

112011  
283

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
DIVISION DE POSGRADO E INVESTIGACION  
COORDINACION DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL  
FACULTAD DE MEDICINA

RESPUESTA INMUNE INTESTINAL Y SISTEMICA DE RATONES INMUNIZADOS  
CON *Salmonella typhimurium*

T E S I S

PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
( I N M U N O L O G I A )

QUE PRESENTA LA

M. EN C. ANA MARIA CASTRO

MEXICO, D.F. 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

RESUMEN.....	vii
INTRODUCCION.....	1
Fisiopatogenia.....	3
Vacunas.....	5
Factores de virulencia.....	8
Resistencia natural y adquirida.....	9
Vías de inmunización.....	19
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	23
MATERIAL Y METODOS	
Animales, microorganismos empleados.....	24
Determinación de la dosis letal media de la cepa F0 de <i>S. typhimurium</i> .....	25
Inmunización.....	25
Estudio de protección.....	26
Obtención de antígeno proteico de la cepa F1 <i>S. typhimurium</i> .....	27
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la cepa F1 de <i>S. typhimurium</i> .....	28
Electrotransferencia y preparación de antígeno proteico.....	29
Determinación de pesos moleculares.....	30
Obtención de suero y fluido intestinal.....	30
ELISA.....	31
Aislamiento de células de bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos.....	33
Transformación blastoide.....	34
Detección de subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos B en células de bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos.....	36
Análisis Estadístico.....	38

## RESULTADOS

Dosis letal media de la cepa F3 de <i>S. typhisurium</i> .....	39
Protección de ratones Balb/c.....	39
Detección de anticuerpos dos semanas.....	42
Detección de anticuerpos dieciocho semanas.....	43
Comparación de valores de anticuerpos entre grupo inmunizado en días consecutivos y grupo inmunizado semanalmente.....	46
Electroforesis de la cepa F1 de <i>S. typhisurium</i> .....	47
Transformación blastoide.....	48
Detección de subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos B.....	55
DISCUSION.....	63
ABSTRACT.....	77
REFERENCIAS.....	76

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1	Dosis letal media de la cepa F3 de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	40
FIGURA 1	Estudio de protección en ratones Balb/c.....	41
TABLA 2	Detección de anticuerpos séricos.....	44
TABLA 3	Detección de anticuerpos intestinales.....	45
FIGURA 2	Comparación de anticuerpos séricos entre grupo inmunizado en días consecutivos y grupo inmunizado semanalmente.....	47
FIGURA 3	Comparación de anticuerpos intestinales entre grupo inmunizado en días consecutivos y grupo inmunizado semanalmente.....	48
FIGURA 4	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la cepa F1 de <i>S. typhimurium</i> .....	50
TABLA 4	Estimulación mitogénica linfocitaria 2 semanas.....	51
TABLA 5	Estimulación mitogénica linfocitaria 18 semanas.....	52
TABLA 6	Estimulación antigénica linfocitaria 2 semanas.....	53
TABLA 7	Estimulación antigénica linfocitaria 18 semanas.....	54
FIGURA 5	Porcentaje de células con inmunoglobulinas de superficie, 5 días.....	59
FIGURA 6	Porcentaje de células con inmunoglobulinas de superficie, 18 días.....	60
FIGURA 7	Porcentaje de células con moléculas de superficie L3T4, Ly-2, 5 días.....	61
FIGURA 8	Porcentaje de células con moléculas de superficie L3T4, Ly-2, 18 días.....	62

## RESUMEN

### RESPUESTA INMUNE INTESTINAL Y SISTEMICA EN RATONES INMUNIZADOS CON *Salmonella typhimurium*.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de diferentes esquemas de inmunización con *Salmonella typhimurium* sobre la respuesta inmune intestinal y sistémica, y evaluar la relación entre la respuesta inmune local y/o sistémica con la protección generada. Para este propósito se inmunizaron grupos de ratones Balb/c con 2, 3 ó 4 dosis semanales de *S. typhimurium* viva por vía oral o inactivada por calor por vía parenteral en cojinete plantar, mientras que otro grupo se inmunizó por tres días consecutivos oralmente. Se realizaron estudios de protección con *S. typhimurium* virulenta dos y dieciocho semanas después de la última inmunización. Se evaluó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) la producción de anticuerpos séricos e intestinales. Se obtuvieron células de bazo, placas de Peyer (PP) y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) del grupo que recibió 4 dosis semanales de bacterias para analizar la respuesta inmune celular, y la distribución de subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos B por el método de inmunoperoxidasa.

Se encontró una dosis letal 50 (DL50) de  $2.6 \times 10^3$  bacterias. El grupo más protegido fue el que recibió 4 dosis semanales de bacterias por vía oral, observándose un 80% de sobrevivida a las dos semanas y un 37% de sobrevivida a las 18 semanas. Se encontró una correlación entre los niveles de anticuerpos séricos e intestinales con el número de dosis de bacterias administradas. El intervalo entre dosis afectó considerablemente la respuesta humoral tanto en suero como en intestino. El grupo inmunizado en días consecutivos en relación al grupo inmunizado semanalmente mostró a las dos semanas un incremento de anticuerpos séricos tipo IgA e IgM y anticuerpos intestinales tipo IgA e IgG ( $p < 0.05$ ). Este grupo presentó una marcada disminución en los tres isotipos a las dieciocho semanas en relación con el grupo inmunizado semanalmente ( $p < 0.05$ ). No se encontró relación entre los niveles de anticuerpos de los tres isotipos y protección. Se cultivaron células de bazo, PP y NLM y se estimularon con mitógenos como concavalina A y lipolisacárido de *Escherichia coli*, así como con antígenos particulados de *S. typhimurium* con pesos moleculares de 42-45, 50-53 y 64-68 kDa. Los resultados mostraron que las tres fracciones fueron capaces de estimular la respuesta proliferativa específica de células provenientes de animales inmunizados con bacterias vivas. La única fracción que produjo estimulación de células provenientes de animales inmunizados con bacterias muertas fue la de 64-68 kDa. Tanto la inmunización oral como la parenteral produjeron un aumento en el porcentaje de células con marcador de superficie de linfocitos B (IgG, IgA, IgM) así como de linfocitos T (L3T4, Ly-2).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la vía de inmunización, la dosis de antígeno y el esquema de inmunización empleado afectan considerablemente la respuesta inmune humoral y celular tanto a nivel intestinal como sistémico, así como la sobrevivida al desafío con bacterias virulentas en el modelo experimental utilizado.

## INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es una enfermedad infectocontagiosa causada por la bacteria *Salmonella typhi*. Louis en 1829 (1) diferenci6 la fiebre tifoidea de otras enfermedades febriles, asociando la infecci6n cl6nica con lesiones en el intestino. Budd en 1873 (2) report6 que la naturaleza infecciosa de esta enfermedad estaba relacionada con la ingesta de agua contaminada, y que la fuente del agente infeccioso eran las heces humanas.

Eberth en 1880 (3) identific6 en ganglios mesent6ricos y bazo de individuos muertos por esta afecci6n, al agente causal de la fiebre tifoidea. Graffkey en 1884 (3) logr6 cultivar a partir de muestras de individuos enfermos al bacilo, en medios artificiales. Un a6o despu6s Salmor y Smith (4) aislaron *Salmonella cholerae-suis* de cerdos con infecci6n intestinal, semejante al c6lera, y en 1888 Gaertner (3) cultiv6 una salmonela, proveniente de heces de un enfermo sin tifoidea, a la que denomin6 *Salmonella enteritidis*. Este descubrimiento fue seguido por el aislamiento y descripci6n de un gran n6mero de microorganismos pertenecientes a este genero. El aislamiento de bacterias estrechamente relacionadas y provenientes de diversas fuentes, cre6 confusi6n. En el a6o de 1887 Smith y Stewart (4) establecieron "que estos microorganismos pertenec6an a un gran grupo (o especies) por la identificaci6n de su morfolog6a y caracter6sticas bioqu6micas". Schults (4) en 1921 hizo el primer intento de clasificar a las salmonelas en varios serotipos. Sin

embargo esto no fue posible hasta que apareció el trabajo de White en 1935 (4), el cual consideró importantes los descubrimientos sobre variación antigénica para diferenciar a estas bacterias, creando así las bases para la clasificación seriológica de *Salmonella*. Este trabajo fue confirmado por Kauffman (4), quien posteriormente lo modificó y amplió para dar lugar a la clasificación seriológica de Kauffman y White, basada en la presencia de antígenos de superficie celular, como son el lipopolisacárido (LPS) o antígeno "O" y las proteínas flagelares o antígenos "H". A través de esta clasificación se ha permitido la aceptación de una gran cantidad de serotipos, dentro del género *Salmonella*. En 1968 (5) se habían reportado más de 2,200 serotipos diferentes.

Ewing y col. (4) clasificaron al género *Salmonella* en tres especies: *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis* y *Salmonella enteritidis*, el resto de las especies reconocidas por Kauffman y White fueron consideradas como variedades de la especie. Le Minor y col. (6,7) clasificaron a *Salmonella* en siete grupos por hibridación de DNA cromosómico denominándolos subgrupos o subespecies.

Recientemente Beltrán y col. (5) han utilizado el método de electroforesis enzimática multilocus para estudiar las relaciones genéticas de 527 aislamientos de ocho serotipos de *Salmonella*. El estudio reveló que la población natural de *Salmonella* era básicamente clonal, y que para seis de los serotipos, la mayoría de los aislados eran miembros de una sola clona.

## Fisiopatogenia

*Salmonella typhi*, es una enterobacteria gram negativa, que ingresa al organismo generalmente por ingestión de alimentos y bebidas contaminadas con heces humanas. Es el agente causal de la fiebre tifoidea y afecta sólo al humano y al chimpancé (8,9).

*Salmonella*, al igual que otras enterobacterias, como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Shigella*, es transportada del lumen intestinal a los folículos linfoides a través de las células M (10). *Salmonella typhi* invade las placas de Peyer (PP) y pasa a los nódulos linfáticos mesentericos (NLM). De ahí las bacterias alcanzan el torrente circulatorio, a través del cual, la bacteria alcanza órganos del sistema reticuloendotelial, como médula ósea, bazo, e hígado, en los cuales se multiplica y de donde puede regresar a circulación (11).

Hasta la década de los 70, se atribuían la mayoría de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad a la presencia de endotoxina circulante. El grupo de Hornick, y col. (12) sugirieron que las manifestaciones clínicas de fiebre tifoidea no eran causadas por endotoxina circulante, dado que, en trabajos realizados en pacientes tifoídicos de Vietnam, no se había detectado la presencia de LPS en plasma. Consideraron, por tanto, que la endotoxina participaba en la patogénesis de la fiebre tifoidea aumentando la respuesta inflamatoria en el sitio donde se localizaba y multiplicaba *S. typhi*.

En un estudio de 392 pacientes con fiebre tifoidea, Hoffman en 1980 (13) formuló la siguiente hipótesis: la mayor parte de

las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea estaban causadas por metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres y otros mediadores liberados por células mononucleares, (principalmente por macrófagos). Un apoyo a esta hipótesis se encontró al reducir dramáticamente la mortalidad por fiebre tifoidea en pacientes tratados con antibióticos más dexametasona.

La fiebre es el síntoma principal de la fiebre tifoidea, la enfermedad se manifiesta durante los primeros 3 a 8 días, por elevaciones de 39 a 40°C acompañada de bradicardia, dolor de cabeza intenso, náusea, vómito, anorexia, dolor abdominal, tos, mialgias, malestar general y muy ocasionalmente diarrea. En este caso las heces pueden contener moco y sangre. Entre las complicaciones más frecuentes de la fiebre tifoidea se ha descrito hemorragia intestinal, inflamación del hígado y perforación intestinal (14).

