuerpos neutralizantes para CCL19, no se

observa una alteración el desarrollo normal de los timocitos pero la migración y reclutamiento de los timocitos maduros hacia la región medular se encuentra severamente afectada (61). En contraste, la sobreexpresión de CCR7 resulta en una deslocalización de los timocitos DP a la médula y, su ausencia compromete la selección negativa de los timocitos en respuesta a los antígenos restringidos de tejido (TRAs/tissue restricted antigens) presentados (62,63). Los receptores de quimiocina señalizan a través de las proteínas GTPasas las cuales participan en los procesos de reorganización del citoesqueleto, migración celular, proliferación y supervivencia (64). La molécula Cdc42 (Cell division control protein 42) pertenece a la familia de las Rho GTPasas y, se ha reportado que los ratones Cdc42^{-/-} presentan defectos en la selección positiva y migración de los timocitos así como un incremento en la apoptosis de células en respuesta a los estímulos con anti-CD3 y anti-CD28 (65).

Adicionalmente, el estroma tímico y las células dendríticas proveen un ambiente particular durante la interacción con los timocitos DP. El primer contacto se lleva a cabo con las células del epitelio cortical, las cuales están involucradas en la selección positiva (66). Estas células presentan altos niveles de MHCII, son altamente autofágicas y expresan a las proteasas lisosomales Cathepsina-L y TSSP (Thymus Specific Serine Protease), lo que facilita el procesamiento de auto-antígenos derivados de la vía endosomal (67). Cathepsina-L lleva a cabo la degradación de la cadena invariante que bloquea el sitio de unión del antígeno a la molécula MHCII, evitando que se unan de manera prematura los péptidos antigénicos. La serina-proteasa TSSP genera péptidos únicos que promueven la

generación de células T CD4⁺ tolerogénicas. Por otro lado, la expresión de la subunidad $\beta 5T$ del proteasoma permite que estas células sean capaces de generar péptidos derivados de citoplasma para ser presentados a través de la molécula MHC I.

En contraste, las células epiteliales medulares expresan TRAs, lo que asegura la eliminación de clonas de células T autoreactivas y previene una respuesta autoinmune en los órganos periféricos (68). La expresión de TRA está regulado por el factor de transcripción denominado Regulador Autoinmune o Aire (69). Mutaciones en Aire conllevan al síndrome denominado poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica, (APECED/Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1) en humanos, el cual es caracterizado por una falla de múltiples órganos a causa de una respuesta autoinmune (70). Las células epiteliales medulares también son macroautofágicas pero a diferencia de las células corticales, éstas no expresan a la subunidad $\beta 5$ pero si Catepsina-L y Catepsina-S.

Se han identificado tres poblaciones de células dendríticas presentes en el timo; aquellas generadas en el timo a partir del precursor común para las células T y células dendríticas, las células plasmacitoides, y las células dendríticas convencionales de origen extra tímico, con fenotipo $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11b}^+\text{CD8}\alpha^-$ (71,72). En general, las células dendríticas participan en la selección negativa mediante la captura y transporte de antígenos de la periferia al timo, y promueven la generación de las células T reguladoras para inducir la tolerancia a los antígenos periféricos propios y no propios (73,74). Si bien, las células dendríticas del timo

expresan las moléculas de co-estímulo CD80 y CD86, el estado de activación permanece bajo con respecto a las dendríticas periféricas. En cuanto a las células plasmacitoides, también se encuentran en un estado inmaduro sin embargo, expresan mayores niveles de los receptores tipo Toll (TLRs) como son TLR7, TLR9 mientras que TLR2,3 y 4 permanecen bajos en comparación con las células plasmacitoides periféricas (75,76). Los macrófagos residentes tímicos en cambio son los encargados de la remoción de los timocitos apoptóticos mediante el proceso de fagocitosis. Esto conlleva a la liberación de adenosina, retinoides, TGF- β , monóxido de carbono, ATP y prostaglandinas, favoreciendo la apoptosis de los timocitos (77).

Una vez generados los timocitos maduros SP, el receptor acoplado a proteínas G tipo 1 de esfingosina 1-fosfato (S1P₁) que se expresa tras la activación del factor de transcripción KLF2 (Kruppel-like factor 2), inducido por el TCR, promueve el egreso de los timocitos maduros hacia la periferia mediante la interacción con su ligando S1P, presente abundantemente en sangre. Deficiencias en la expresión de S1P₁ resulta en la acumulación de timocitos maduros SP en la región medular del timo (78,79). Si bien, mas del 90 porciento de las celulas son eliminadas por selección negativa, aquellas celulas restantes que son exitosamente seleccionadas son capaces de poblar a los organos linfoides secundarios y promover una respuesta inmune adquirida en condiciones de inflamacion. A estos timocitos maduros se les denominan Emigrantes Tímicos Recientes (RTEs) (80,81). Los RTEs tienen una menor capacidad de proliferación y de secreción de citocinas en comparación con las células T maduras de sangre periférica. Se ha

reportado que durante las primeras 3 semanas en periferia, los RTEs presentan cambios fenotípicos y funcionales que promueven su maduración final mediante la interacción con los órganos linfoides secundarios aunque el mecanismo a nivel molecular no está completamente descrito (82-85).

ALTERACIONES EN EL TIMO CAUSADAS POR DIVERSAS INFECCIONES

Alteraciones en la arquitectura del timo han sido reportadas conforme el avance en la edad del organismo que causan defectos asociados a la reducción en la masa y celularidad del timo (86-88). Estos cambios conllevan a la involución del órgano y como consecuencia a una disminución en el egreso de células T maduras. Sin embargo, otros factores intrínsecos y extrínsecos también contribuyen a la atrofia tímica. Por ejemplo, durante la desnutrición en la región cortical del timo se incrementa la apoptosis de los timocitos y se disminuye su proliferación, por lo tanto se observa una disminución importante de la celularidad. Por fortuna, estos cambios parecen ser reversibles con una dieta apropiada (89).

Recientemente se ha identificado al timo como un órgano susceptible a diversas infecciones. Varios reportes muestran que como consecuencia de ello se presentan alteraciones en el desarrollo y en la salida de los timocitos (90,91). Las características generales son una atrofia en la función tímica debido a la disminución en tamaño y a la reducción en el número de células totales principalmente a causa de la eliminación de los timocitos DP. Sin embargo,

estudios contrastantes muestran que la actividad tímica se mantiene aún bajo condiciones de infección (92,93).

Por ejemplo, timocitos infectados *in vitro* con el virus de Epstein Barr (EBV), presentan una mayor capacidad proliferativa tras el estímulo con IL-2 y anti-CD2, en comparación con timocitos no infectados (94). En ratones infectados con *T. cruzi*, los timocitos presentan una disminución en su capacidad proliferativa tras el estímulo con anti-CD3, en contraste los niveles de IL-10 e IFN γ están incrementados, y a pesar del incremento en los niveles de MHCII en el estroma tímico (95). Al neutralizar con anticuerpos a IL-10 e IFN γ se restablece la capacidad de proliferación de los timocitos infectados. Durante la infección con *Plasmodium berguei* se incrementan ligandos de la matriz extracelular del timo como laminina y fibronectina así como las quimiocinas CCL25 y CXCL12, favoreciendo la migración de los timocitos (96). Por otro lado, se ha reportado la presencia de células CD4⁺CD8⁺ DP en órganos periféricos durante la infección con *T. cruzi*, *P. berghei*, HIV y el virus de la hepatitis B y C (90, 97,98).

En el modelo de infección con *Micobacterium avium*, ratones atímicos fueron reconstituidos con injertos de timo infectado con *M. avium* o sin infectar. Las células T generadas del timo infectado mantuvieron su capacidad para reconstituir la periferia y responder a estímulos no específicos *in vitro*. Sin embargo, fueron incapaces de montar una respuesta inmuno-protectora en contra de *M. avium*, sugiriendo que la diseminación de micobacteria al timo promueve la generación de células T tolerantes al patógeno invasor (99-101).

La disrupción de la función tímica puede impactar en el desarrollo de la tolerancia central, lo que favorece una respuesta de tipo autoinmune. En la infección con *T. cruzi*, células T que expresan TCRs “prohibidos”, es decir que en condiciones normales serían eliminados por la selección negativa, son detectados en los nódulos linfoides periféricos como consecuencia de alteraciones en el proceso de migración (102).

SALMONELLA *Typhimurim* Y SU EFECTO SOBRE EL TIMO

Salmonella entérica serovar *Typhimurium* es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Al ser ingerida vía oral, alcanza las Placas de Peyer y las células M localizadas en el intestino delgado para de allí diseminarse de manera sistémica en el organismo. *Salmonella* migra hacia los nódulos linfoides mesentéricos donde se multiplica y se libera en la sangre (103). Los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas son las encargadas de fagocitar y remover a la bacteria en sangre, hígado, bazo y médula ósea. Sin embargo, *Salmonella* es capaz de sobrevivir en los compartimentos intracelulares e interferir con la activación de la respuesta inmune a través de la expresión de factores de virulencia (104,105). Una vez internalizada, *Salmonella* reside dentro de un compartimento vacuolar denominado fagosoma grande también conocido como la vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV). La bacteria es capaz de sensor el ambiente ácido dentro de la SCV y sobrevivir mediante el remodelamiento de los componentes de la membrana a través de la inducción de

la isla de patogenicidad tipo II (SPI2), confiriéndole así resistencia a los péptidos antimicrobianos y al estrés oxidativo (106,107).

Además de las células fagocíticas, mediante los efectores del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) de la isla de patogenicidad tipo 1 (SPI1), *Salmonella* es capaz de infectar a células epiteliales. SopE, SopE2 y SopB (Salmonella outer protein E) activan las GTPasas Cdc42 (Cell division control protein 42), Rac1 y RhoG (Ras homology Growth-related) lo cual lleva a la reorganización del citoesqueleto en el hospedero, facilitando su internalización por macropinocitosis (107). *Salmonella* también es capaz de infectar a los linfocitos B de bazo así como a todos sus precursores localizados en la médula ósea (108,109).

Recientemente, se reportó que *Salmonella* es capaz de llegar al timo. En el 2012, Adam F. Cunningham et. al., reportaron con una cepa atenuada, un incremento en la apoptosis de todas las poblaciones tímicas. No obstante, con el control de la infección se restablece la frecuencia de las poblaciones tímicas debido a que se amplifica el arribo y proliferación de los progenitores tímicos tempranos (ETPs) (110). Cabe mencionar que tanto la arquitectura del timo como la salida de los emigrantes tímicos recientes (RTEs) se mantienen sin modificaciones a lo largo de la infección. En paralelo Dipankar Nandi et. al. observaron que la infección con una cepa virulenta induce la eliminación específica de la población DP en consecuencia de la pérdida del potencial de membrana y el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), atribuido a niveles elevados en la fosforilación de la cinasa JNK (c-Jun N-terminal protein kinases) así como al incremento en la expresión de Bax (BCL2-associated X protein) y disminución de

Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) en respuesta a la producción de citocinas proinflamatorias (111,112). En conjunto, estos resultados muestran que el efecto de la infección sobre el timo depende de la patogenicidad de *Salmonella*. Sin embargo, no está claro si la generación de los linfocitos T CD4 y T CD8 SP se mantiene independientemente de la eliminación de las células DP.

2.- Planteamiento del problema

Se ha descrito que la infección por *Salmonella* afecta principalmente a la población DP en el timo sin embargo, los niveles de emigrantes tímicos recientes en los órganos linfoides periféricos permanecen sin cambios aparentes. Por lo que es importante establecer cuál es el efecto de la infección por *Salmonella* durante la selección de los linfocitos T.

3.-Hipótesis.

La selección de los timocitos CD4 y CD8 SP se mantiene activo durante la infección por *Salmonella Typhimurium*.

4.- Objetivos.

Objetivo General

Determinar el efecto de la infección por *Salmonella* sobre los procesos de selección de las células T CD4 y CD8 en el timo.

Objetivos Particulares

- 1) Establecer si el efecto de la infección en el desarrollo de los linfocitos T depende de la patogenicidad y carga bacteriana.
- 2) Determinar si el incremento de los timocitos SP se debe exclusivamente al incremento en la apoptosis observada en los timocitos DP durante la infección por *Salmonella*.