La enfermedad puede durar de 3 a 4 semanas, si no se administra el tratamiento antimicrobiano específico. Los síntomas desaparecen lentamente, siempre que no haya complicaciones. Es común que la fiebre dure hasta la segunda o tercera semana, y que luego disminuya lentamente. Se cuenta para su tratamiento con varios agentes antimicrobianos efectivos, como el cloramfenicol, la ampicilina y ciertas cefalosporinas (15). Sin embargo aún cuando esta enfermedad se trate con el fármaco adecuado, la convalecencia sin complicaciones produce una incapacidad en la actividad del paciente de, por lo menos, tres semanas (16).

Estudios epidemiológicos realizados entre 1980 y 1987 en

México muestran una incidencia anual de fiebre tifoidea entre 0.01 y 0.02%. Estos datos fueron obtenidos de población que acudió a clínicas y hospitales institucionales (17) y de población afiliada al Instituto Mexicano del Seguro Social (18).

### Vacunas

Una estrategia para la prevención de la fiebre tifoidea es la vacunación de hospederos susceptibles. Con esta finalidad se han probado diferentes inmunógenos en modelos animales para luego determinar su capacidad protectora en el humano.

Los primeros trabajos de inmunización contra fiebre tifoidea en humanos se realizaron en el año de 1896 por Wright (19) en Inglaterra y por Pfeiffer y Kolle (20) en Alemania. Ambos grupos lograron vacunas obtenidas de *Salmonella typhi* inactivada por calor y conservadas en fenol. Pfeiffer y Kolle (10) demostraron que la administración de anticuerpos específicos contra *S. typhi* a cobayos los protegía de la infección experimental. Años después Durham, Gruber y Widal (12), cada uno en forma independiente, reportaron que al mezclarse *S. typhi* con el suero de enfermos tifoídicos en fase convaleciente, se observaban grandes grumos y pérdida de la movilidad de las bacterias. Estas observaciones dieron origen a una prueba serológica para la detección de fiebre tifoidea.

En 1916 se comenzó a usar una vacuna combinada contra tifoidea-paratifoidea (TAB), la cual causaba reacciones más severas, tanto generalizadas como en el sitio de inoculación.

resultando poco aceptable. En 1911 Besredka (11) propuso inducir protección contra fiebre tifoidea por la vía oral y en 1920 el mismo autor administró la vacuna tifoídica por vía oral. Esta vacuna fue aplicada en muchos países, se intentaba sustituir con ella a la vacuna parenteral. Una de las razones por la cual se discontinuó la aplicación de este producto fue la baja protección que ofrecía, debido a una pobre producción de anticuerpos.

En 1934 Felix y Pitt (21,22,23), descubrieron el antígeno "Vi", considerado por estos autores como un factor de virulencia de *S. typhi* y como el principal factor inmunizante. Felix y col. prepararon una vacuna a partir de este antígeno, la cual se probó en humanos, dando como resultado una pobre protección. Con la finalidad de conservar el antígeno "Vi", en 1937 Felix (21) propuso la inactivación de *Salmonella* con acetona. Landy y col. (24,25), demostraron que una vacuna preparada con *S. typhi* inactivada por acetona inducía protección significativa superior a la generada por la vacuna preparada con salmonela muerta por calor y conservada en fenol.

Bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (25,26) se realizaron en 1960 pruebas de campo en diversos países para probar la eficacia de la vacuna parenteral. La preparación de dos vacunas de *S. typhi* estuvo a cargo del Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS, obteniéndose una vacuna inactivada por acetona (vacuna K) y una vacuna inactivada por calor-fenol (vacuna L). Ambas fueron preparadas a partir de la cepa de *Salmonella typhi* Ty2. La vacuna K confirmó

protección en un 79-93%, mientras que la vacuna L mostró una eficacia de 81-87%. En 1954 la OMS (17) reportó que en 40 países se preparaba la vacuna inactivada por calor fenoí y que sólo en tres países se producía vacuna liofilizada e inactivada por acetona. Sin embargo, debido a los efectos colaterales que ocasionaban estas vacunas, se discontinuó su uso, excepto en Tailandia, donde se continúa aplicando, como parte de programas de control de fiebre tifoidea.

Con el objeto de obtener una mayor protección, así como menos efectos colaterales, en los últimos años se han probado varias vacunas orales a partir de cepas atenuadas de *S. typhi* (Ty21a) y vacunas parenterales preparadas a partir de antígeno ví de *S. typhi*.

La vacuna oral Ty21a se obtuvo por mutación con nitrosoguanosina de una cepa silvestre de *S. typhi*. El mecanismo exacto de esta atenuación se desconoce. Se sabe que la mutación en Ty21a incluye: 1) una mutación *galE* que causa un bloqueo en la enzima uridin difosfato (UDP)-galactosa-4-epimerasa, dando lugar a una síntesis incompleta del LPS; 2) una mutación *vfa*, la cual impide que la bacteria sintetice el polisacárido capsular; 3) mutaciones que producen un crecimiento lento; 4) mutaciones que causan requerimiento de valina e isoleucina, y 5) mutaciones que incapacitan Ty21a para producir H<sub>2</sub>S (28). La vacuna se probó en escolares en Alejandría, Egipto y en Santiago de Chile, dando una protección de 96% y 69%, respectivamente, con mínimos efectos colaterales (29).

En los 1980s, Robbins y Robbins (30), apoyados en los trabajos de Felix y col. (21,22,23), prepararon una vacuna a partir del antígeno capsular vi. Se han probado dos lotes de esta vacuna, uno hecho por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos, y otro preparado por el Instituto Merieux, en Lyon, Francia. Se evaluaron tanto protección como efectos colaterales inducidos por dichos lotes. Ambas vacunas indujeron niveles significativos de anticuerpos anti-vi en 90% de los receptores. La preparación del NIH contenía un 5% de LPS y causó algunos efectos colaterales, tanto locales como sistémicos; mientras que la preparada en Francia sólo contenía un 0.2% de LPS y no produjo efectos colaterales (31). Esta vacuna se ha probado también en Nepal (32) y Sud-Africa (33). Resultados preliminares en Nepal reportan un 72% de protección 17 meses después de la vacunación.

### Factores de virulencia

El proceso por el cual *S. typhimurium* produce daño en el hospedero es complejo y poco conocido. Estudios recientes reportan que los genes que codifican para factores de virulencia en este microorganismo se encuentran en plásmidos. Estos factores incluyen, la resistencia al suero, que permite a cepas de *S. typhimurium*, sobrevivir a la acción del complemento (34). Fields y col. (35) indentificaron un gen en *S. typhimurium*, asociado a la virulencia y a la capacidad de esta bacteria para sobrevivir dentro de macrófagos. Demostraron que este gen tiene un papel

importante en la resistencia a defensinas (péptidos microbianos que se encuentran en neutrófilos y macrófagos), lo cual capacita a las bacterias para sobrevivir dentro de células fagocíticas. Alpuche-Aranda y col. (36) recientemente reportaron, que el gen *pag* es esencial para que salmonela pueda sobrevivir dentro de los macrófagos. Por medio de un ensayo de inmunofluorescencia, estos autores detectaron que *S. typhimurium* inhibe la fusión fagosoma-lisosoma, lo que permite a *Salmonella* sobrevivir y multiplicarse dentro del fagocito. En estudios *in vitro* con macrófagos murinos Weinstein y col. (37) demostraron que bacterias flageladas sobreviven dentro de fagocitos más tiempo que bacterias no flageladas, lo cual indica que estos organelos protegían a las bacterias de muerte intracelular o que facilitaban su capacidad de multiplicación, por lo que se ha considerado que los flagelos constituyen también un factor de virulencia. Recientemente Schmit y col. (38) produjeron una cepa de *S. typhimurium* virulenta a partir de la cepa atenuada ST39, no flagelada que poseía una deleción cromosomal de 3.5 Kb. Al complementar la mutación con un plásmido PMH71 que contiene DNA de *S. typhimurium*, la deleción revirtió y permitió que la bacteria adquiriera nuevamente su virulencia.

### Resistencia Natural y Adquirida

Se acepta que la salmonelosis murina es una enfermedad análoga a la fiebre tifoidea en el humano. Este modelo se ha utilizado para probar tanto protección conferida por diferentes

preparaciones inmunizantes, como para analizar la respuesta inmunológica inducida por dichas vacunas. El modelo más ampliamente aceptado es el ratón infectado con su patógeno natural *Salmonella typhimurium*. A pesar de que la respuesta inmunológica en esta enfermedad murina ha sido objeto de numerosos estudios, no se ha llegado a un acuerdo con respecto a la importancia de la respuesta inmune celular y/o humoral en la protección de animales infectados o vacunados con esta bacteria.

Algunos grupos consideran que *Salmonella typhimurium* es un parásito intracelular y que al igual que *Mycobacterium tuberculosis* o *Brucella* (39,40), la respuesta inmune celular es la responsable de proteger al hospedero contra la infección. Mackanes, Blanden y Collins (40,41) han seguido el curso de infecciones por *Salmonella* en el ratón, utilizando varias vacunas y han demostrado la presencia de bacterias en homogenados de hígado y de bazo después de infección intravenosa (iv) con bacterias virulentas, así como la capacidad bactericida del suero de ratones inmunizados con *S. typhimurium*. Los autores han informado que ratones vacunados con *S. typhimurium* muerta por calor, no muestran protección ante un desafío intravenoso con bacterias virulentas; mientras que ratones que sobreviven a la infección con *Salmonella* virulenta, se protegen al reto intravenoso. El suero obtenido de ratones inmunizados no protegió a ratones normales ante el reto por vía intravenosa con la *Salmonella* virulenta. cultivos de sangre, hígado y bazo, mostraron que los animales eliminaron la *Salmonella* de sangre.

pero no controlaron el crecimiento bacteriano en hígado y bazo. También investigaron las propiedades microbicidas de macrófagos provenientes de ratones inmunizados y no inmunizados. Los macrófagos de ratones inmunizados con la *Salmonella* viva destruyeron en un tiempo de 15 minutos un 97% de bacterias, mientras que macrófagos de ratones no inmunizados eliminaron en 30 minutos el 57.7% de la *Salmonella*. Posteriormente Collins (42) ha inmunizado ratones con *S. enteritidis* muerta por calor, así como con *S. gallinarum* viva, utilizando varias vías de inmunización y retando a los animales con *S. enteritidis* viva y opsonizada. Reporta que el porcentaje de sobrevivencia en los ratones vacunados con la bacteria muerta, dependió de la vía de inmunización, pero en ningún caso se eliminó de bazo o hígado a la bacteria usada en el desafío, mientras que ratones inmunizados con *S. gallinarum* viva mostraron cultivos de bazo e hígado negativos.

La participación de células fagocíticas en la infección por *Salmonella* se comprobó al mostrar que macrófagos peritoneales provenientes de ratones inmunizados con *S. enteritidis* viva inhibían la multiplicación intracelular de la bacteria, en tanto que macrófagos de ratones inmunizados con bacterias muertas permitieron la multiplicación de *Salmonella* (43). Macrófagos de ratones inmunizados con *S. enteritidis* viva transferidos a ratones normales, conservaron su capacidad antibacteriana (44).

En 1971 Mackaness (45,46) propuso, que los linfocitos T imunes reconocían antígenos de *Listeria monocitogenes* y producían

linfocinas que activaban a los macrófagos y los dotaban de una capacidad bactericida, la cual podía expresarse contra diferentes bacterias intracelulares. Posteriormente inmunizó ratones con *S. typhimurium*, transfirió células de bazo a ratones normales, y demostró la presencia de inmunidad dirigida contra *S. typhimurium*; los ratones que recibieron células de bazo sin linfocitos T no fueron capaces de desarrollar inmunidad anti-*Salmonella*.

Estos trabajos apoyan la tesis de que la inmunidad celular juega un papel más importante que la inmunidad humoral en la expresión de una respuesta antibacteriana efectiva contra la infección por *Salmonella*.

En contraste con la literatura anteriormente citada, numerosos reportes demuestran que la respuesta inmune mediada por anticuerpos es la responsable de proteger al individuo contra una infección por salmonela y que las vacunas de bacterias muertas son capaces de inducir inmunidad anti-*Salmonella* efectiva. Jenkin y col. (47) inmunizaron ratones con bacterias inactivadas por calor, inactivadas con acetona, o con alcohol, así como con bacterias vivas atenuadas y mostraron que una sola inoculación de células muertas por alcohol o por acetona era capaz de inducir una buena protección al desafiar a los animales con la bacteria viva, mientras que ratones inmunizados con salmonela inactivada por calor, no mostraron protección. Herzberg y col. (48) investigaron la protección en ratones inmunizados con bacterias muertas por calor y con un extracto obtenido por el

método de deoxicolato a partir de células vivas. Ambas vacunas administradas por vía intraperitoneal (IP), indujeron un 100% de protección en ratones desafiados con 100 DL50 por vía IP o por vía intravenosa (IV). Ornellas y col. (49) administraron por vía intraperitoneal varias dosis de bacterias muertas por calor, con intervalo de siete días entre una y otra, posteriormente desafiaron por vía IP a los ratones con 10,000 DL50, y obtuvieron una buena protección.

Otra evidencia que apoya la importancia de la respuesta inmune humoral en la infección con *S. typhimurium* esta dada por el trabajo de Hochadel y col. (50) quienes inmunizaron ratones en el cojinete plantar con esta bacteria y transfirieron poblaciones de linfocitos B, o de linfocitos T de bazo a ratones normales. Cuatro días después desafiaron por vía IP con *S. typhimurium* virulenta, a los ratones normales encontrando una sobrevivencia de 21% de los animales que recibieron linfocitos T y de un 65% en los que recibieron linfocitos B. Sólo el grupo que recibió linfocitos B mostró el hemocultivo negativo, sin embargo la bacteria estuvo presente en cultivos de hígado y bazo de este grupo. Estos resultados muestran que si bien la respuesta humoral no logra eliminar a la bacteria, si juega un papel importante en el control de la infección en estadios tempranos.

Numerosos grupos de investigadores han utilizado fracciones de bacterias para inducir una respuesta inmune protectora; entre ellos Augerman y col. (51) prepararon una vacuna a partir de ribosomas bacterianos y compararon su eficacia con la de otras

vacunas elaboradas con salmonelas muertas por acetona y extractos de lipopolisacárido bacteriano. Todas las vacunas se prepararon con *Salmonella typhimurium* y se administraron a ratones por vía intraperitoneal. Los resultados obtenidos mostraron que tanto la vacuna de bacterias inactivadas con acetona, como la preparada con ribosomas, mostraron una protección de 100 y 90%, respectivamente, ante un desafío IP de 1000 DL50. En contraste, la preparación con LPS mostró una protección significativamente menor que las anteriores. Posteriormente los mismos autores (51) observaron que los ratones que recibieron 250 µg de bacterias inactivadas por acetona por vía IP tuvieron mayor protección que ratones inmunizados por vía intravenosa, al desafiar ambos grupos con 1000 DL50 de bacterias vivas. Molinari y col. (52) prepararon una vacuna ribosomal de *S. typhimurium* y comprobaron su eficacia en ratones. Al comparar la potencia de la preparación ribosomal de *S. typhi* Ty2, con la de una vacuna de referencia de bacterias muertas por calor y conservada en fenol, encontraron que el grado de protección inducido por la vacuna ribosomal era significativamente mayor que el encontrado con la vacuna de referencia (53).

Kiefer y col. (54) postularon que el antígeno somático de *Salmonella* participaba de manera importante en la protección contra la enfermedad. Para probar su hipótesis construyeron bacterias híbridas de *E. coli*, que expresaban antígeno somático de *Salmonella*. Las vacunas de estas bacterias, vivas o muertas, protegieron a ratones ante un desafío con una *Salmonella* que

presentaba el mismo antígeno somático utilizado en la vacuna. La bacteria viva mostró, sin embargo, mejor protección.

Kussi y col. (55) purificaron proteínas de membrana externa de *S. typhimurium* denominadas porinas e inmunizaron ratones obteniendo un alto grado de protección contra organismos virulentos. Las preparaciones de porinas contenían cantidades pequeñas de LPS y de lipoproteínas. Dos años después los mismos autores reportaron que porinas purificadas de contaminantes, perdían su capacidad de protección (56). Isibasi y col. (57) inmunizaron ratones por vía intraperitoneal con proteínas de membrana externa (OMPs) de *S. typhi* con un contenido aproximado de 4% de LPS. Una dosis de 30 µg de OMPs confirió protección al 100% ante el desafío intraperitoneal con 1000 DL50 de *S. typhi*, y de un 30% contra desafío con 500 DL50 de *S. typhimurium*.

Dado que unos grupos reportan protección substancial en ratones inmunizados con bacterias inactivadas o con vacunas acelulares, mientras que otros grupos han mostrado poca o nula protección utilizando bacterias inactivadas en ratones, se consideró que las contradicciones acerca de la importancia de la respuesta inmune humoral o celular en la protección contra *S. typhimurium*, podía deberse, en parte, a la cepa de ratón utilizada. Eiseinstein y col. (58) infectaron intraperitonealmente con *S. typhimurium* viva, diferentes cepas de ratones y encontraron variaciones en el grado de sensibilidad a la infección, evaluada por DL50. La dosis letal media para ratones C3H/HeJ fue mayor que 7 bacterias, para C3HeB/FeJ mayor

que 2 bacterias, para C3H/HeNCrIBR que de  $1.2 \times 10^3$  bacterias, para C3H/BeMA de  $2.1 \times 10^3$  bacterias, para C3H/HeDub 59 bacterias, para C3H/HeTex 55 bacterias y para CD-1  $1 \times 10^4$  bacterias. Eisenstein y col. (59) transfirieron suero inmune tanto a ratones sensibles como a ratones resistentes a la infección por *S. typhimurium*, encontrando que sólo los ratones resistentes se protegían ante el desafío con bacterias virulentas. Se puede considerar por lo tanto que ratones susceptibles a la infección por *S. typhimurium* requieren tanto de inmunidad humoral como celular para resolver la infección, mientras que ratones resistentes solo requieren de inmunidad humoral.

Por otro lado, Tagliabue y col. (60,61) encontraron que la cooperación entre anticuerpos y linrocitos T, mediante una respuesta de células citotóxicas dependiente de anticuerpos (ADCC), jugaba un papel importante en la infección tifóidica tanto en el humano como en el ratón. La respuesta en humanos estaba mediada por linfocitos CD4<sup>+</sup> armados con IgA (60); mientras que en el ratón estaba mediada por células asesinas naturales (NK) y por macrófagos (61,62,63). Trabajando con un modelo murino infectado con *S. typhimurium*, Tagliabue y col. observaron que tanto las células de tejido linfoide asociado a intestino (GALT), como las de órganos linfoides periféricos, tenían actividad antibacteriana natural. La actividad antibacteriana se incrementó al agregar anticuerpos contra *S. typhimurium*, al cultivo de células linfoides particularmente en células de bazo, en sangre periférica y en epitelio intestinal.

En bazo la actividad antibacteriana se conservó al eliminar poblaciones de linfocitos T, y disminuyó significativamente al eliminar la población de células asialo GM1, con receptor fc. Estas células efectoras contra *S. typhimurium* mostraban algunas características similares a las de células asesinas (K) (61). Tagliabue y col. obtuvieron también células de bazo y de timo de ratones, las cultivaron *in vitro* y utilizaron como células blanco *Shigella* X16, opsonizadas con IgA. Los resultados mostraron que los linfocitos murinos GALT fueron capaces de ejercer actividad antibacteriana natural contra *Shigella* y que la IgA incrementaba en forma significativa la actividad antibacteriana de los linfocitos del GALT. Reportaron también que en placas de Peyer (PP) las células efectoras poseían el fenotipo Thy 1.2-, parcialmente asialo GM-1, similar al de células K (62). En 1984 los mismos autores reportaron que tanto IgA como IgG participaban en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, eliminando bacterias enteropatógenas como *S. typhimurium*, *S. typhisalmonellae* o *Shigella* X16. Encontraron dos poblaciones de células efectoras, macrófagos y linfocitos Thy 1.2- en bazo, las cuales ejercían ADCC dependiente de IgA, mientras que en tejido linfóide asociado a intestino sólo células linfoides presentaban esta actividad (63).

En el modelo murino se ha reportado que la susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* está relacionada con la presencia de varios genes, entre ellos los del complejo mayor de histocompatibilidad, el Xid y el Ity. Plant y col. (64)

reportaron la presencia del gen *Ity* localizado en el cromosoma 1 del ratón, representado por los alelos susceptible (*Ity<sup>s</sup>*) y resistente (*Ity<sup>r</sup>*) (65), los cuales controlaban el crecimiento inicial de la salmonela en bazo e hígado de ratón (66,67). R ratones homocigotos para el alelo *Ity<sup>s</sup>* fueron incapaces de controlar la replicación de la bacteria, y generalmente morían en etapas tempranas de la infección, mientras que en ratones *Ity<sup>r</sup>* su sistema reticuloendotelial era capaz de controlar el crecimiento bacteriano. Tal parece que los macrófagos juegan un papel importante en esta etapa de la infección, ya que se ha reportado al fagocito como la célula efectora que expresa el gen *Ity* (68). Un defecto en el gen *Xid* hace a los ratones más susceptibles a infección por *Salmonella*, los ratones CBA/N tienen un defecto inmune ligado al gen X, el cual está asociado con la ausencia de una población de linfocitos B maduros, o al desarrollo tardío de estas células (69). Recientemente O'Brien y col. (70) reportaron que la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* en el modelo murino estaba relacionada con la presencia de ciertos genes detectados en ratones C3H/HeJ, los cuales son altamente susceptibles a infección por bajas dosis de *S. typhimurium* virulenta. Estos ratones son también hiporespondedores a los efectos biológicos de la endotoxina, lo cual se debe a la expresión de un alelo designado *LPS<sup>d</sup>*, localizado en el cromosoma 4 del ratón (71). O'Brien y col. (72) demostraron que el gen que regula la susceptibilidad a *Salmonella* en ratones C3H/HeJ y el alelo *LPS<sup>d</sup>* que confería hiporeactividad a la endotoxina, eran el

mismo.