5. Materiales y métodos.

Ratones, bacterias y protocolo de infección.

Ratones C57BL/6 producidos en las instalaciones del bioterio del CINVESTAV de 6 a 8 semanas fueron infectados vía intraperitoneal (i.p) con una dosis única de 50 o 500 bacterias de la cepa virulenta *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* 14028 o *Salmonella* transformada con el plásmido pEM180 (*Salmonella-gfp*), el cual expresa GFP bajo el promotor de ampicilina o de la cepa atenuada *S. Typhimurium* SL3261 (AroA-) o bien *Salmonella* atenuada fijada con formaldehído al 4%. Para obtener la bacteria fijada, a la suspensión bacteriana se añadió formaldehído al 4% y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La

bacteria fijada se centrifugó a 13000 rpm. durante 5 min., se lavó con PBS para remover el exceso de formaldehído. La muerte de la bacteria fue corroborado por la falta de crecimiento en placas de agar LB (Sigma). Todas las cepas se cultivaron toda la noche con medio Luria Bertani (LB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 37°C con agitación, posteriormente se diluyen 1:30 en medio LB fresco y se cultivaron hasta alcanzar su fase logarítmica obtenidas como densidad óptica (O.D) de 0.6 a 540nm. A partir de este cultivo se realizaron las diluciones que permitieron obtener la multiplicidad de infección (MOI) requerida.

A los días indicados, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron el bazo y el timo y se colocaron en PBS. Las muestras se homogeneizaron y los eritrocitos se removieron con el tratamiento de cloruro de amonio, el número de células y la viabilidad se determinó a partir de las células en suspensión con azul tripano y utilizando el contador de células automatizado TC10™ Automated Cell counter (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Una alícuota de la suspensión celular se lisó con Tritón X-100 al 2% en PBS y se plaqueó 100µl del lisado en placas LB agar para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) por cultivo toda la noche a 37°C.

Citometría de flujo.

La suspensión de timocitos se incubó con γ -globulinas a 4°C durante 15 minutos, previo a la inmunotinción, para bloquear los receptores Fc. Los timocitos se resuspendieron en PBS+ SFB al 2% y se incubaron a 4°C durante 30 minutos con los anticuerpos anti-CD3-Pacific blue (PB), anti CD44-PE, anti-CD25-PECy5, anti-

CD69-PECy7, anti-V β 4-PE, anti-V β 14-FITC, anti-V β 3-PE y anti-V β 5-APC (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-CD4-PE-Alexa 610 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), anti-CD8-APC-Cy5.5 (Biolegend, San Diego, CA, USA) y anti-V β 8.1/8.2-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA) o con los controles de isotipo apropiados (eBioscience). El exceso de anticuerpo se lavó con PBS y las células se fijaron con paraformaldehído al 2%. El análisis citométrico multi-color de las células se realizó en el citómetro de flujo Cyan ADP mediante la captura de 5×10^5 eventos (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Para identificar el infiltrado de las células polimorfonucleares (PMNs), el timo fue digerido con colagenasa a una concentración de 0.4 μ g/ml a 37°C durante dos horas y en agitación constante. La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon de 70- μ m y se lavó una vez con PBS + SFB al 2%. Las células fueron teñidas con los anticuerpos anti-CD11c-APC, anti-CD11b-PE-Cy7, anti-Gr1-Alexa700 (BD Pharmingen), anti-F4/80-PeCy5 (Serotec, Raleigh, NC, USA), y anti-Dec205-APC (eBioscience). La viabilidad celular se determinó mediante la incorporación de yoduro de propidio o 7-actinimocina D (7-AAD) por citometría. Los datos se analizaron con el programa Summit versión 5.1 (Beckman Coulter).

Análisis histológico.

Los órganos tímicos fueron colectados en buffer de formol al 4%, embebidos en parafina, seccionados a 4 μ m de grosor y teñidos con las técnicas rutinarias de hematoxilina y eosina (H&E).

Medición de incorporación in-vivo de BrdU por timocitos durante la infección por Salmonella.

Durante dos días a los ratones se les administró al día 3 post-infección vía i.p 1mg de BrdU (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) por día durante 2 días. Veinticuatro horas después, los ratones se sacrificaron y los timocitos fueron teñidos con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, la incorporación de BrdU se cuantificó mediante el kit BrdU Flow (BD Biosciences) en el citómetro de flujo Cyan ADP.

Tratamiento con antibiótico a los ratones infectados.

Se administró una dosis única de ciprofloxacino (Bayer, Toluca, México) de 50µg via i.p al día 3 post-infección y se mantuvo continuamente a una concentración de 1mg/ml en el agua para beber hasta el día 30 post-infección. El agua con antibiótico se reemplazaba dos veces por semana.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron utilizando la prueba T no-pareada de una sola cola mediante el programa Prisma versión 5 (Graph Pad Prism versión 5.03 Software) y los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron significativos.

6. Resultados.

Para determinar el efecto de la infección por *S. typhimurium* sobre el desarrollo de los linfocitos T, se infectaron ratones C57BL/6 con 50 y 500 bacterias de la cepa virulenta 14028, al tercer y quinto día post-infección se extrajo el bazo y el timo para determinar el número de bacterias y células tímicas totales. En la figura 5, se muestra la presencia de *Salmonella* en el bazo se observa que el número de UFCs recuperados al día 3 en los ratones infectados con la dosis de 50 bacterias es mayor que en aquellos infectados con la dosis de 500. Contrario a lo observado al día 5 post-infección, donde el incremento en la replicación bacteriana se ve favorecido con la mayor dosis. En cuanto al número de células totales recuperadas, únicamente se observó una disminución significativa al día 5 en los ratones infectados con la mayor dosis. Estos resultados indican que un bajo número de bacterias permite una mejor replicación de *Salmonella* a tiempos tempranos. No obstante, al aumentar la dosis de la bacteria se pierde el control de la infección por parte de la respuesta inmune.

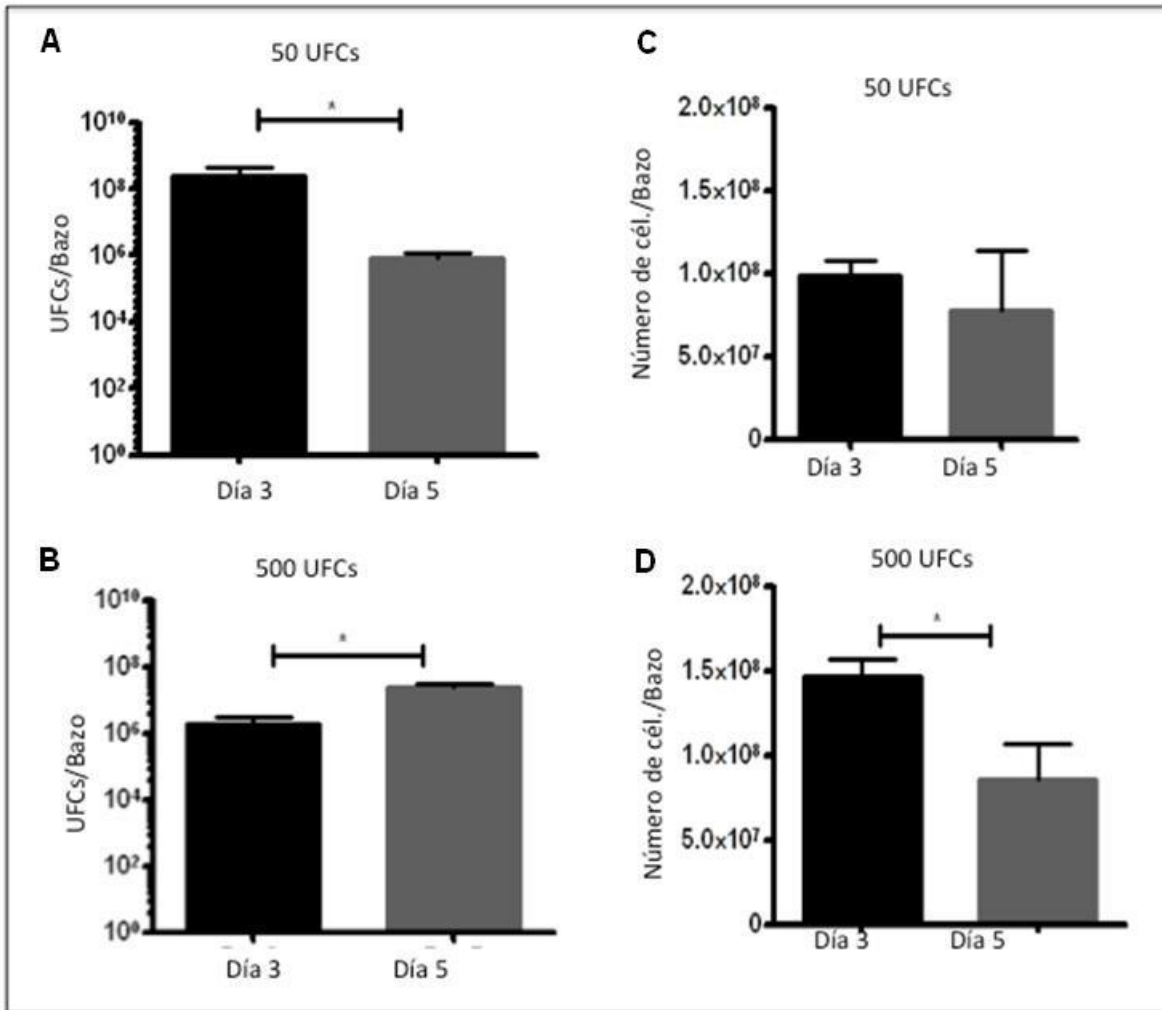


Figura 5. La disminución de las células de bazo depende de la carga bacteriana presente en los **tiempos tardíos de la infección**. Gráficas A y B muestran el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) y, C y D el número de células totales de bazo, obtenidas al día 3 y 5 post-infección de ratones C57/BL6 infectados con la dosis de 50 o 500 bacterias vía intraperitoneal (i.p). Los datos son expresados como la media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Con respecto al timo, la presencia de *Salmonella* fue observada hasta el día 5 post-infección (Figura 6). No obstante, el número de células totales y la disminución en las poblaciones CD4 SP y en las subpoblaciones dn2 y dn3 fueron evidentes desde el día 3 post-infección, aunque únicamente en los ratones infectados con la dosis mayor. Es importante resaltar que al día 5 post-infección a pesar de haber recuperado una cantidad similar de bacteria para ambas dosis, las alteraciones en el número de células tímicas totales se observaron de manera dosis dependiente. Adicionalmente, *Salmonella* promueve una desorganización en la arquitectura del timo, igualmente dosis dependiente, lo que conlleva a una disminución en la celularidad de la corteza y a un acumulo de células en la médula (Figura 6B).

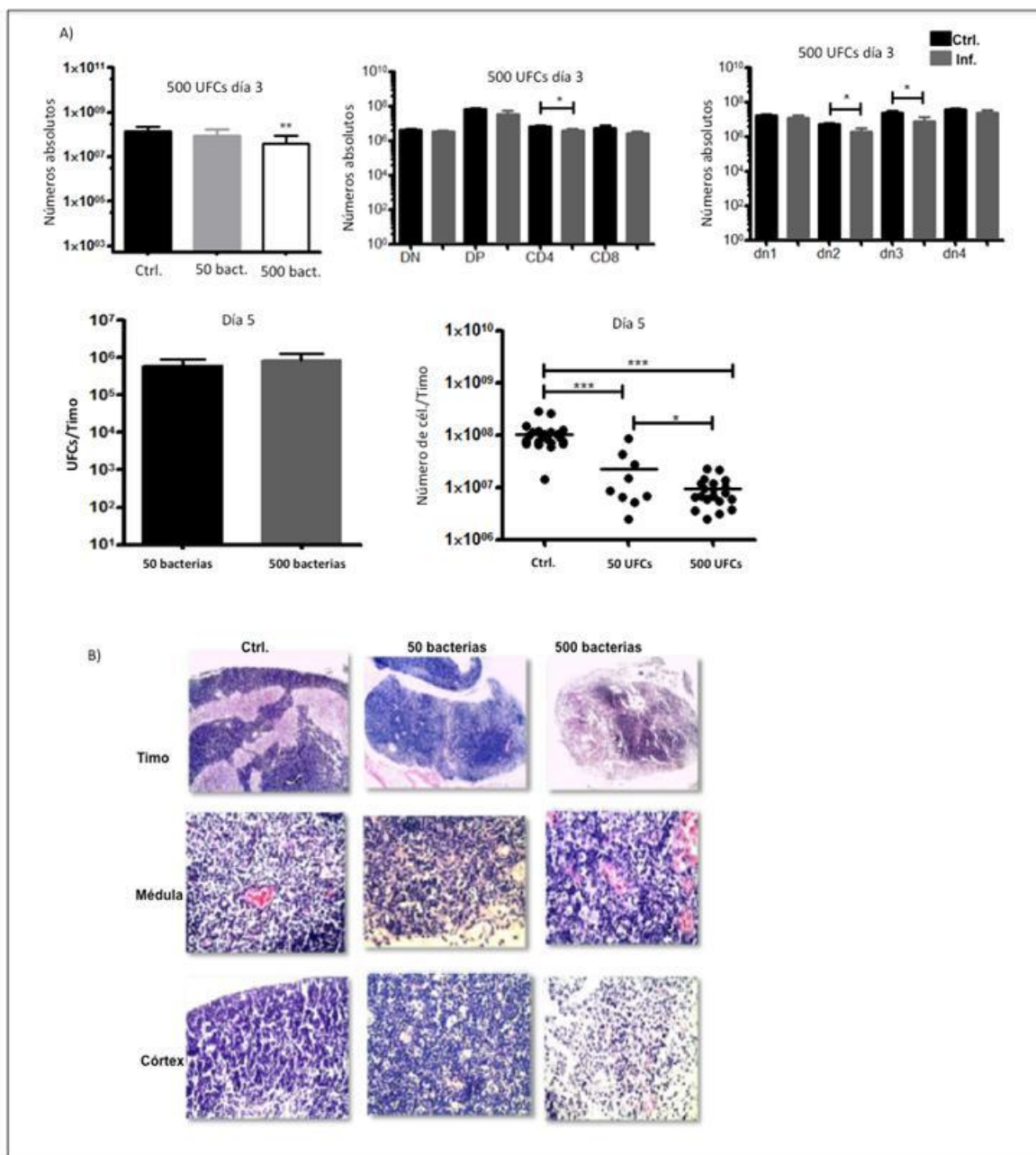


Figura 6. La invasión de *Salmonella* al timo promueve una reducción en el número de células totales así como una destrucción de las zonas corticales y medulares. A) Gráfica de barras y puntos donde se muestra el número de células totales y de UFCs recuperadas al día 3 y 5 post-infección con 50 y 500 bacterias. Los datos se expresan como media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.0003$. B) Tinción de hematoxilina y

eosina (H&E) de timo de ratones no infectados e infectados con 50 y 500 bacterias. Los primero tres paneles tienen magnificación 4x y los 6 paneles restantes son 40 x.

Con la finalidad de determinar cuáles células del timo se encontraban infectadas, se analizaron a las poblaciones de neutrófilos Gr-1^+ , células dendríticas DEC205^+ , CD11c^+ y monocitos y macrófagos CD11b^+ y F4/80^+ . En la figura 7a se muestra que el número de células de las distintas poblaciones de granulocitos son similares con respecto a los ratones no infectados, excepto las poblaciones Gr-1^+ y células dendríticas DEC205^+ las cuales se observó una disminución en el número pero no en su porcentaje. Estos datos indican que la disminución de las células totales del timo no se debe a una eliminación en las células polimorfonucleares. Para establecer qué población celular había fagocitado a la bacteria, se infectaron a los ratones con la cepa de *Salmonella*-GFP para su posterior visualización, mediante citometría de flujo de aquellas células que contienen a la bacteria intracelular. En la figura 7b se muestra en una gráfica de puntos la distribución de las células con respecto a los parámetros de tamaño (FS) y granularidad (SS) así como el porcentaje células que expresan GFP en la región de linfocitos (R1) o bien en la región de granulocitos (R2). Con la co-tinción con los anticuerpos que identifican a las células polimorfonucleares observamos que principalmente estaban infectadas las células dendríticas aunque en menor medida también los neutrófilos y macrófagos son las células blanco de la infección por *Salmonella* en el timo.

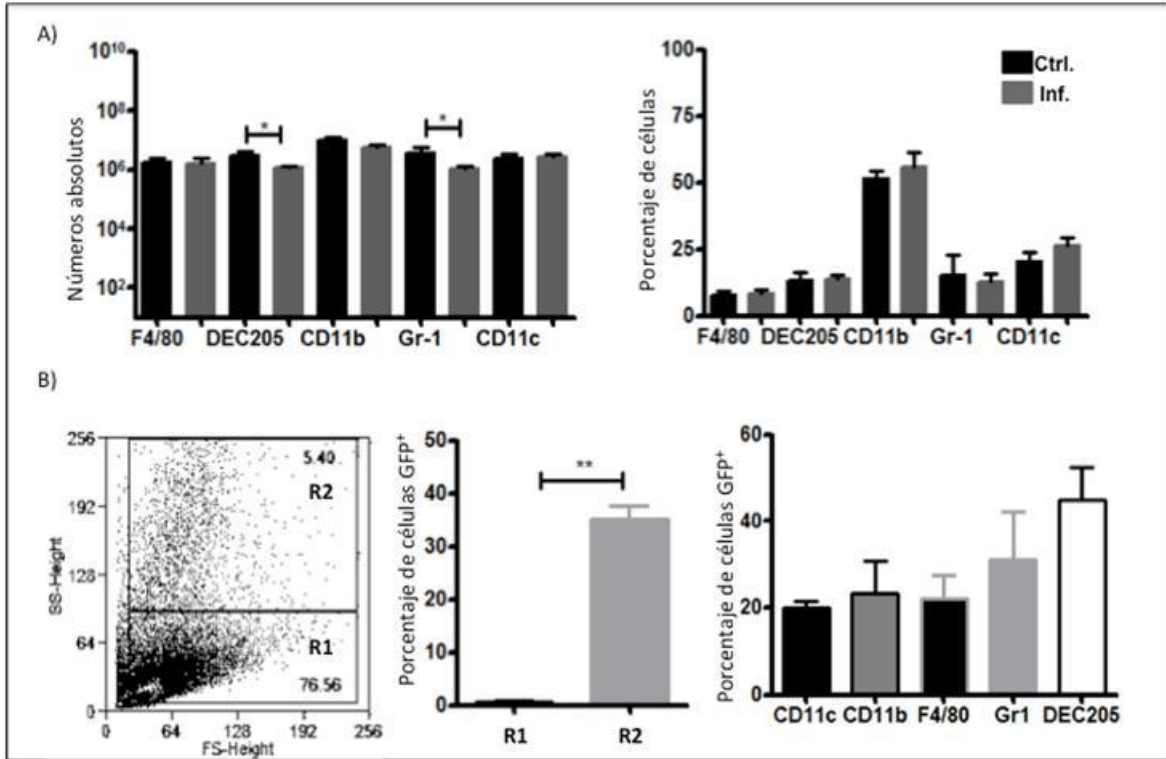


Figura 7. Las células granulocíticas son el blanco de la infección de *Salmonella* en el timo. A) Gráficas de barras que muestran los números absolutos y porcentaje de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas presentes en el timo infectado con 500 bacterias y no infectado. B) Gráfica de puntos obtenida del citómetro de flujo donde se muestra la distribución de las células con los parámetros de tamaño (FS) y granularidad (SS) y la expresión de GFP en la región de linfocitos (R1) o granulocitos (R2). Así mismo, se realizó co-tinción con los anticuerpos CD11c, CD11b, F4/80 Gr-1 y DEC205 para determinar el porcentaje de las estirpes celulares infectados con *Salmonella*. Los datos se expresan como media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.0003$.

Si bien los timocitos no son blancos directos de la infección por *Salmonella*, al considerar el daño en la estructura tímica así como la disminución en las células totales, indicaron que el desarrollo de los timocitos podría verse afectado al interactuar con células APC potencialmente infectadas.

Por ello, las distintas poblaciones tímicas fueron analizadas. Como se describió en la figura 6, se identifican alteraciones en algunos estadios de maduración desde el día 3 post-infección con las dosis de 500 bacterias. Sin embargo, al día 5 post-infección los defectos sobre las poblaciones tímicas se ven más pronunciados en ambos grupos y cabe mencionar que nuevamente el efecto es dosis dependiente. En la figura 8 se muestra una redistribución de los timocitos a lo largo de los distintos estadios de maduración (Figura 8A), así como una reducción en la frecuencia celular de todas las poblaciones tímicas analizadas con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD44 y anti-CD25. No obstante, al analizar el porcentaje de los timocitos en los distintos estadios de maduración observamos que las poblaciones DN y SP, no así los DP, incrementan con la infección. Al igual en la población DN, las células se acumulan en dn1 y dn4 (Figura 8B). Para corroborar si este incremento se debe al aumento en células progenitoras previamente reportado con una cepa atenuada de *Salmonella* (110), se analizó el marcador convencional de células progenitoras tímicas, c-Kit, así como la molécula CD38, la cual ha sido identificada como molécula de activación y marcador general de progenitores linfoides. Como se muestra en la figura 9a, existe una tendencia al incremento en las células c-Kit⁺ durante la infección sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos en contraste con el incremento observado en el porcentaje de células CD38⁺ (fig. 9b).

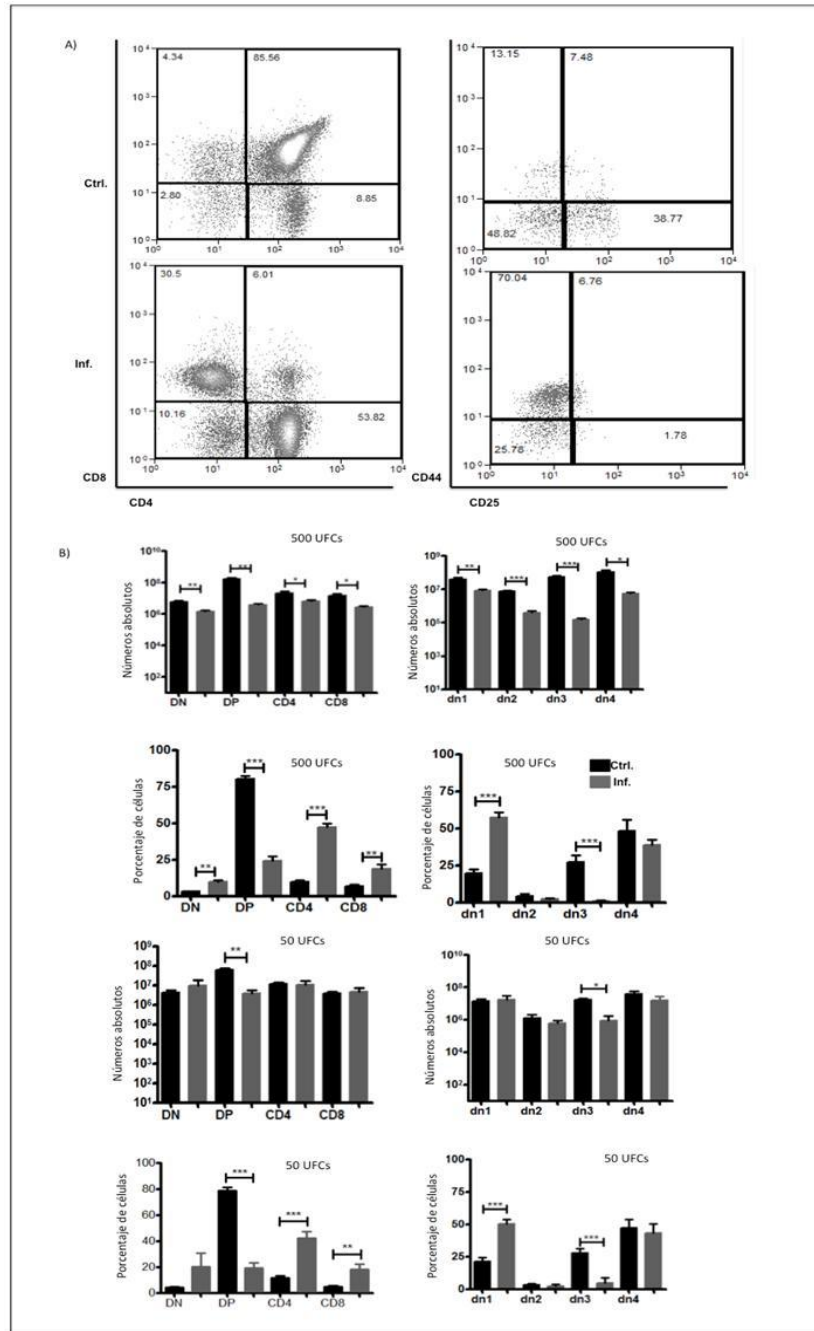


Figura 8. La infección por *Salmonella* altera las poblaciones tímicas de manera dosis dependiente. A)

Gráfica de puntos donde se muestra la distribución esperada de los timocitos DN, DP y SP basados en la expresión de los co-receptores CD4 y CD8, para el análisis de las poblaciones dn1-dn4, CD44 y CD25 dentro de la región DN mediante citometría de flujo. Los números dentro de los cuadrantes indican el porcentaje de células. B) Las gráficas de barras muestran los números absolutos así como los porcentajes de las distintas poblaciones tímicas obtenidas al día 5 post-infección con 50 y 500 bacterias. Los datos se expresan como la

media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * p <0.02, ** p <0.005, *** p <0.0001.