### Vías de Inmunización

Numerosos estudios indican que la vía de inmunización puede ser un factor importante para la inducción de respuesta inmune a nivel secretor o sistémico. Cebra y col. (73) afirman que las vacunas que contienen antígenos "vivos" generan mejor inmunidad en las superficies mucosas, a diferencia de vacunas constituidas por "antígenos no replicativos", con excepción de la vacuna del cólera. Collins (74) inmunizó y desafió ratones con *S. enteritidis* por vía intravenosa, intraperitoneal y subcutánea y encontró que el porcentaje de sobrevivencia en los ratones vacunados con el organismo muerto variaba considerablemente, dependiendo de la vía de inmunización. Svennerholm y col. (75), inmunizaron ratones con toxina de cólera (TC), tanto por vía oral como por vía intravenosa y demostraron que la inmunización oral, parenteral o una combinación de ambas era capaz de inducir una buena protección, así como una estimulación efectiva de la síntesis de IgA intestinal. Encontraron además que en la estimulación de células inmunocompetentes del intestino, la dosis de antígeno era más importante que la ruta de administración. Por otro lado, Pierce y col. (76) determinaron que la inmunización parenteral seguida por un desafío intraintestinal, era más efectiva para generar células productoras de antitoxina en el intestino delgado de ratas, que un régimen de inmunizaciones directo al intestino. Stanley y col. (77) inmunizaron ratones por

vía subcutánea con toxoide del cólera. Tres semanas después retaron por vía ileal a los animales con toxina de cólera, encontrando niveles bajos de IgA en fluido intestinal, así como una pobre protección. Esta supresión de la respuesta inmune intestinal inducida por inmunización sistémica, sugiere que la inmunización subcutánea genera una protección intestinal deficiente. Keren y col. (78) examinaron el efecto de la inmunización parenteral con *Shigella flexneri* en la respuesta inmune intestinal de conejos, y demostraron que la inmunización parenteral primaria con la bacteria sin adyuvante inducía una respuesta local baja de IgA, mientras que la misma preparación generaba una respuesta vigorosa de IgG en suero. Detectaron también en los conejos inmunizados parenteralmente una respuesta de IgG local, semejante a la respuesta obtenida en animales inmunizados por vía oral. Al administrarles por vía parenteral dosis subsecuentes de la misma bacteria no lograron sin embargo producir una respuesta de memoria a nivel de mucosa intestinal. André y col. (79) inmunizaron ratones Balb/c con 4 dosis de eritrocitos de caballo (HRBC) por vía intragástrica en días consecutivos, para posteriormente desafiarlos con HRBC por vía intraperitoneal, encontrando una respuesta inmune sérica disminuída, así como una tolerancia inmunológica detectada *in vivo* e *in vitro*. Pierce (80) encontró que factores como la edad, el número de dosis y el intervalo entre cada dosis, eran determinantes en la inducción de una respuesta inmunológica. A través de la inmunización de ratas de diferentes edades por

diferentes rutas con toxina del cólera, encontró que la toxina administrada intraduodenalmente era más efectiva para generar respuesta en ratones jóvenes que en ratones viejos. La aplicación de dosis repetidas evocó una respuesta vigorosa de anticuerpos específicos a nivel de mucosa, la cual declinó lentamente. La toxina aplicada intraperitonealmente indujo una respuesta rápida a nivel de mucosa, la cual disminuyó también rápidamente. El desafío intraperitoneal después de un estímulo entérico fue más efectivo que cuando la toxina se administró por vía subcutánea. Sin embargo, la respuesta no se indujo o fue muy breve ante una segunda dosis intraperitoneal. Por otro lado, Dunkley y col. (81) propusieron que la vía de inmunización jugaba un papel importante en la cooperación entre linfocitos T y B y analizaron la distribución de células ayudadoras antígeno-específicas en GALT, conducto torácico y nódulos linfáticos periféricos, encontrando que la inmunización directa en las placas Peyer inducía una buena respuesta de IgA, IgM e IgG, una respuesta menos intensa en NLM y una respuesta prácticamente nula en nódulos linfáticos periféricos (NLP). A diferencia de lo anterior, la inmunización subcutánea estimuló significativamente una respuesta de ayuda en NLP para todos los isotipos, con una respuesta baja o ausente en PP y NLM. Se puede considerar, por lo tanto, que la inmunización local en tejido mucoso es una ruta más efectiva para generar ayuda en GALT, mientras que la inmunización sistémica genera respuesta preferentemente a nivel sistémico.

El grado de desacuerdo entre los diferentes grupos que

investigan la participación de la respuesta inmunológica en la infección por *S. typhimurium*, puede deberse, en gran medida, a que cada grupo maneja diferentes antígenos (salmonela viva, muerta por calor, acetona, alcohol; fracciones celulares como porinas, ribosomas, antígeno "O", entre otros), diferentes vías de inmunización (intraperitoneal, intravenosa, intragástrica); diferentes dosis de salmonela (1,2,3, o más, con cantidades variables del microorganismo); así como diferentes cepas de ratones.

Con base en lo antes mencionado, se diseñó un estudio de respuesta inmune utilizando una cepa de ratón y su patógeno natural *S. typhimurium*, manejando diferentes variables: vía de inmunización (intragástrica y parenteral), antígenos (salmonela viva y salmonela muerta), así como diferentes esquemas de inmunización, lo cual pudiera dar un mejor entendimiento de la respuesta inmunológica del ratón frente a este patógeno.

## HIPOTESIS

La inmunización intragástrica con *S. typhimurium* viva es capaz de inducir una respuesta inmunológica superior, tanto a nivel local como sistémico, y una mejor protección ante un desafío con *S. typhimurium* virulenta.

## OBJETIVO

1) Estudiar el efecto de diferentes esquemas de inmunización con *S. typhimurium*, sobre la respuesta inmune intestinal y sistémica, así como la protección de estos esquemas contra desafío con bacterias administradas por vía oral. 2) Determinar la correlación entre protección y respuesta inmune generada a nivel local y/o sistémico, posterior a inmunización por vía oral o parenteral con *S. typhimurium*.

## MATERIAL Y METODOS

### Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas, provenientes de una colonia mantenida en el bioterio de la Facultad de Medicina. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico con astilla, agua esteril y purina *at libitum*.

### Microorganismos empleados

Se utilizaron dos cepas de *Salmonella typhimurium* serogrupo B, causantes de gastroenteritis en niños, aisladas en el Hospital Infantil de México, S.S. y donadas por el Dr. Leoncio Filloy. Se probó su virulencia en ratones Balb/c, aplicando por vía intragástrica, diluciones crecientes por arriba de  $10^2$  bacterias en 0.1 ml de solución salina isotónica (SSI). Se denominó F1 a la cepa de *S. typhimurium* que permitió que sobrevivieran siete de diez ratones infectados con  $1 \times 10^{12}$  bacterias. Dosis entre  $10^7$  y  $10^8$  se seleccionaron como dosis inmunizantes debido a su capacidad de inducir una buena respuesta inmunológica y no causar daño en el animal. La otra cepa de *S. typhimurium* virulenta para el ratón DL50  $2.6 \times 10^3$ , se le denominó F3. Esta *Salmonella* resistente a la ampicilina se obtuvo por conjugación de las cepas de *Escherichia coli* JM 1452-PC4252 y F3 de *S. typhimurium*. El plásmido no modificó la virulencia de *S. typhimurium*.

Para determinar la DL50, se formaron grupos de diez ratones cada uno, distribuidos de acuerdo a su peso, administrándoles por

vía intragástrica diferentes dosis de *S. typhimurium* viva. Se observaron durante 30 días posteriores a la infección. Se registró el número de ratones muertos de cada grupo, y se les extrajo hígado y bazo, sembrando posteriormente en agar soya tripticaseína adicionado con 50 mg de ampicilina. La DL50 se determinó por el método de Reed y Muench (32).

Las cepas de *Salmonella* F1 y F3 se caracterizaron por métodos bioquímicos y serológicos (4).

Antes de iniciar el estudio se descartó la presencia de *Salmonella typhimurium* en heces de los ratones normales por medio de coprocultivos (4).

#### Inmunización

Para los ensayos de vacunación se formaron grupos de 10 ratones de 6 a 8 semanas, los cuales se inmunizaron con *S. typhimurium* F1 administrando 2, 3 ó 4 dosis de la bacteria con un intervalo de una semana. Los animales se inmunizaron por vía oral o parenteral. Otro grupo se inmunizó por vía oral con 3 dosis de *Salmonella* administrada en días consecutivos. Se incluyó un grupo control sin inmunizar.

Inmunización oral: Se realizó administrando *S. typhimurium* (F1) viva por vía intragástrica mediante cánula de plástico. La dosis utilizada fue de  $1 \times 10^7$  bacterias en 0.1 ml de SSI.

La *Salmonella* se cultivó inicialmente en agar soya tripticaseína a 37°C 18 horas (Bioxon de México). Se tomó una colonia para sembrarla en 10 ml de caldo soya tripticaseína

(Bioxon de México), el cual se incubó durante 18 horas a 37°C. De este cultivo se sembraron 0.5 ml en 50 ml del mismo medio y se incubó con agitación a 150 rpm a 37°C por 3 horas.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación durante 30 min a 600 x g a 4°C. El paquete bacteriano se resuspendió en SSI y se ajustó a  $1 \times 10^8$  células/ml, a una densidad óptica de 560 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss PQ-M11. Esta dilución se confirmó por cultivo en agar de soya tripticaseína.

Immunización parenteral: Se realizó mediante inoculación de *Salmonella typhimurium* (F1) muerta por calor (equivalente a  $1 \times 10^7$  bacterias/0.05 ml de SSI) en el cojinete plantar del ratón.

La cepa F1 de *Salmonella* se cultivó y procesó de la misma manera que para la inmunización oral, sólo que en este caso la bacteria se inactivó por calor húmedo a 121°C durante 20 minutos. Se comprobó su esterilidad sembrando por duplicado en AST.

### Estudio de Protección

Se utilizaron animales inmunizados como se describió previamente, después de un lapso de 2 o 18 semanas de aplicarse la última dosis de inmunización. Para estos estudios las bacterias se cultivaron y procesaron de la forma ya descrita para obtener la vacuna oral. La dosis de reto fue de 150 DL<sub>50</sub> de *S. typhimurium* F3 viva, resuspendida en 0.1 ml de SSI administrada por vía intragástrica. Los animales se observaron durante 30 días posteriores al desafío, se registró diariamente el número de animales muertos, de los cuales se extrajeron hígado, bazo, y se

hicieron cultivos en agar soya tripticaseína, así como en agar soya tripticaseína adicionado con 50 mg de ampicilina.

#### Obtención de Antígenos

Antígeno de *Salmonella typhimurium* El completa: La bacteria se creció como se describió para la inmunización parenteral; se resuspendió en 5 ml de amortiguador de carbonatos 0.2 M, pH 4.5, y posteriormente se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml. De esta suspensión se colocaron 0.05 ml por pozo de tiras de microtitulación (Immunolon II, Dinotech Laboratories Inc. Alexandria VA, USA).

Antígeno Protéico de *Salmonella typhimurium*: Este antígeno se obtuvo mediante el método de Tato y col. (53). Se sembró una colonia de *S. typhimurium* en 10 ml de CST, y se incubó 18 horas a 37°C. Se transfirió 1 ml de este cultivo a un matraz que contenía 300 ml del mismo caldo y se incubó nuevamente durante 18 horas a 37°C. De este cultivo se sembraron 6 litros de CST, distribuyéndose 100 ml de cultivo por cada dos litros de medio, antes de incubarse 3 horas a 37°C con agitación a 150 rpm.

Se cosechó el paquete celular por centrifugación a 7,000 x g a 4°C durante 20 minutos. Las bacterias se resuspendieron en SSI estéril y se centrifugaron nuevamente. El paquete bacteriano se resuspendió en 30 ml de acetona fría (previamente deshidratada con cloruro de calcio anhidro) manteniéndose en agitación a 50 rpm durante 10 min. La suspensión bacteriana se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas. Se desechó el

sobrenadante y se le agregó al sedimento el mismo volumen de acetona descrito. Este paso se repitió dos veces. El sedimento se pasó a una caja de Petri se dispersó y se dejó secar durante 24 horas a 4°C; posteriormente se guardó en un desecador.

Al producto así obtenido se le denominó polvo acetónico (53). Para su uso el total del polvo acetónico se disolvió en 30 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, conteniendo cloruro de magnesio 0.012 M, sacarosa 0.25 M, desoxicolato de sodio 0.4%, cloruro de potasio 0.1 M y desoxirribonucleasa I (Sigma Chemical St. Louis Mo), (20 µg por ml) y se incubó con agitación a 37°C durante 1 hora en baño María. Posteriormente se dializó durante 5 días contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH de 7.2, con cambios cada 12 horas.

El material dializado se centrifugó a 14,000 x g a 4°C durante 15 min, se esterilizó el sobrenadante por filtración con una membrana de 0.22 µm y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (83) guardándose en congelación a -20°C hasta su uso.

#### **Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS**

Se realizó un corrimiento electroforético para el antígeno protéico de *S. typhimurium* Fl, según la técnica de Laemmli (84). Se utilizó un gel concentrador al 3.5%, y un gel separador al 11%, ambos se polimerizaron con persulfato de amonio y TEMED (todos los reactivos utilizados fueron de Bio-Rad Lab.). Las

muestras de antígenos se resuspendieron vol/vol en una mezcla de Tris-HCl 0.05 M pH 6.8, SDS al 10%, glicerol al 10%, EDTA 0.001 mg, mercaptoetanol al 1% y azul de bromofenol; la concentración de antígeno fue de 80 µg/carril. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares altos (Pharmacia AB Uppsala, Sweden), los cuales se resuspendieron y utilizaron de acuerdo a las especificaciones del productor. El gel conteniendo las muestras del antígeno y de los marcadores de pesos moleculares se colocó en una cámara de electroforesis (LKB Bromma, Co.) en presencia de un amortiguador de Tris 0.02 M, glicina 0.152 M y SDS al 0.1%. El corrimiento se realizó a 15 mA para el gel al 3.5% y a 30 mA para el gel al 11%.

### **Electrotransferencia y Preparación del Antígeno Particulado**

Una vez separados por electroforesis los antígenos según el método ya descrito, se procedió a transferir las proteínas a nitrocelulosa de 0.45 µm, según el método de Towbin (85).

Al término de la transferencia, se tiñó la nitrocelulosa de manera reversible con amido negro al 0.01% y ácido acético al 0.5%, (Bio-Rad Richmond Calif, USA). Se identificaron y cortaron 3 fracciones con pesos moleculares de 68, 53 y 45 kDa, las cuales, en un estudio previo (86) habían inducido una respuesta proliferativa en animales inmunizados con *S. typhimurium* por vía oral. Las fracciones se lavaron exhaustivamente con agua y PBS 0.01 M, pH 7.4 según la técnica de Lamb y col. (87) y se colocaron en viales de vidrio a los que se les agregaron 250 µl

de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co.) por cada 20 mm<sup>2</sup> de papel. La preparación se incubó 60 min a temperatura ambiente para asegurar la disolución completa del papel y su esterilidad. Transcurido este tiempo se procedió a precipitar el papel disuelto, agregando a cada vial un volumen igual al utilizado de DMSO, de solución amortiguadora de carbonatos 0.05M, pH 9.6. El precipitado obtenido se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 8,000 x g durante 3 min; el botón obtenido se lavó tres veces con RPMI-1640 (Gibco CO.), se resuspendió en el mismo medio (1 ml de medio por cada 250 µl de DMSO o solución amortiguadora utilizada) y se almacenó hasta su uso a -20°C.

#### **Determinación de Pesos Moleculares**

La determinación de pesos moleculares, se realizó mediante el método de Weber y Osborn (88). En base a marcadores de peso molecular conocido, se calculó la distancia de migración de cada banda entre la distancia total de migración (Rf), posteriormente se graficó el logaritmo del peso molecular vs Rf, el valor del antilogaritmo determinó el peso molecular de cada fracción (89).

#### **Obtención de Suero y Fluído Intestinal**

Transcurridas 2 y 18 semanas posteriores a la última inoculación se obtuvieron suero y fluído intestinal de cada lote de ratones, tanto inmunizados como controles. Los animales se sangraron bajo anestesia con éter, por punción retroorbital. Se separó por centrifugación el suero del paquete celular y se

guardó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A estos ratones se les extrajo el intestino delgado y se lavó con 1 ml de solución balanceada de fosfatos (PBS) pH 7.2. Las muestras se procesaron según el método de Elson y col. (90) con algunas modificaciones. El fluido intestinal se centrifugó a  $600 \times g/20 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante se pasó a otro tubo y se le agregó 0.1 ml de solución inhibidora de tripsina (Sigma, Chemical Company St. Louis Mo. USA) (1 mg/ml), 0.01 ml de sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 50 mM (Sigma Chemical Co.) y 0.01 ml de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 100 mM (Sigma), disuelto en etanol al 90%. Se centrifugó nuevamente, y se decantó el sobrenadante agregándose 0.01 ml de PMSF. Todo este procedimiento se realizó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las preparaciones obtenidas se colocaron a temperatura ambiente y se les agregó albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) a una concentración final de 0.5%, después de 15 min se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)**

Se empleó una modificación de la técnica descrita por Ortiz y col. (91). Para la prueba se recubrieron los pozos de las tiras de microtitulación (Immunolon II, Dynatech Laboratories Inc. Alexandria VA, USA), con 0.05 ml de amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6, conteniendo  $30 \mu\text{g/ml}$  de antígeno protéico o el equivalente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias/ml de bacterias muertas por calor. Las tiras se colocaron durante 24 horas en un desecador con vacío a temperatura ambiente. Al

momento de usarse las placas se rehidrataron con una solución balanceada de fosfatos (PBS) 0.02 M, pH 7.2, conteniendo 0.5% de Tween 20 (Sigma) y 0.5% de BSA (Sigma), se lavaron dos veces con PBS + Tween 20. Posteriormente se añadió una solución de PBS + BSA al 3%, y se incubaron toda la noche a 4°C, con el fin de bloquear los sitios no cubiertos con antígeno. Las tiras se lavaron y se les agregó 0.05 ml de la dilución adecuada de suero o de fluido intestinal sin diluir por pozo, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavaron y se les agregó 0.05 ml de anticuerpos peroxidados (Cappel, Malven, PA, USA) por pozo dirigidos contra la fracción Fc de la IgG, IgA e IgM de ratón. Las tiras se incubaron nuevamente durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron y se les agregó como sustrato 0.05 ml de una solución que contenía 10 ml de amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.5 más 10 mg de o-fenilendiamina (Sigma) y 0.004 ml de una solución al 30% de peróxido de hidrógeno. La reacción se bloqueó 5 min después con 0.2 ml de una solución 1 M de ácido sulfúrico e inmediatamente después se registraron las lecturas en un lector de ELISA minireader 11 (Dynatech) a una densidad óptica de 490nm. Todas las incubaciones se hicieron en agitación a 90 rpm en un agitador American Rotor M-4140.

Para determinar las diluciones óptimas del suero de los animales que se utilizaron en el ELISA, se realizó un estudio previo utilizando muestras de animales inmunizados. Se hicieron diluciones seriadas del suero y se graficó el inverso de la dilución contra los valores de absorvancia para cada muestra. Se

escogieron diluciones que correspondían a la parte lineal de la curva 1:50 para anticuerpos IgA e IgM y 1:1000 para IgG.

Los resultados se expresaron como el promedio de las lecturas de DO, en los grupos experimentales  $\pm$  el error estándar. Al promedio de cada grupo experimental se le restó previamente el valor del promedio más una desviación estándar del grupo control.

### Aislamiento de Células

1. Células de Placas de Peyer.- Se extrajo el intestino de ratones sacrificados por dislocación cervical y se colocó en una caja de Petri estéril conteniendo 10 ml de solución balanceada de sales (SBS) adicionada con estreptomina 100  $\mu$ g/ml, penicilina 100 u/ml, gentamicina 50  $\mu$ g/ml y HEPES 25 mM, pH 7.4, teniendo cuidado de mantener los extremos sujetos a pinzas hemostáticas fuera de la caja. Las placas de Peyer se disecaron y disgregaron con dos agujas hipodérmicas estériles en SBS. La suspensión celular se colocó en un tubo con fondo cónico estéril (Costar Cambridge MA, USA), el cual se mantuvo en baño de hielo durante 15 min con el objeto de dejar sedimentar los restos tisulares de las placas. El sobrenadante se centrifugó a 200 x g/10 min a 4°C y se lavó dos veces con SBS en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 3 ml RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, USA) y se determinó el número de células viables por el método de exclusión con azul tripano.

2. Células de Nódulos Linfáticos Mesentéricos.- Los

nódulos mesentéricos se liberaron de vasos sanguíneos, grasa y serosa peritoneal, se disgregaron con forceps de disección sobre una malla de acero inoxidable, en una caja de Petri con SBS a 4°C. La suspensión de células se incubó durante 10 min a 4°C y se centrifugó a 200 x g/10 min a 4°C. El botón celular se lavó dos veces con SBS y se resuspendió en 5 ml RPMI-1640.

3. Células de Bazo.- Se extrajo el bazo y se colocó en una caja de Petri con 10 ml de SBS, con esta solución se infiltró el bazo para obtener una suspensión de células linfoides. La suspensión se procesó en las mismas condiciones a las descritas para las células de placas de Peyer y nódulos linfáticos.

#### Transformación Blastóide

Se utilizaron animales inmunizados con 4 dosis de *S. typhimurium* administradas por vía oral o parenteral y animales controles. Se sacrificaron 2 y 18 semanas después de la última inmunización, obteniéndose células de bazo, nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer. Las células se suspendieron en RPMI-1640 adicionado con 1% de piruvato de sodio 100 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, 0.5% de aminoácidos esenciales, 1% de L-glutamina 200 mM, 1% de penicilina-estreptomicina, gentamicina 50 µg/ml, 10% de suero fetal bovino y 1% de hepes 25 mM. Para los cultivos con células de placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos se agregó al RPMI 2-mercaptoetanol 50 µM (todos los reactivos anteriores fueron Gibco). Las células se distribuyeron en una caja de cultivo de 96 pozos (Costar) a una concentración

de  $2.5 \times 10^5$  células en 0.2 ml de medio, a cada pozo se le agregó 20  $\mu$ l de la suspensión de antígeno fraccionado o los mitógenos Concanavalina A (ConA) (2  $\mu$ g/ml), (Sigma), o lipopolisacárido de *E. coli* (100  $\mu$ g/ml), (Sigma). Las pruebas se hicieron por triplicado.

Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda (CO<sub>2</sub> Incubator, Napco Co.) por tres días en el caso de los mitógenos o por siete días en el caso de los antígenos. Cuando se estimularon con antígeno, los cultivos permanecieron los primeros tres días con una inclinación de 45° (para facilitar el contacto celular con el antígeno) y los otros cuatro días en forma horizontal. Durante las últimas 16 horas se añadió al cultivo 0.1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-Timidina (NEN Research Prod.) por pozo. Se cosecharon los cultivos (Cell Harvester Brandel) en filtros de fibra de vidrio (Whatman, 934-AH) y se midió la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina en viales con líquido de centelleo, en un contador PLD TRI-CARB (Packard Instruments Co.). Los experimentos se realizaron en tres ocasiones con una mezcla de células de cinco ratones.

## Determinación de Antígenos de Superficie en Células Linfoides Mediante la Técnica de Inmunoperoxidasa

La caracterización de linfocitos con inmunoglobulinas de superficie del isotipo IgG, IgA e IgM, se llevó a cabo por medio de anticuerpos de conejo anti-ratón peroxidados (Cappel) dirigidos contra la cadena pesada de estas inmunoglobulinas. Para la identificación de linfocitos T se utilizaron anticuerpos anti-Lyt 2.2 y L3T4 de rata anti-ratón biotinilados (PharMingen, San Diego, CA, USA).