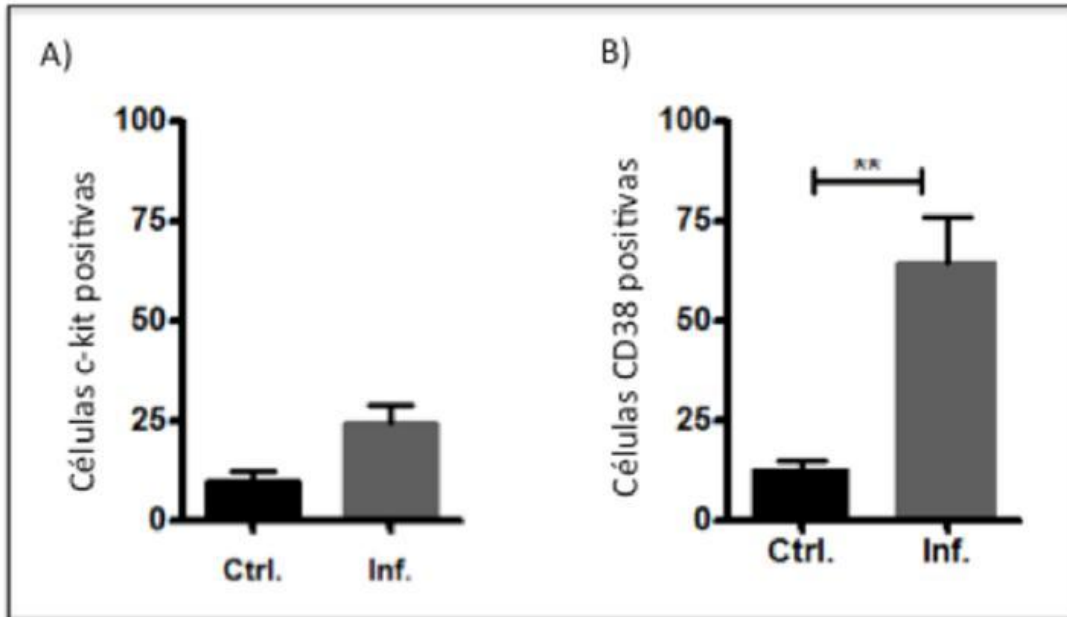


Figura 9. Se incrementa el porcentaje de células progenitoras en el timo infectado. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de células A) c-kit+ y B) CD38 positivas dentro de la región DN obtenida por citometría de flujo de ratones infectados durante 5 días con 500 bacterias. Los datos se expresan como la media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * p <0.02, ** p <0.005, *** p <0.0001.

Para determinar si los cambios observados en las poblaciones tímicas se deben a un efecto directo de la patogenicidad de *Salmonella*, se infectaron a ratones con la cepa atenuada AroA- y también se administró la bacteria muerta. Los resultados muestran una disminución similar en la frecuencia de los timocitos DP y SP entre ambos grupos pero la distribución en los distintos estadios de maduración es diferente (Figura 10). Con la cepa atenuada de *Salmonella* la población DN se

encuentra drásticamente más incrementada y la población DP se reduce en comparación con la bacteria muerta. En cuanto a las poblaciones SP, se observa un incremento en CD4 SP en ambos grupos aunque éste es menor que con la cepa virulenta. Con estos datos concluimos que la patogenicidad de la bacteria juega un papel importante en la alteración del proceso de maduración de los timocitos.

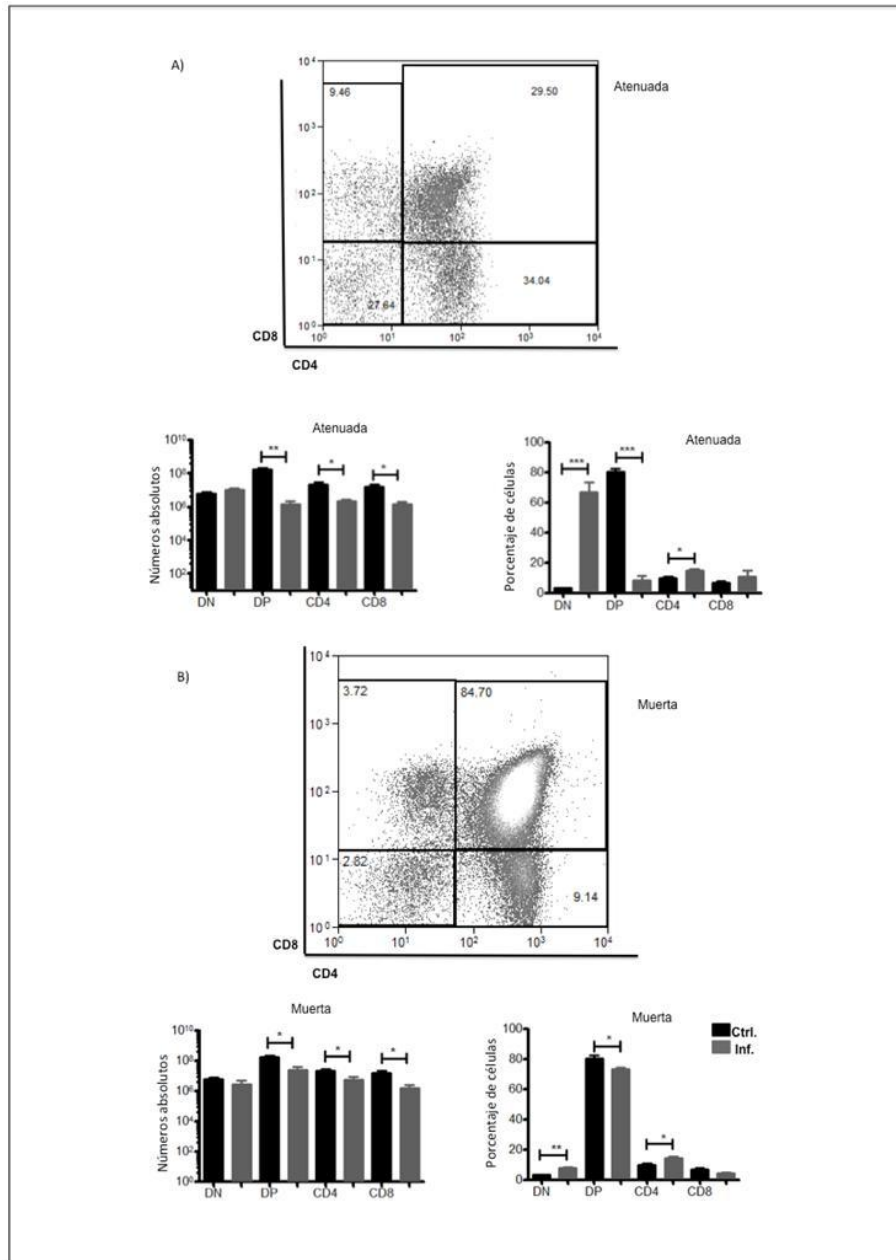


Figura 10. La patogénesis de *Salmonella* afecta de manera diferencial la distribución de las poblaciones tímicas. Ratones C57BL/6 fueron infectados durante 5 días con 500 bacterias de *Salmonella* A) de la cepa atenuada Aroa- o B) la cepa virulenta fijada con paraformaldehído. Se determinaron los números absolutos y porcentajes de las 4 poblaciones tímicas mediante citometría de flujo. Los números presentes en cada uno de los cuadrantes de las gráficas de puntos refleja el porcentaje de cada población. Los datos se expresan como la media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * $p < 0.02$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$.

Es importante definir el efecto de la infección sobre los procesos de apoptosis y proliferación en los distintos estadios de maduración. En la figura 11a se muestra los números absolutos y porcentaje de viabilidad de los timocitos obtenidos al día 5 post-infección mediante la tinción *ex vivo* con 7-AAD. Si bien se observa una reducción en la frecuencia de células viables en todos los estadios de maduración, en términos de porcentaje los timocitos DN y CD4 SP se encuentran incrementados. Para el análisis del estado de proliferación *in vivo* de los timocitos, se inyectó 2 veces con un intervalo de 24 hrs., vía intraperitoneal, BrdU a ratones infectados con 500 bacterias durante 3 días y se extrajo el timo. En la figura 11b se muestra una reducción dramática de la proliferación de todas las poblaciones tímicas. Estos resultados indican que el incremento de las células CD4 y CD8 SP es independiente de la eliminación de los timocitos DP y de la proliferación celular. En condiciones normales, los timocitos CD4 y CD8 SP se generan a partir de los timocitos DP capaces de sobrepasar las señales que conducen a la apoptosis por efecto de la selección negativa. El receptor γ_c común (γ_c) señala para diversas citocinas que favorecen la supervivencia de los timocitos por lo que decidimos evaluar la expresión de este receptor en los timocitos de ratones infectados. En la figura 11c se muestra el aumento en el porcentaje de células que expresan el receptor γ_c en las distintas poblaciones tímicas.