Se obtuvieron células de bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos en la forma antes mencionada, se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml y de cada suspensión celular, se depositaron sobre un portaobjetos tres muestras de 30  $\mu$ l cada una, se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron con formalina al 4% y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para detectar los antígenos de superficie de las poblaciones de linfocitos, se utilizó el método de la inmunoperoxidasa (92), con algunas modificaciones. Las laminillas se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min y después se lavaron con PBS. Para remover la peroxidasa endógena las laminillas se sumergieron en una solución de metanol-peróxido de hidrógeno (97 y 3 ml respectivamente), durante 45 min, y se lavaron 4 veces con PBS. Para la identificación de inmunoglobulinas de superficie, las laminillas se incubaron con anticuerpos peroxidados (anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA) durante

90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 min en cámara húmeda a temperatura ambiente con una solución de diaminobenzidina (3,3',4,4'-Tetraaminobiofenil) (Sigma), 0.5 mg/ml en Tris-Hcl 0.05M, pH 7.6 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mg/ml de solución) (Merck-México, S.A.), se lavaron con PBS y se contrastaron 5 min con hematoxilina amarilla (Merck), se lavaron con agua corriente, se decoloraron 30 seg, con alcohol ácido (100 ml de etanol al 70% más 1 ml de ácido clorhídrico concentrado), se lavaron con agua corriente y se colocaron 2 min en una solución de carbonato de litio al 1%. Se lavaron con agua corriente, y se deshidrataron 2 min colocando las laminillas en cada uno de los siguientes reactivos: etanol al 70%, 90%, 96%, etanol absoluto, etanol-xilol 50%-50%, y en xilol 4 min. Posteriormente se incluyeron en resina sintética (Sigma). Las laminillas se observaron por microscopía óptica, contando 200 células por preparación. Para la identificación de linfocitos T se siguió el procedimiento anterior, pero después de incubar con los anticuerpos biotinilados se incubó con avidina peroxidasa (Zimed California USA) a una concentración de 80 µg/ml. Se lavaron con PBS antes de agregar el sustrato (Diaminobencidina-agua oxigenada) durante 30 min; posteriormente las laminillas se procesaron como se describió anteriormente.

### Análisis Estadístico

Para comparar los niveles de anticuerpos entre los diferentes grupos, así como para los estudios de transformación blastoide se utilizó la prueba de Fisher (88) para determinar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos. Para estimar la significancia de la diferencia entre las medias, se aplicó la prueba de t de Student, cuando las varianzas fueron homogéneas y la U de Mann Whitney, cuando las varianzas no fueron homogéneas. Para comparar los valores obtenidos en los estudios de marcadores de superficie se utilizó la prueba de ji-cuadrada.

## RESULTADOS

Las cepas de *Salmonella* F1 y F3 dieron las reacciones bioquímicas típicas de la especie *typhimurium*. El perfil antigénico fue: O4,12: i:1,2. La cepa F3 conservó su capacidad de crecer en AST con ampicilina a una concentración de 50 mg/ml.

El cultivo de heces en los ratones normales, reportó ausencia de *S. typhimurium*, así como un predominio de *Escherichia coli*, y la presencia en menor proporción de otras enterobacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter*, entre otros.

La dosis letal media de *S. typhimurium* F3 fue de  $2.6 \times 10^3$  (Tabla 1). Se aisló la cepa F3 de *S. typhimurium* de cultivos de bazo e hígado de los ratones muertos.

### Estudio de protección

Los diferentes grupos de ratones inmunizados con *Salmonella* F1 se desafiaron por vía ig con 150 DL50 de la cepa F3 de *S. typhimurium* 2 y 18 semanas posteriores a la última dosis de inmunización, y se observaron durante un lapso de 30 días posteriores al reto. De los ratones muertos se aisló la cepa F3 de *S. typhimurium*.

Los resultados se muestran en la figura 1, donde se puede observar que el mayor porcentaje de sobrevivencia se presentó en los animales que recibieron la *Salmonella* por vía oral, tanto a las dos como a las 18 semanas. Cabe mencionar que el grupo inmunizado

Tabla 1

DL<sub>50</sub> de *Salmonella typhimurium* cepa F3 en ratones Balb/c

CANTIDAD BACTERIAS	RELACION MUERTES	No. DE MUERTOS	SOBREVI-VIENTES	VALORES ACUMULADOS			
				TOTAL MUERTOS	TOTAL VIVOS	RELACION DE MORTALIDAD	% DE MORTALIDAD
10 <sup>7</sup>	10/10	10	0	40	0	40/40	100
10 <sup>6</sup>	10/10	10	0	30	0	30/30	100
10 <sup>5</sup>	10/10	10	0	20	0	20/20	100
10 <sup>4</sup>	4/10	4	6	10	6	10/16	62
10 <sup>3</sup>	4/10	4	6	6	12	6/18	33
10 <sup>2</sup>	2/10	2	8	2	20	2/22	9

DL<sub>50</sub> = 2.8x10<sup>3</sup> bacterias, determinada por el método de Reed y Muench

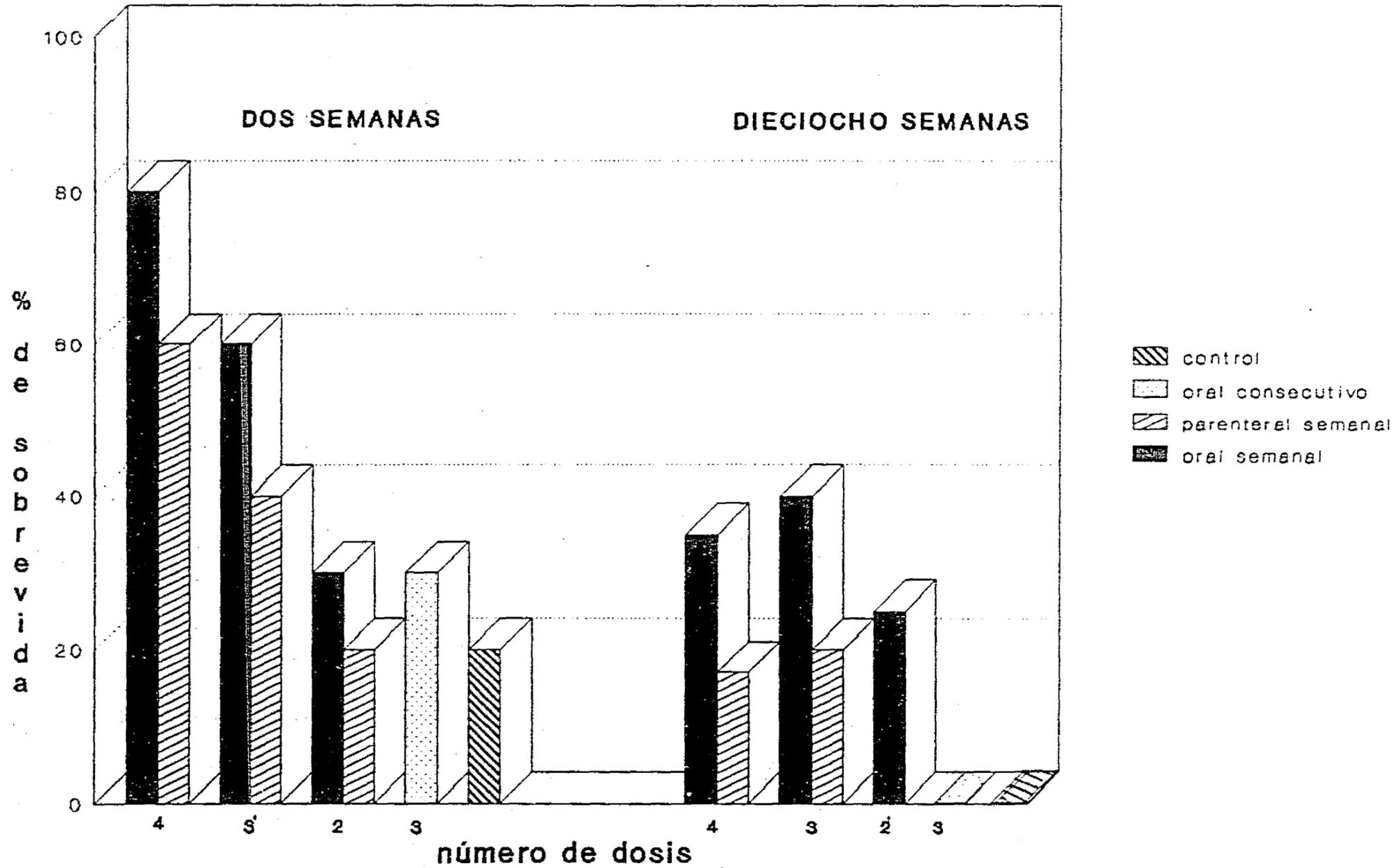


Figura 1. Porcentaje de sobrevivida en ratones Balb/c desafiados con 150  $DL_{50}$  de la cepa F3 de *S. typhimurium* 2 y 18 semanas posteriores a la última inmunización

en días consecutivos, mostró un porcentaje de sobrevida a las 2 semanas 50% menor que el grupo inmunizado semanalmente, mientras que a las 18 semanas se comportó igual que el grupo control.

#### Respuesta de anticuerpos a las dos semanas

La tabla 2 presenta los valores de anticuerpos séricos de ratones inmunizados por vía oral o parenteral con *S. typhimurium*, detectados por ELISA dos semanas posteriores a la última inmunización. Se observa que los niveles de anticuerpos de clase IgG, IgA e IgM, estuvieron relacionados con el número de dosis recibidas. Existe en general, una relación directa entre número de dosis de salmonela y el nivel de anticuerpos.

Respecto a la vía de inmunización, los valores de anticuerpos IgG fueron similares en los grupos inmunizados con 2 ó 3 dosis por vía oral y por vía parenteral. En los grupos que recibieron 4 dosis, los valores de anticuerpos IgG fueron significativamente más elevados en el grupo inmunizado por vía parenteral ( $p \leq 0.05$ ). Todos los grupos inmunizados por vía oral tuvieron valores de anticuerpos IgM mayores que los inmunizados por vía parenteral ( $p \leq 0.05$ ). Sólomente el grupo inmunizado con dos dosis orales tuvo niveles de IgA significativamente mayores que el grupo parenteral ( $p \leq 0.05$ ).

En el contenido intestinal (Tabla 3) se observó que los niveles de anticuerpos estuvieron más elevados en ratones que recibieron *S. typhimurium* por vía oral. El análisis estadístico reportó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), sólo en el grupo que

recibió 4 dosis para IgG, y en los grupos que recibieron 2 y 3 dosis para la IgA e IgM. A este tiempo los valores de IgG en fluido intestinal fueron más altos en ratones inmunizados por vía oral, y en general superiores a los valores de IgA.

#### Respuesta de anticuerpos a las 18 semanas

La tabla 2 muestra los valores de anticuerpos séricos de ratones inmunizados por vía oral o parenteral con *S. typhimurium* dieciocho semanas después de la última inmunización. Se observa que los diferentes grupos de ratones presentan las tres clases de anticuerpos en suero. Los valores de IgG, IgA e IgM, fueron significativamente superiores en animales que se inmunizaron por vía oral respecto a los inmunizados por vía parenteral ( $p \leq 0.005$ ). El anticuerpo predominante en suero fue del isotipo IgG. Se pudo observar que en todos los grupos de ratones los valores de anticuerpos se encontraron en relación directa con el número de dosis recibidas.

En el fluido intestinal (Tabla 3) los valores de anticuerpos IgA e IgM se encontraron significativamente más elevados ( $p \leq 0.05$ ) en ratones inmunizados por vía oral con 2 ó 3 dosis. Sin embargo en los grupos inmunizados con 4 dosis los niveles de anticuerpos para los 3 isotipos fueron similares para los animales inmunizados por vía oral o parenteral. En contraste a lo observado a las 2 semanas, en este caso el isotipo predominante en los grupos inmunizados por vía oral fue IgA.

**Tabla 2. Anticuerpos séricos contra *S. typhimurium* producidos por ratones Balb/c 2 y 18 semanas posteriores a la última inmunización**

No. de Inm.	Vía de Inm.	DOS SEMANAS			DIECIOCHO SEMANAS		
		dil. suero IgG* 1:1000	IgA* 1:50	IgM* 1:50	IgG* 1:1000	IgA* 1:50	IgM* 1:50
2	oral	0.440 ± 0.023	0.055 ± 0.003	0.098 ± 0.003	0.261 ± 0.012	0.00	0.056 ± 0.005
	paren-teral	0.410 ± 0.008	0.010 ± 0.006 &	0.019 ± 0.003 &	0.184 ± 0.023 &	0.00	0.021 ± 0.005 &
3	oral	0.497 ± 0.035	0.045 ± 0.003	0.100 ± 0.001	1.485 ± 0.024	0.035 ± 0.017	0.117 ± 0.020
	paren-teral	0.520 ± 0.035	0.035 ± 0.005	0.050 ± 0.029 ^	0.571 ± 0.036 &	0.00 ^	0.077 ± 0.001 ^
4	oral	0.510 ± 0.017	0.140 ± 0.029	0.193 ± 0.017	1.262 ± 0.032	0.153 ± 0.003	0.165 ± 0.011
	paren-teral	0.680 ± 0.008 &	0.105 ± 0.009	0.143 ± 0.002 ^	0.926 ± 0.031 &	0.070 ± 0.008 &	0.145 ± 0.012

Los valores representan el promedio de las lecturas de anticuerpos a una DO de 490 nm ± el error estandar de tres experimentos

\* Detectados por el método de ELISA, usando por antígeno *S. typhimurium* F1 inactivada por calor.

& O vs P p < 0.05 por t de Student

^ O vs P p < 0.05 por U de Mann Withney

**Tabla 3. Anticuerpos intestinales contra *S. typhimurium* producidos por ratones Balb/c 2 y 18 semanas posteriores a la última inmunización**

No. de Inm.	Vía de Inm.	DOS SEMANAS			DIECIOCHO SEMANAS		
		IgG *	IgA *	IgM *	IgG *	IgA *	IgM *
2	oral	0.178 ± 0.035	0.085 ± 0.038	0.090 ± 0.017	0.135 ± 0.018	0.200 ± 0.014	0.020 ± 0.006
	paren-teral	0.153 ± 0.029	0.008 ± 0.008 ^	0.00 ^	0.133 ± 0.031	0.123 ± 0.018 &	0.00 ^
3	oral	0.297 ± 0.054	0.344 ± 0.022	0.088 ± 0.011	0.300 ± 0.038	0.480 ± 0.049	0.077 ± 0.010
	paren-teral	0.231 ± 0.027	0.184 ± 0.042 &	0.035 ± 0.010 &	0.138 ± 0.038 &	0.132 ± 0.018 &	0.032 ± 0.004 &
4	oral	0.548 ± 0.052	0.229 ± 0.031	0.085 ± 0.001	0.160 ± 0.020	0.485 ± 0.038	0.099 ± 0.012
	paren-teral	0.310 ± 0.035 &	0.178 ± 0.034	0.088 ± 0.003	0.200 ± 0.038	0.490 ± 0.014	0.099 ± 0.024

Los valores representan el promedio de las lecturas de anticuerpos a una DO de 490 nm ± el error estandar de tres experimentos

- \* Detectados por el método de ELISA, usando por antígeno *S. typhimurium* F1 inactivada por calor.
- & O vs P p < 0.05 por t de Student
- ^ O vs P p < 0.05 por U de Mann Withney

## Comparación entre los grupos inmunizados con tres dosis orales a diferentes intervalos de tiempo

Para investigar si el intervalo entre dosis de bacterias administradas por vía oral podía influir en el isotipo y/o los niveles de anticuerpos, se decidió comparar los resultados del grupo que recibió tres dosis por vía intragástrica (una por semana) con el grupo al que se le administraron 3 dosis de *S. typhimurium* por vía intragástrica en días consecutivos (Figs. 2 y 3).

1. Respuesta de anticuerpos a las dos semanas.- La administración de  $1 \times 10^7$  bacterias de la cepa F1 en días consecutivos indujo un marcado incremento en anticuerpos de los tres isotipos de inmunoglobulinas séricas, siendo éstos significativamente más altos ( $p \leq 0.05$ ) para IgA e IgM con respecto al esquema de inmunización semanal (Fig. 2).

Al igual que en el suero en fluido intestinal, los valores de anticuerpos intestinales fueron significativamente mayores en ratones inmunizados en días consecutivos excepto para la IgM. El anticuerpo predominante fue del isotipo IgA (Fig. 3).

2. Respuesta de anticuerpos a las 18 semanas.- En la figura 2 se puede observar que los ratones inmunizados en días consecutivos presentaron a las 18 semanas un marcado decremento en los valores de anticuerpos séricos ( $p \leq 0.05$ ).

Al igual que en el suero en fluido intestinal se observó una caída en los niveles de anticuerpos. Los valores fueron inferiores a los de los animales que recibieron semanalmente la

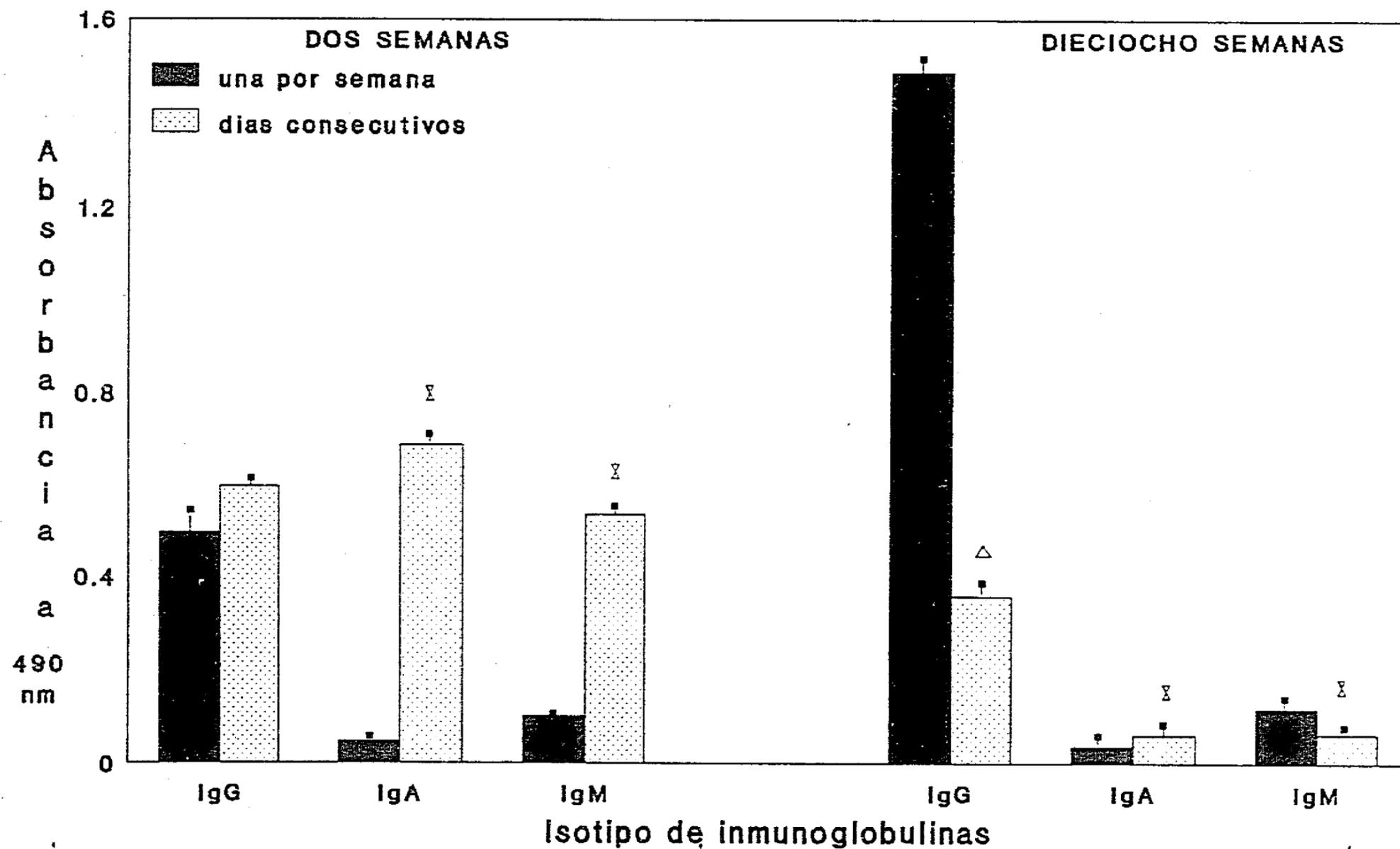


Figura 2. Anticuerpos séricos de ratones Balb/c Inmunizados con tres dosis de *S. typhimurium* F1, detectados por ELISA utilizando como antígeno la misma cepa, y el suero diluído 1:1000 para IgG y 1:50 para IgA e IgM. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estandar de tres experimentos

$\Delta$  = Oc vs Os  $p < 0.05$  por t de Student  $\Sigma$  = Oc vs Os  $p < 0.05$  por U de Mann Whitney

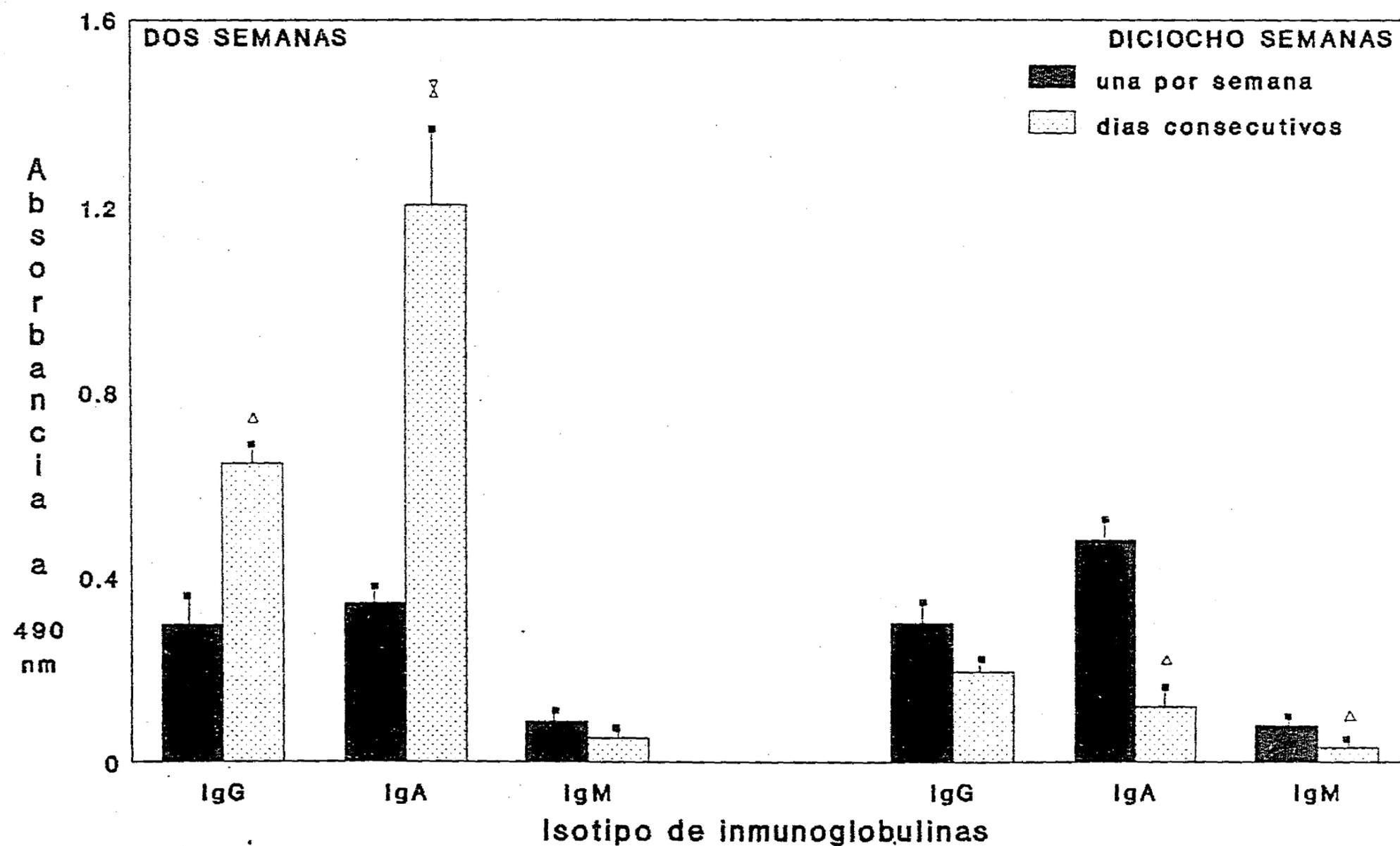


Figura 3. Anticuerpos Intestinales de ratones Balb/c Inmunizados con tres dosis de *S. typhimurium* F1, detectados por ELISA utilizando como antígeno la misma cepa, y el suero diluido 1:1000 para IgG y 1:50 para IgA e IgM. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estandar de tres experimentos