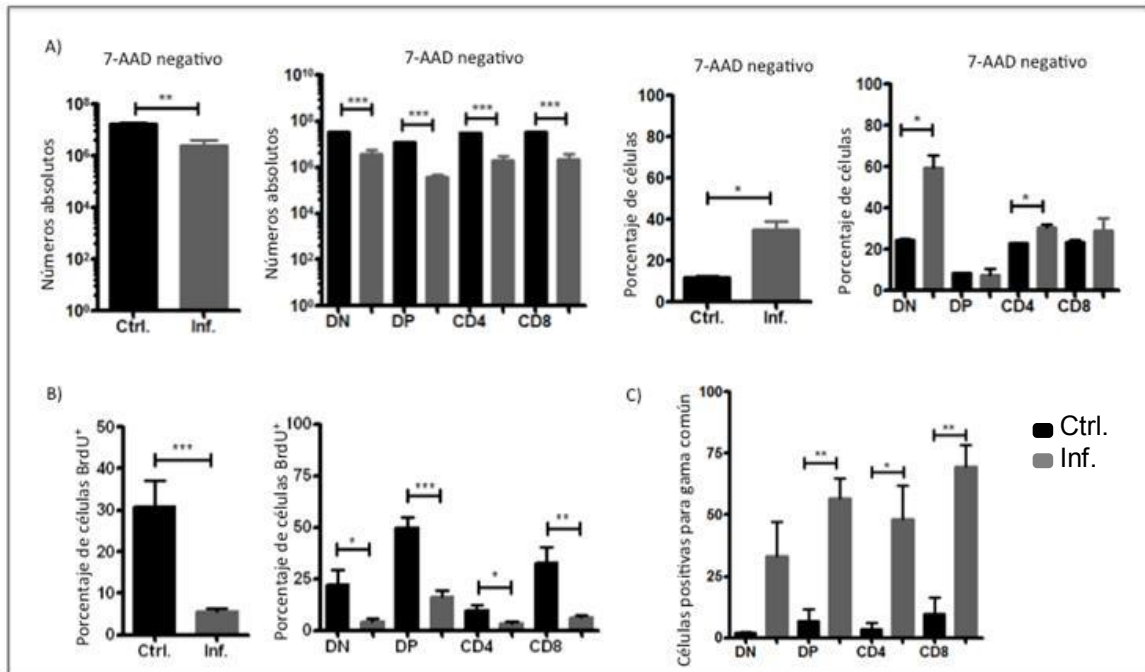


Figura 11. Se mantienen las poblaciones maduras de timocitos durante la infección por *Salmonella*. A) Se muestran los números absolutos de las células viables obtenidas de los ratones control e infectados con la cepa de *Salmonella* virulenta. B) Porcentaje de células que incorporaron *in vivo* BrdU analizadas mediante citometría de flujo. C) Expresión del receptor de la cadena gamma común en las poblaciones DN, DP y CD4 y CD8 SP de timocitos. Los datos se expresan como la media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * $p < 0.02$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$.

Debido a que la inducción de las vías anti-apoptóticas favorece la selección positiva, evaluamos si a pesar de la infección el proceso de selección positiva se mantiene activo. Como se mencionó previamente, los receptores CD3, CCR7, CD25, CD44 y CD69 permiten la identificación de células DP que han sido seleccionadas positivamente. Por ello, analizamos el comportamiento de éstas moléculas en el contexto de la infección por *S. Typhimurium*. Como se observa en la figura 12a, el porcentaje de células que expresan CCR7 se incrementa

significativamente a lo largo de los distintos estadios de maduración. De la misma manera, el porcentaje total de las células CD3⁺ aumenta así como la población de timocitos DP CD44⁺, CD69⁺ y CD25⁻,(Figura 12b). Al analizar a la población SP, observamos un aumento en las células CD3⁺ y CD4SP que expresan CD44. Sin embargo, las moléculas CD25 y CD69 permanecen sin cambios en los CD4 y CD8SP, por lo que el estado de activación de lo timocitos que se están seleccionando positivamente en presencia de *Salmonella* se mantiene en reposo (Figura 12c).

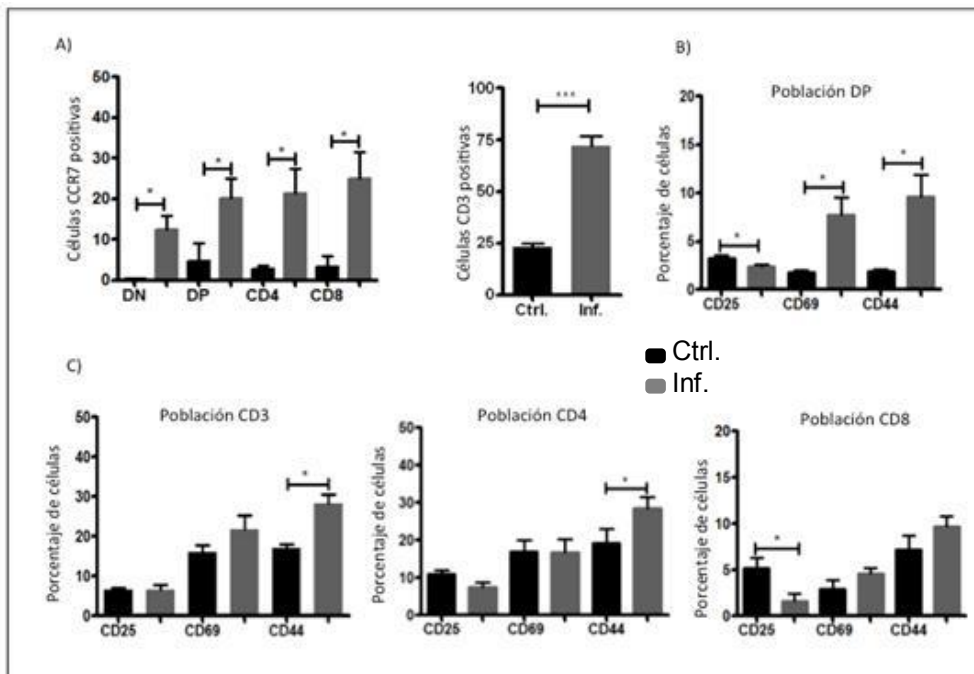


Figura 12. **La infección incrementa la selección positiva.** A) Análisis cuantitativo de las células CCR7⁺ dentro de cada subpoblación tímica y de células totales CD3⁺ durante la infección por *Salmonella*. B) Porcentaje de células que expresan las moléculas CD25, CD69 y CD44 dentro de las poblaciones DP, C) CD3, CD4 y CD8 SP. Los datos se expresan como la media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. *p<0.02, ***p<0.0001.

Tomando en cuenta el contexto de la atrofia tímica bajo el cual se está llevando a cabo esta selección positiva, es importante definir si el repertorio de los rearrreglos del TCR generados durante el desarrollo normal de los linfocitos T se conserva en la infección. En la figura 13 se muestra la expresión de 5 cadenas V β que conforman al TCR γ que se expresan en las células DP, CD4 y CD8 SP. Para el caso de la cadena V β 8, el incremento de expresión en la población DN y DP no se ve reflejado en las poblaciones CD4 y CD8 SP. En contraste, el aumento de las cadenas V β 4 y V β 14 promueve un fenotipo CD4 SP mientras que la selección de las células CD8 SP se ve favorecido por las cadenas V β 3 y V β 5.

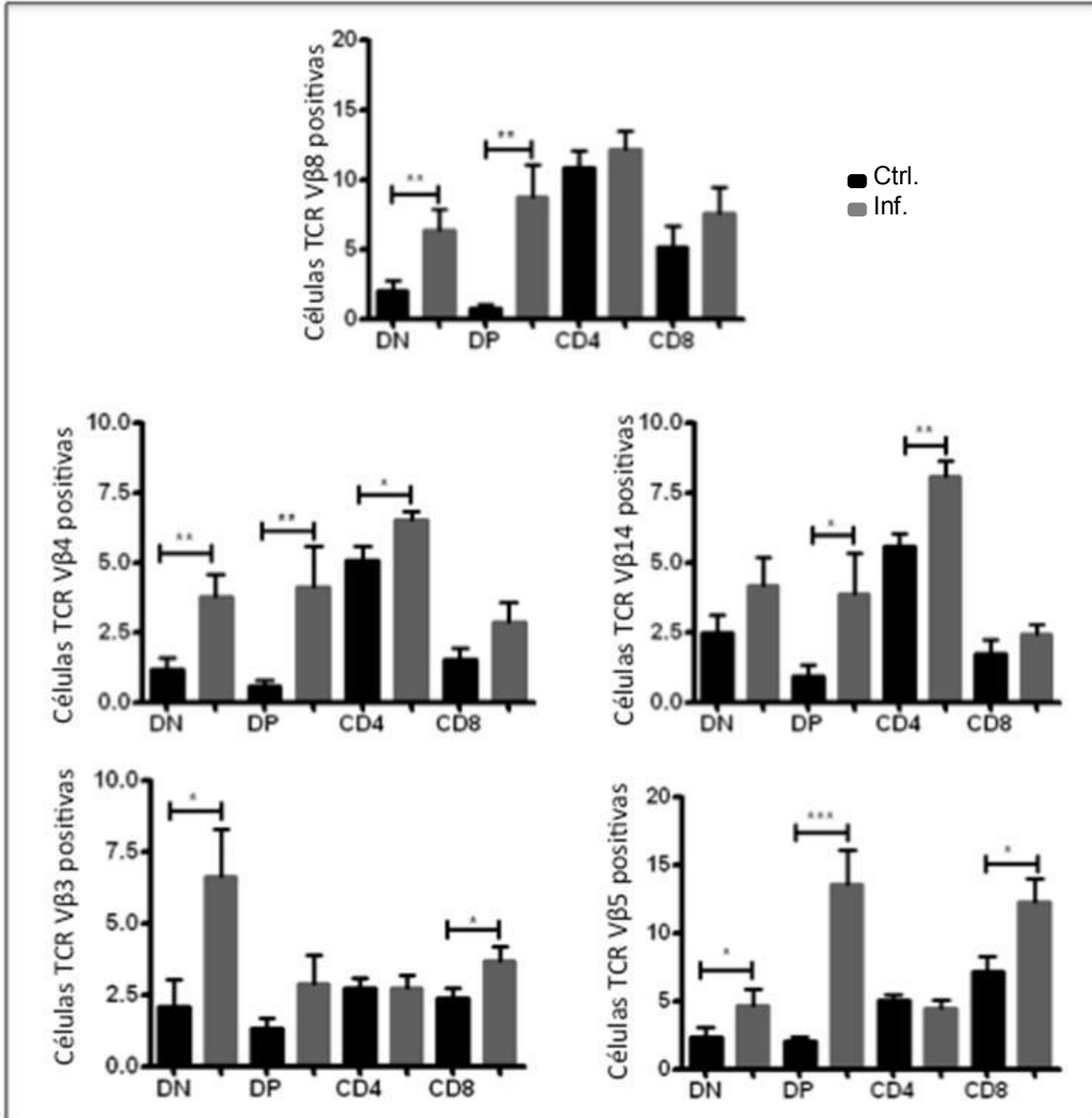


Figura 13. La frecuencia de uso de los rearrreglos del TCR se modifica durante la infección por *S. Typhimurium*. Gráficas representando el porcentaje de la media \pm SEM de las cadenas TCR V β 8, 4, 14, 3 y 5 expresada en las poblaciones dn4, DP, CD4 y CD8 SP, evaluados mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como la media \pm SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. * $p < 0.02$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$.

Es importante considerar que las células que escapan la selección negativa durante la infección por *Salmonella* son potencialmente dañinas para el organismo. Por ello, es importante evaluar si los defectos reportados en el timo prevalecen una vez que la enfermedad se haya resuelto. Para ello, a los ratones infectados con 500 bacterias se les administró vía i.p el antibiótico ciprofloxacino y se mantuvo en agua hasta los 5 o 30 días post-infección. En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos al día 5 post-infección en los ratones tratados con ciprofloxacino. Se puede observar que el tratamiento a corto plazo no modificó la distribución de las poblaciones tímicas sin embargo, existe una tendencia para restablecer la frecuencia en el uso de las cadenas V β previamente analizadas. Estos datos se confirman con los efectos observados en los ratones tratados al día 30 post-infección (Figura 15). El tratamiento a largo plazo (30 días) restableció la distribución tímica y la selección de los timocitos CD4 y CD8 es comparable con los ratones no infectados (figura 15a). Con respecto a la arquitectura del timo, las alteraciones en las estructuras corticales y medulares fueron revertidas con el tratamiento (figura 15b). No obstante, a pesar de la eliminación de la bacteria en el bazo, logramos recuperar bacteria del timo de los ratones infectados y tratados con antibiótico durante 30 días (figura 15c).

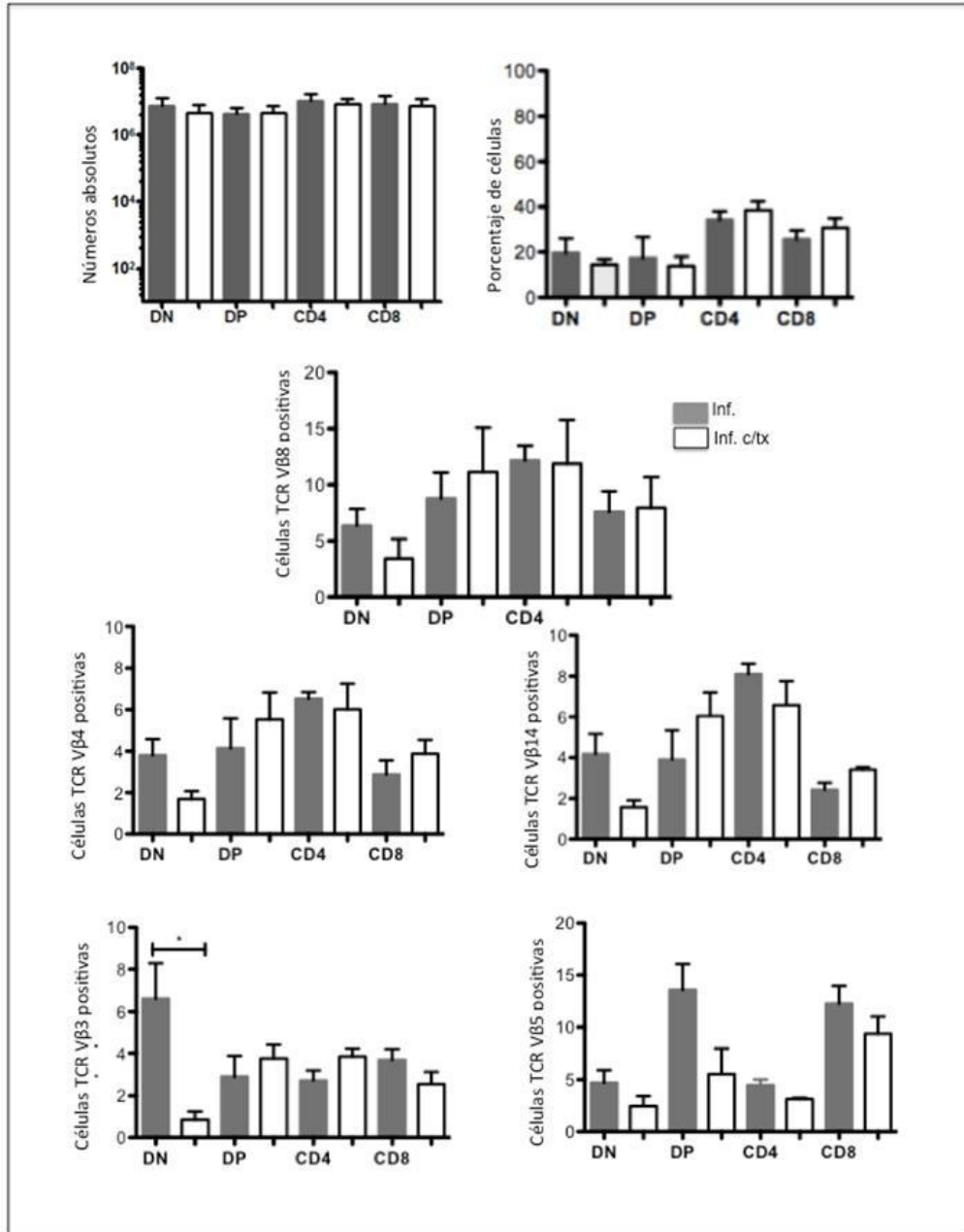


Figura 14. **El tratamiento a corto plazo con antibiótico modifica de manera discreta las alteraciones del uso del repertorio del TCR.** Ratones infectados fueron tratados con una dosis única de ciprofloxacino de 50µg al día 3 post-infección y se mantuvo continuamente a una concentración de 1mg/ml en el agua para beber y analizados para A) modificaciones en la distribución de los timocitos DN, DP y SP así como B) la selección de cadenas específicas Vβ del TCR en las poblaciones dn4, DP, CD4 y CD8 SP. Los datos se expresan como la media ± SEM y corresponden en promedio a 5 ratones por cada grupo provenientes de 3 experimentos independientes. *p<0.02.

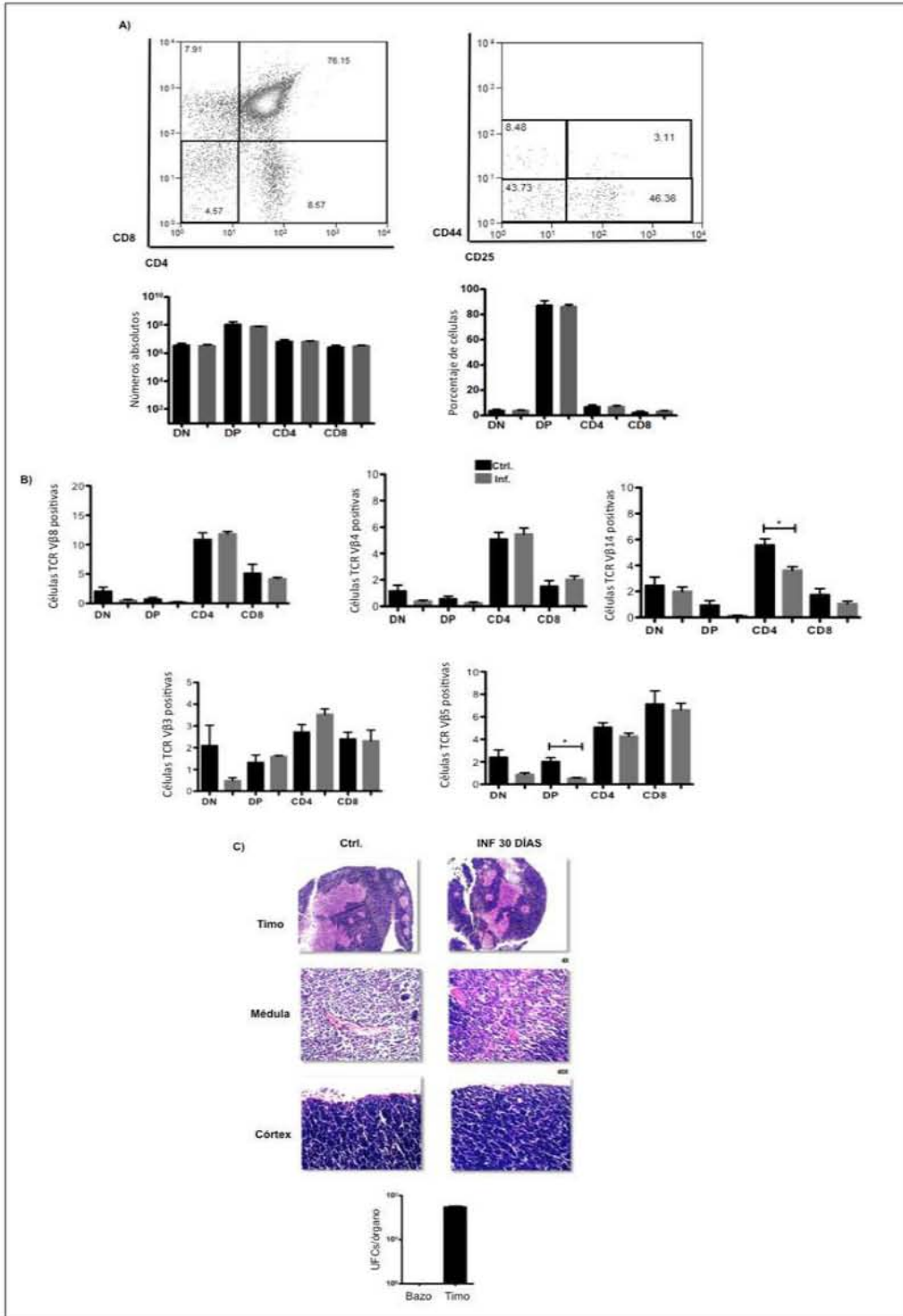


Figura 15. La atrofia del timo en los ratones infectados se restablece con tratamiento de antibiótico a largo plazo. A) Gráfica de puntos que representa las cuatro poblaciones tímicas (basado en la expresión CD4 y CD8) de ratones infectados y analizados 30 días post-infección. Los porcentajes de los timocitos de las subpoblaciones DN (dn1-dn4) fueron seleccionados mediante la expresión CD44 y CD25 a partir de la región

CD4-CD8-. Los números en los cuadrantes indican los porcentajes de cada población. Los números absolutos y porcentajes son expresados con la media \pm SEM. B) Análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo de las células que expresan las cadenas V β 8, 4, 14, 3 y 5 del TCR. C) Arriba, inmunohistoquímica del timo teñido con H&E de ratones no infectados e infectados con *Salmonella* y tratados con ciprofloxacino, analizados 30 días post-infección. Abajo, número de bacterias recuperadas de células de bazo y timo total de ratones infectados y tratados con antibiótico 30 días post-infección. Se muestran imágenes representativas de tres ratones independientes. Los primero dos paneles tienen magnificación 4x y los 4 paneles restantes son 40 x. * $p < 0.02$.

Discusión.

En este estudio se mostró que el arribo de *Salmonella* al timo conlleva a una hipocelularidad en la región cortical y acumulo de células en la región medular así como a una redistribución de las poblaciones tímicas. Estos efectos reportados dependen de la patogenicidad y carga bacteriana con la que se promueve la infección en la periferia mientras que se mantienen independientes de la cantidad de bacteria que arriva al timo. En conjunto, los datos obtenidos en la figura 6 sugieren que el número de UFCs en el timo es independiente de la dosis inicial de infección sin embargo, el daño en el timo es dependiente de la respuesta inmune establecida por la dosis inicial de la bacteria.

Reportes previos han mostrado la capacidad de *Salmonella* para infectar a macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (103,109). Al evaluar qué células eran blanco de *Salmonella* en el timo, observamos que las células granulocíticas, y no así los timocitos, contienen a la bacteria intracelular, sugiriendo que estas células son las encargadas de transportar a la bacteria de la periferia al timo.

Por otro lado, el resultado del acumulo de células en la médula es congruente con la expresión prematura y sobreexpresión del receptor CCR7 en las poblaciones DN, DP y SP, y con el incremento de las células CD4 y CD8 SP por efecto de la selección positiva. Si bien, la inducción a apoptosis en los timocitos DP ha sido previamente reportada durante la infección por *Salmonella* (111), nuestros resultados muestran que el proceso de selección de los timocitos se mantiene de manera independiente del incremento en la apoptosis en todas las poblaciones tímicas. Al igual, el proceso de proliferación se encuentra drásticamente disminuido en todas las poblaciones tímicas durante la infección. El incremento en la expresión de la cadena γ_c en los timocitos sugiere que se favorecen las señales de supervivencia en las células que permanecen en el timo infectado. Aunque es importante medir la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl2, o bien cuantificar las citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, las cuales señalizan a través del receptor γ_c para confirmar que esta vía de señalización se encuentra activada.

Se ha reportado que las células T maduras de periferia y con un fenotipo activado son capaces de volver a entrar al timo y localizarse principalmente en la médula (113). La función de éstas células ha sido evaluada mediante la transferencia adoptiva de células T singénicas y antígeno específicas (OT-I), mostrando su entrada al timo y su capacidad de inducir la muerte de las células dendríticas y medulares antígeno antígeno específicas. El aumento reportado en este estudio de las poblaciones DP CD69⁺, CD44⁺ y CD3⁺ y no de las poblaciones SP con fenotipo activado, confirman que el proceso de selección positiva es el mecanismo

que conlleva al incremento de las poblaciones CD4 y CD8 SP, descartando la posibilidad de que el incremento de las poblaciones SP es debido al reingreso de células T maduras.

Considerando que la integridad de la arquitectura del timo es crucial para mantener de manera ordenada y controlada el proceso de desarrollo de linfocitos T, es presumible que durante la infección se estén seleccionando positivamente células T, las cuales bajo condiciones de homeostasis serían eliminadas por apoptosis. Por ello, se determinó si salmonella altera la frecuencia en el uso del repertorio del TCR en condiciones normales. Los resultados obtenidos muestran que la selección de los timocitos DP hacia los linajes CD4 y CD8 favorece a ciertas familias de cadenas V β s particulares del TCR. Para el caso de las cadenas V β 4 y V β 14, se promueve el linaje T CD4+ mientras que las cadenas V β 3 y V β 5 son seleccionadas para enriquecer a las células T CD8 SP. En conclusión, *Salmonella* promueve la selección positiva de clones particulares CD4 y CD8 SP. No obstante, se requiere confirmar que estas células generadas efectivamente son capaces de emigrar hacia los órganos linfoides periféricos para concluir con su proceso de maduración. Adicionalmente, es importante establecer el efecto de estas células sobre la inducción de una respuesta autoinmune. Algunos reportes han sugerido una asociación entre la infección por *Salmonella* y las respuestas autoinmunes (114-116). Por ejemplo, la Artritis reactiva (ReA) es una enfermedad que se asocia a secuelas reumatológicas obtenidas en consecuencia de la infección por *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* (117). Por otro lado, la variante del gen ATG16L1 (T300A) está asociado a un incremento en la

susceptibilidad a la enfermedad de Crohn y a una deficiencia en la fagocitosis de salmonella, confiriendo así una resistencia a la invasión de la bacteria (116).

Nuestros resultados muestran además que los defectos reportados en el timo pueden ser revertidos con el control de la carga bacteriana a nivel sistémico. Con el uso de antibiótico, los ratones infectados y tratados con antibiótico durante 30 días presentan una arquitectura tímica y una distribución de los timocitos comparable a los ratones no infectados. En concordancia, la frecuencia del uso del repertorio $V\beta$ se restablece en las poblaciones DP y CD4 y CD8 SP por efecto del control en la selección positiva.

Reportes indican que la regeneración del timo se atribuye a la producción de las citocinas IL-22 e IL-17 por parte de las células inductoras de tejido linfoide (LTI's), en respuesta al estímulo con IL-23 y a la eliminación de los timocitos DP en ratones irradiados (118,119). Estas citocinas promueven la proliferación y la reparación de daño del epitelio. Un efecto similar se observa adicionando de manera exógena IL-22 (118). Por lo tanto, la medición de IL-22 durante y después de la infección por salmonella es importante para determinar si es el mecanismo que promueve la reversión de las alteraciones reportadas en el timo durante la infección por *Salmonella*.

Cabe destacar que a diferencia del timo, los ratones infectados durante 30 días son capaces de eliminar a la bacteria del bazo. Se ha reportado que de los pacientes que se infectan con salmonella entre el 1 y el 6% se mantienen como portador, siendo los cálculos biliares, el hígado y las heces los sitios favorecidos

para el establecimiento de la bacteria (120,121). Este último hallazgo destaca la importancia del timo como un órgano potencialmente capaz de servir como un sitio de reservorio para *Salmonella*.

Conclusiones.

1.- La invasión de *S. Typhimurium* en ratones se restringe por la carga bacteriana en el timo.

2.- Los defectos en la desorganización de la arquitectura tímica y la disminución de las poblaciones tímicas dependen de la patogenicidad y carga bacteriana.

3- La infección por *Salmonella* en el timo se limita a los granulocitos.

4.- *Salmonella* incrementa la selección positiva de los timocitos CD4 y CD8 SP que expresan TCRs con cadenas V β particulares.

6.- El tratamiento con antibiótico revierte los defectos reportados en el timo.

7.- La presencia de *Salmonella* persiste en el timo a pesar de su eliminación en la periferia.

Abreviaturas.

PSGL1: P-selectina glycoproteína ligando-1

TSLP: Linfopoyetina estromal tímico

TSLPR: Receptor de linfopoyetina estromal tímico

GENES V D J: Genes Variable, Diverso y Unión.

RSS: Señales de secuencia de recombinación

RAG: Genes de activación para la recombinación

DNA-PK: Protein-quinasas de DNA

TEA: Promotor temprano de células T alfa

CDR: Regiones determinantes complementarias

JAK: Kinasa de Janus

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.

TSSP: Serin proteasa específica de timo

APECED: Autoinmunidad poliendocrinopatía- candidiasis distrofia ectodermal

TGF- β : Factor de crecimiento transformante-beta

JNK: Kinasas c-Jun N-terminal

PBS: Buffer salino de fosfato

PE: Ficoeritrina

FITC: Fluoresceína

APC: Aloficocianina

PECy: Ficoeritrina- cianina

APC-Cy: Aloficocianina- cianina

BrdU: Bromodesoxiuridina

GFP: Proteína verde fluorescente.

Referencias.

- 1.-Keunok Jung, Inhak Choi. Emerging Co-signaling networks in T cell immune regulation. **Immune Netw.** 2013 Oct;13(5):184-93.
- 2.-Fülöp T, Larbi A, Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. **Front Immunol.** 2013 Sep 13;4:271.
- 3.-Nitta T, Ohigashi I, Nakagawa Y, et al. Cytokine crosstalk for thymic medulla formation. **Curr Opin Immunol.** 2011 Apr;23(2):190-7.
- 4.-Alexandropoulos K, Danzl NM. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. **Immunol Res.** 2012 Dec;54(1-3):177-90.
- 5.-Heinzel K, Benz C, Martins VC, et al. Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. **J Immunol.** 2007 Jan 15;178(2):858-68.
- 6.-Zhang SL, Bhandoola A. Trafficking to the thymus. **Curr Top Microbiol Immunol.** Volume 373, 2014, pp 87-111.
- 7.-Love PE, Bhandoola A. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. **Nat Rev Immunol.** 2011 Jun 24;11(7):469-77
- 8.-Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, et al. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. **Blood.** 2010 Mar 11;115(10):1897-905.

- 9.-Lai JC, Wlodarska M, Liu DJ, et al. CD45 regulates migration, proliferation, and progression of double negative 1 thymocytes. **J Immunol.**2010 Aug 15;185(4):2059-70.
- 10.- Yui Ma, Feng N, Rothenberg. Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. **J Immunol.** 2010 Jul 1;185(1):284-93.
- 11.-Jiang Q, Coffield VM, Kondo M, et al. TSLP is involved in expansion of early thymocyte progenitors. **BMC Immunol.**2007 Jul 18;8:11.
- 12.-Yuan JS, Tan JB, Visan I, et al. Lunatic Fringe prolongs Delta/Notch-induced self-renewal of committed $\alpha\beta$ T-cell progenitors. **Blood.**2011 Jan 27;117(4):1184-95.
- 13.-Marino JH, Tan C, Taylor AA, et al. Differential IL-7 responses in developing human thymocytes. **Human Immunol.**2010 Apr;71(4):329-33.
- 14.-Gleimer M, von Boehmer H. Thymocyte selection: chemokine signaling is not only about the destination. **Curr Biol.**2010 Apr 13;20(7):R316-8.
- 15.- von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. **Nat Rev Immunol.**2005 Jul;5(7):571-7.
- 16.-González-García S, García-Peydró M, Alcain J., et al. Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia. **Curr Top Microbial Immunol.**2012;360:47-73.

- 17.-Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. **Nat Immunol.** 2010 Aug;11(8):666-73.
- 18.-Petrova G, Ferrante A, Gorski J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. **Crit Rev Immunol.** 2012;32(4):349-72.
- 19.-Biro J, Würch A, Potocnik AJ, et al. Regulation of T cell receptor (TCR) beta gene expression by CD3 complex signaling in immature thymocytes: implications for TCR beta allelic exclusion. **Proc Natl Acad Sci. USA.** 1999 Mar 30;96(7):3882-7.
- 20.-Glusman G, Rowen L, Lee I, et al. Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci. **Immunity.** 2001 Sep;15(3):337-49.
- 21.-Tillman RE, Wooley AL, Hughes MM, et al. Regulation of T-cell receptor beta-chain gene assembly by recombination signals: the beyond 12/23 restriction. **Immunol Rev.** 2004 Aug;200:36-43.
- 22.-Hale JS, Fink PJ. T-cell receptor revision: friend or foe? **Immunology** 2010 Apr;129(4):467-73.
- 23.-Kragel MS. Gene segment selection in V(D)J recombination accessibility and beyond. **Nat Immunol.** 2003 Jul;4(7):624-30.
- 24.-Kragel MS. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. **Curr Opin Immunol.** 2009 Apr;21(2):133-9.
- 25.-Berga-Bolaños R., Alberdi M., Buxadé M. et al. NFAT5 induction by the pre-T-cell receptor serves as a selective survival signal in T-lymphocyte development. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013 Oct 1;110(40):16091-6.

- 26.-**Mandal M, Crusio KM, Meng F, et al. Regulation of lymphocyte progenitor survival by the proapoptotic activities of Bim and Bid. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008 Dec 30;105(52):20840-5.
- 27.-**Murga C, Barber DF. Molecular mechanisms of pre-T cell receptor-induced survival. **J Biol Chem.** 2002 Oct 18;277(42):39156-62.
- 28.-**Hathcock KS, Farrington L, Ivanova I, et al. The requirement for pre-TCR during thymic differentiation enforces a developmental pause that is essential for V-Dj β rearrangement. **Plos One.**2011;6(6):e20639.
- 29.-**Zerrahn J, Volkman A, Coles MC, et al. Class I MHC molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999 Sep 28;96(20):11470-5.
- 30.-**Koble C, Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. **J Exp Med.**2009 Jul 6;206(7):1505-13.
- 31.-**Cole DK, Miles KM, Madura F, et al. T-cell receptor (TCR)-peptide specificity overrides affinity-enhancing TCR-major histocompatibility complex interactions. **J Biol Chem.**2014 Jan 10;289(2):628-38.
- 32.-**Dunbar J, Knapp B, Fuch A. Examining variable domain orientations in antigen receptors gives insight into TCR-like antibody design. **Plos Comput Biol.** 2014 Sep 18;10(9):e1003852.
- 33.-**Xiong Y, Bosselut R. CD4-CD8 differentiation in the thymus: connecting circuits and building memories. **Curr Opin Immunol.**2012 Apr;24(2):139-45.

- 34.-**Wang L, Bosselut R. CD4-CD8 lineages differentiation: Thpok-ing into the nucleus. **J Immunol.** 2009 Sep 1;183(5):2903-10.
- 35.-**Wang L, Xiong Y, Bosselut R. Maintaining CD4-CD8 lineage integrity in T cells: where plasticity serves versatility. **Semin Immunol.**2011 Oct;23(5):360-7.
- 36.-**Sakaguchi S, Hombauer M, Bilic I, et al. The zinc-finger proyein MAZR is part of the transcription factor network that controls the CD4 versus CD8 lineage fate of double-positive thymocytes. **Nat Immunol.** 2010 May;11(5):442-8.
- 37.-**Dzahagalov IL, Chen KG, Herzmark P, et al. Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. **Plos Biol.** 2013;11(5):e1001566.
- 38.-**Gray DH, Kupresanin F, Berzins SP, et al. The BH3-only proteins Bim and Puma cooperate to impose deletional tolerance of organ-specific antigens. **Immunity.** 2012 September 21; 37(3): 451–462.
- 39.-**Burger ML, Leung KK, Bennett MJ, et al. T cell specific inhibition of multiple apoptotic pathways blocks negative selection and causes autoimmunity. **Elife.**2014 Sep 2;3.
- 40.-**Melichar HJ, Ross JO, Herzmark P, et al. Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. **Sci Signal.** 2013 Oct 15;6(297):ra92.
- 41.-**Choudhuri K, Dustin ML. Signaling microdomains in T cells. **FEBS Lett.** 2010 Dec 15;584(24):4823-31.

- 42.-Shen S, Zhu M, Lau J. The essential role of LAT in thymocyte development during transition from the double-positive to single-positive stage. **J Immunol.** 2009 May 1;182(9):5596-604.
- 43.-Naramura M, Kole HK, Hu RJ, et al. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice.**Proc natl Acad Sci U S A.** 1998 Dec 22;95(26):15547-52.
- 44.-Chiang J, Hodes RJ. Cbl enforces Vav1 dependence and a restricted pathway of T cell development. **Plos One.** 2011 Apr 7;6(4):e18542.
- 45.-Würch A, Biro J, Fak I, et al. Reduced generation but efficient TCR beta-chain selection of CD4+8+ double-positive thymocytes in mice with compromised CD3 signaling. **J Immunol.** 1999 Mar 1;162(5):2741-7.
- 46.-Sugawara T, Moriguchi T, Nishida E, et al. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes.**Immunity.**1998 Oct;9(4):565-74.
- 47.-Ding C, Yang DD, Wysk M, et al. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. **Science.** 1998 Dec 11;282(5396):2092-5.
- 48.-Graham DB, Bell MP, Huntoon CJ, et al. CD28 ligation costimulates cell death but not maturation of double-positive thymocytes due to defective ERK MAPK signaling. **J Immunol.** 2006 Nov 1;177(9):6098-107.
- 49.-Teague TK, Tan C, Marino JH, et al. CD28 expression redefines thymocyte development during the pre-T to DP transition. **Int Immunol.** 2010 May;22(5):387-97.

- 50.-Heinly CS, Sempowski GD, Lee DM, et al. Comparison of thymocyte development and cytokine production in CD7-deficient, CD28-deficient and CD7/CD28 double-deficient mice. **Int Immunol**. 2001 Feb;13(2):157-66.
- 51.-Wang R, Xie H, Huang Z, et al. Transcription factor network regulating CD(+)CD8(+) thymocyte survival. **Crit Rev Immunol**. 2011;31(6):447-58.
- 52.-Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, et al. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. **Science**. 2000 Jun 30;288(5475):2369-73.
- 53.-von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **J Exp Med**. 1995 Apr 1;181(4):1519-26.
- 54.-Macchi P, Villa A, Gilliani S, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). **Nature**. 377, 65-68 (7) September 1995.
- 55.-Walsh ST. Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. **Immunol Rev**. 2012 Nov;250(1):303-16.
- 56.-Rochman Y, Spoiski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. **Nat Rev Immunol**. 2009 July; 9(7): 480.
- 57.-Calderón L, Boehm T. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011 May 3;108(18):7517-22.

- 58.-Hernández-López C, Varas A, Sacedón R, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. **Blood**. 2002 Jan 15;99(2):546-54.
- 59.-Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **J Leukoc Biol**. 2004 Jun;75(6):951-61.
- 60.-Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, et al. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines?. **Trends Immunol**. 2002 Jun;23(6):305-13.
- 61.-Ehrlich Li, oh DY, Weissman IL, et al. Differential contribution of chemotaxis and substrate restriction to segregation of immature and mature thymocytes. **Immunity**. 2009 Dec 18;31(6):986-98.
- 62.-Laan M, Kisand K, Kont V, et al. Autoimmune regulator deficiency results in decreased expression of CCR4 and CCR7 ligands and in delayed migration of CD4+ thymocytes. **J Immunol**. 2009 Dec 15;183(12):7682-91.
- 63.-Nitta T, Nitta S, Lei Y, et al. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Oct 6;106(40):17129-33.
- 64.-Sadok A, Marshall CJ. Rho GTPases: masters of cell migration. **Small GTPases**. 2014;5:e29710.
- 65.-Guo F, Zhang S, Tripathi P, et al. Distinct roles of Cdc42 in thymopoiesis and effector and memory T cell differentiation. **Plos One**. 2011 Mar 24;6(3):e18002.

- 66.-Pearse G. Histopathology of the thymus. **Toxicol Pathol.** 2006;34(5):515-47.
- 67.-Sijts EJ, Kloetzel PM. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. **Cell. Mol. Life Sci.** (2011) 68:1491–1502.
- 68.-Magalhães DA, Silveira EL, Junta CM, et al. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. **Clin Dev Immunol.** 2006 Jun-Dec;13(2-4):81-99.
- 69.-Gray D, Abramson J, Benoist C, et al. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. **J Exp Med.** 2007 Oct 29;204(11):2521-8.
- 70.-Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, et al. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. **Hum Mol Genet.** 2002 Feb 15;11(4):397-409.
- 71.-Li J, Park J, Foss D, et al. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. **J Exp. Med.** 2009 Mar 16;206(3):607-22.
- 72.-Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. **Semin Immunol.** 2005 Aug;17(4):304-12.
- 73.-Vremec D, Pooley J, Hochrein H, et al. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. **J Immunol.** 2000 Mar 15;164(6):2978-86.
- 74.-Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. **Springer Semin Immunopathol.** 2005 Jan;26(3):273-87.

75.-Okada T, Lian ZX, Naiki M, et al. Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol.** 2003 Apr;33(4):1012-9.

76.-Oderup C, LaJevic M, Butcher EC. Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance. **J Immunol.** 2013 Jun 15;190(12):6126-34.

77.-Park D, Han CZ, Elliott MR, et al. Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. **Nature.** 2011 Aug 21;477(7363):220-4.

78.-Allende ML, Dreier JL, Mandalas S, et al. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. **J Biol Chem.** 2004 Apr 9;279(15):15396-401.

79.-Weber C, Krueger A, Münk A, et al. Discontinued postnatal thymocyte development in sphingosine 1-phosphate-lyase-deficient mice. **J Immunol.** 2009 Oct 1;183(7):4292-301.

80.-Xu X, Ge Q. Maturation and migration of murine CD4 single positive thymocytes and thymic emigrants. **Comput Struct Biotechnol J.** 2014 Mar 30;9:e201403003.

81.-Berzins SP, Boyd RL, Miller JF. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. **J Exp Med.** 1998 Jun 1;187(11):1839-48.

82.-Boursalian TE, Golob J, Soper DM, et al. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. **Nat Immunol.** 2004 Apr;5(4):418-25.

- 83.-Houston EG Jr, Nechanitzky R, Fink PJ. Cutting edge: Contact with secondary lymphoid organs drives postthymic T cell maturation. **J Immunol.** 2008 Oct 15;181(8):5213-7.
- 84.-Hendricks DW, Fink PJ. Recent thymic emigrants are biased against the T-helper type 1 and toward the T-helper type 2 effector lineage. **Blood.** 2011 Jan 27;117(4):1239-49.
- 85.-Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. **Nat Rev Immunol.** 2011 Jul 22;11(8):544-9.
- 86.-Aw D, Silva AB, Maddick M, et al. Architectural changes in the thymus of aging mice. **Aging Cells.** 2008 Mar;7(2):158-67.
- 87.-Hale JS, Boursalian TE, Turk GL, et al. Thymic output in aged mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006 May 30;103(22):8447-52
- 88.-Aw D, Palmer DB. The origin and implication of thymic involution. **Aging Dis.** 2011 Oct;2(5):437-43.
- 89.-Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. **Proc Nutr Soc.** 2010 Nov;69(4):636-43.
- 90.-Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **Plos Pathog.** 2006 Jun;2(6):e62.
- 91.-de Meis J, Aurélio Farias-de-Oliveira D, et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. **J Parasitol Res.** 2012;2012:574020.

92.-Pedroza-Martins L, Boscardin WJ, Anisman-Posner DJ, et al. Impact of cytokines on replication in the thymus of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from infants. **J Virol.** 2002 Jul;76(14):6929-43.

93.-Cuervo-escobar S, Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, et al. T-cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Plos One.** 2014 Dec 23;9(12):e114584.

94.-Paterson RL, Kelleher CA, Streib JE, et al. Activation of human thymocytes after infection by EBV. **J Immunol.** 1995 Feb 1;154(3):1440-9.

95.-Leite de Moraes MD, Minoprio P, Dy M, et al. Endogenous IL-10 and IFN-gamma production controls thymic cell proliferation in mice acutely infected by *Trypanosoma cruzi*. **Scand J Immunol.** 1994 Jan;39(1):51-8.

96.-Gameiro J, Nagib PR, Andrade CF, et al. Changes in cell migration-related molecules expressed by thymic microenvironment during experimental *Plasmodium berghei* infection: consequences on thymocyte development. **Immunology.** 2010 Feb;129(2):248-56.

97.-Michailowsky V, Celes MR, Marino AP, et al. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 2004 Jul 1;173(1):463-70.

- 98.-Diaz M, Douek DC, Valdez H, et al. T cells containing T cell receptor excision circles are inversely related to HIV replication and are selectively and rapidly released into circulation with antiretroviral treatment. **AIDS**. 2003 May 23;17(8):1145-9.
- 99.-Nobrega C, Cardona PJ, Roque S, et al. The thymus as a target for mycobacterial infections. **Microbes Infect**. 2007 Nov-Dec;9(14-15):1521-9.
- 100.-Nobrega C, Roque S, Nunes-Alves C, et al. Dissemination of mycobacteria to the thymus renders newly generated T cells tolerant to the invading pathogen. **J Immunol**. 2010 Jan 1;184(1):351-8.
- 101.-Nobrega C, Nunes-Alves C, Cerqueira-Rodrigues B, et al. T cells home to the thymus and control infection. **J Immunol**. 2013 Feb 15;190(4):1646-58.
- 102.-Mendes-da-Cruz DA, de Meis J, Cotta-de-Almeida. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. **Microbes Infect**. 2003 Aug;5(10):825-32.
- 103.-Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells. **Nat Rev Microbiol**. 2008 Jan;6(1):53-66.
- 104.-Mittrücker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. **J Leukoc Biol**. 2000 Apr;67(4):457-63.
- 105.-Mittrücker HW, Köhler A, Kaufmann SH. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. **Infect Immun**. 2002 Jan;70(1):199-203.

106.-Bueno SM, González PA, Schwebach JR, et al. T cell immunity evasion by virulent *Salmonella enterica*. **Immunol Lett.** 2007 Jul 31;111(1):14-20.

107.-Clark L, Perrett CA, Malt L, et al. Differences in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strain invasiveness are associated with heterogeneity in SPI-1 gene expression. **Microbiology.** 2011 Jul;157(Pt 7):2072-83.

108.-Yrlid U, Svensson M, Johansson C, et al. *Salmonella* infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2000 Apr;27(4):313-20.

109.-Castro-Eguiluz D, Pelayo R, Rosales-García V., et al. B cell precursors are targets for *Salmonella* infection. **Microb Pathog.** 2009 Jul;47(1):52-6.

110.-Ross EA, Coughlan RE, Flores-Langarica A, et al. Thymic function is maintained during *Salmonella*-induced atrophy and recovery. **J Immunol.** 2012 Nov 1;189(9):4266-74.

111.-Deobagkar-Lele M, Chacko SK, Victor ES, et al. Interferon- γ - and glucocorticoid-mediated pathways synergize to enhance death of CD4(+) CD8(+) thymocytes during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. **Immunology.** 2013 Apr;138(4):307-21

112.-Deobagkar-Lele M, Victor ES, Nandi D.c-Jun NH2 -terminal kinase is a critical node in the death of CD4+ CD8+ thymocytes during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. **Eur J Immunol.** 2014 Jan;44(1):137-49.

- 113.**-Edelmann SL, Marconi P, Brocker T. Peripheral T cells re-enter the thymus and interfere with central tolerance induction. **J Immunol.** 2011 May 15;186(10):5612-9.
- 114.**-Matsiota-Bernard P, Hentati B, Pié S, et al. Beneficial effect of *Salmonella typhimurium* infection and of immunoglobulins from *S. typhimurium*-infected mice on the autoimmune disease of (NZB x NZW) F1 mice. **Clin Exp Immunol.** 1996 May;104(2):228-35.
- 115.**-Townes JM. Reactive arthritis after enteric infections in the United States: the problem of definition. **Clin Infect Dis.** 2010 Jan 15;50(2):247-54.
- 116.**-Messer JS, Murphy SF, Logsdon MF, et al. The Crohn's disease: associated ATG16L1 variant and *Salmonella* invasion. **BMJ Open.** 2013 Jun 20;3(6). pii: e002790.
- 117.**-Ajene AN, Fischer Walker CL, Black RE. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. **J Health Popul Nutr.** 2013 Sep;31(3):299-307.
- 118.**-Dudakov JA, Hanash AM, Jenq RR, et al. Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. **Science.** 2012 Apr 6;336(6077):91-5.
- 119.**-Bhandoola A, Artis D. Immunology. Rebuilding the thymus. **Science.** 2012 Apr 6;336(6077):40-1.
- 120.**-Gonzalez-Escobedo G, Gunn JS. Gallbladder epithelium as a niche for chronic *Salmonella* carriage. **Infect Immun.** 2013 Aug;81(8):2920-30.

121.-Monack DM. *Helicobacter* and *Salmonella* persistent infection strategies.
Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Dec 1;3(12):a010348.