$\Delta$  = Oc vs Os  $p < 0.05$  por t de Student      X = Oc vs Os  $p < 0.05$  por U de Mann Whitney

dosis de bacterias. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) tanto para la IgA como para la IgM (Fig. 3).

### Electroforesis

La figura 4 muestra el corrimiento electroforético de antígenos de la cepa F1 de *S. typhimurium* (polvo cetónico). Se identificaron aproximadamente 42 bandas cuyos pesos moleculares oscilan entre 96 y 12 kDa. Se utilizaron tres fracciones para estimular cultivos celulares, sus pesos fueron 42-45, 50-53 y 64-68 kDa.

### Transformación Blastóide

Las tablas 4 y 5 muestran los resultados de estimulación mitogénica a ConA y LPS, en las células de bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos obtenidas de ratones normales, e inmunizados con 4 dosis de *S. typhimurium*, dos y dieciocho semanas posteriores a la última inmunización. A las dos semanas, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta mitogénica a ConA o LPS en células de bazo. Las células de NLM provenientes de animales inmunizados, mostraron una respuesta al LPS más elevada que en ratones control ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 4). Esta respuesta elevada se mantuvo a las 18 semanas para animales inmunizados por vía oral (Tabla 5). Dos semanas después de la última inmunización la respuesta a ConA en placas de Peyer se encontró elevada con respecto al control en los animales

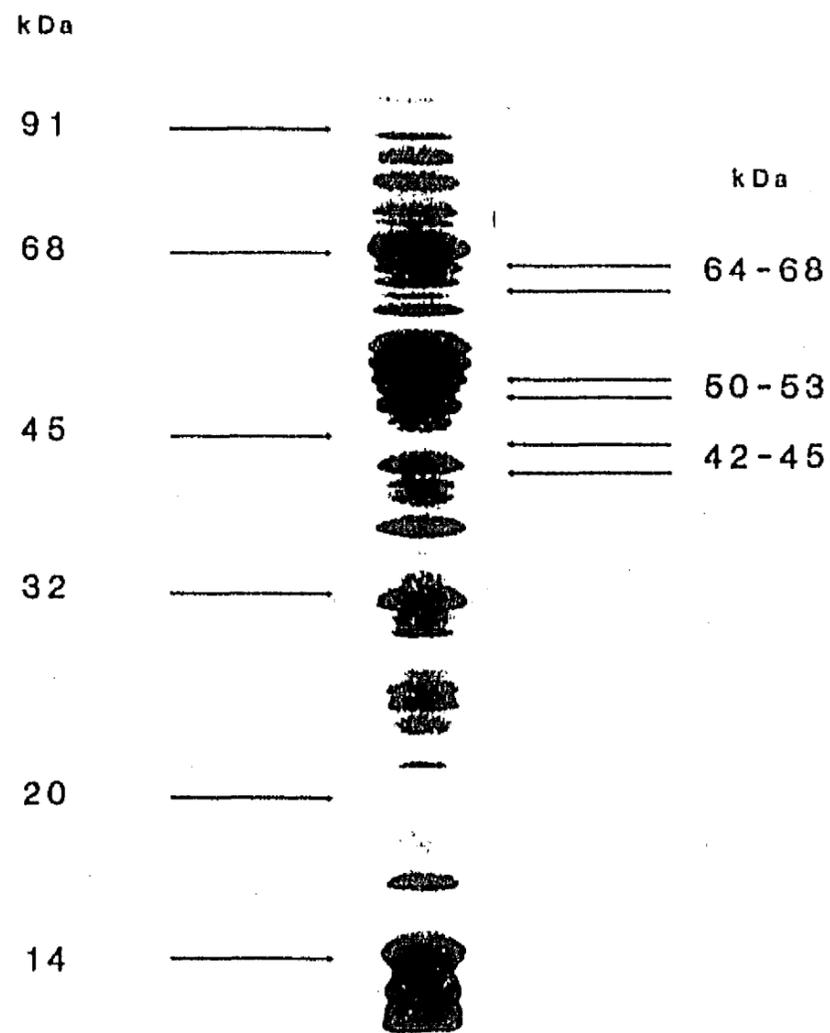


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del antígeno proteico de la cepa F1 de *S. typhimurium*, teñido con azul de coomasie

**Tabla 4. respuesta mitogénica detectada 2 semanas posteriores a la última inmunización en linfocitos de ratones Balb/c inmunizados con cuatro dosis de *S. typhimurium* F1**

Ratones	Organo	Incorporación de <sup>3</sup> H-tritiada en cpm		
		RPMI	Con A	LPS
Normales	Bazo	2189 ± 380	94432 ± 2895	37979 ± 2371
Inmunizados por vía oral		3055 ± 553	93930 ± 7274	36935 ± 2104
Inmunizados por vía parenteral		3214 ± 357	95569 ± 4087	45704 ± 7098
Normales	NLM	3707 ± 319	123618 ± 3610	39731 ± 2329
Inmunizados por vía oral		4110 ± 192	130745 ± 5718	52071 ± 2164*
Inmunizados por vía parenteral		4067 ± 229	125528 ± 5794	50937 ± 5337 X
Normales	PP	292 ± 16	24473 ± 1670	318 ± 19
Inmunizados por vía oral		319 ± 18	34735 ± 819*	327 ± 16
Inmunizados por vía parenteral		219 ± 5	12300 ± 1525 X Δ	258 ± 36

Los resultados representan el promedio ± el error estandar de tres experimentos

\* = Normal vs Oral p < 0.05 por t de Student

X = Normal vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

Δ = Oral vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

Tabla 5. Respuesta mitogénica detectada 18 semanas posteriores a la última inmunización en linfocitos de ratones Balb/c inmunizados con cuatro dosis de *S. typhimurium* F1

Ratones	Organo	Incorporación de <sup>3</sup> H-tritiada en cpm		
		RPMI	Con A	LPS
Normales	Bazo	1137 ± 281	107794 ± 15892	16943 ± 3172
Inmunizados por vía oral		1556 ± 48	90828 ± 3083	11535 ± 836
Inmunizados por vía parenteral		1580 ± 327	110562 ± 23573	14564 ± 2061
Normales	NLM	863 ± 69	124416 ± 3338	18682 ± 489
Inmunizados por vía oral		1846 ± 228	117206 ± 1345	25204 ± 864*
Inmunizados por vía parenteral		1198 ± 99	129829 ± 4120 Δ	20237 ± 586 Δ
Normales	PP	297 ± 35	22400 ± 1476	303 ± 26
Inmunizados por vía oral		323 ± 16	23953 ± 2376	325 ± 31
Inmunizados por vía parenteral		240 ± 11	23200 ± 2151	263 ± 25

Los resultados representan el promedio ± el error estandar de tres experimentos

\* = Normal vs Oral p < 0.05 por t de Student

Σ = Normal vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

Δ = Oral vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

**Tabla 6. Respuesta linfoproliferativa detectada 2 semanas posteriores a la última inmunización en células de ratones Balb/c inmunizados con cuatro dosis de *S. typhimurium* F1**

Ratones	Organo	Indice de Estimulación <sup>a</sup>		
		42-45 kDa	50-53 kDa	64-68 kDa
Normales	Bazo	1.23 ± 0.30	1.36 ± 0.08	1.50 ± 0.17
Inmunizados por vía oral		6.16 ± 0.18 *	6.56 ± 0.65 *	6.10 ± 0.60 *
Inmunizados por vía parenteral		1.50 ± 0.17 Δ	1.07 ± 0.08 Δ	6.00 ± 0.51 Σ
Normales	NLM	1.10 ± 0.05	1.26 ± 0.08	1.40 ± 0.18
Inmunizados por vía oral		2.40 ± 0.20 *	2.66 ± 0.29 *	3.53 ± 0.40 *
Inmunizados por vía parenteral		1.06 ± 0.08 Δ	1.10 ± 0.15 Δ	3.13 ± 0.18 Σ
Normales	PP	0.86 ± 0.03	0.90 ± 0.05	1.06 ± 0.05
Inmunizados por vía oral		1.20 ± 0.07	1.70 ± 0.08 *	1.30 ± 0.20
Inmunizados por vía parenteral		0.93 ± 0.07	0.80 ± 0.05 Δ	1.20 ± 0.05

<sup>a</sup> Índice de Estimulación (promedio de las cpm de las fracciones experimentales/promedio del papel de nitrocelulosa sólo) ± el error estandar de tres experimentos

\* = Normal vs Oral p < 0.05 por t de Student

Σ = Normal vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

Δ = Oral vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

Tabla 7. Respuesta linfoproliferativa detectada 18 semanas posteriores a la última inmunización en células de ratones Balb/c inmunizados con cuatro dosis de *S. typhimurium* F1

Ratones	Organo	Indice de Estimulación *		
		42-45 kDa	50-53 kDa	64-68 kDa
Normales	Bazo	1.23 ± 0.30	1.36 ± 0.08	1.50 ± 0.17
Inmunizados por vía oral		2.60 ± 0.20 *	2.00 ± 0.20	2.30 ± 0.25 *
Inmunizados por vía parenteral		1.47 ± 0.12 Δ	1.26 ± 0.06 Δ	2.16 ± 0.06 Z
Normales	NLM	1.10 ± 0.06	1.27 ± 0.08	1.47 ± 0.08
Inmunizados por vía oral		2.00 ± 0.23 *	2.03 ± 0.12 *	1.97 ± 0.38
Inmunizados por vía parenteral		1.26 ± 0.06 Δ	1.03 ± 0.08 Δ	1.60 ± 0.17
Normales	PP	0.93 ± 0.08	0.90 ± 0.07	1.06 ± 0.02
Inmunizados por vía oral		1.10 ± 0.02	1.01 ± 0.06	0.96 ± 0.12
Inmunizados por vía parenteral		0.96 ± 0.20	0.86 ± 0.05	0.90 ± 0.01

\* = Índice de Estimulación (promedio de las cpm de las fracciones experimentales/promedio del papel de nitrocelulosa sólo) ± el error estandar de tres experimentos

\* = Normal vs Oral p < 0.05 por t de Student

Z = Normal vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

Δ = Oral vs Parenteral p < 0.05 por t de Student

inmunizados por vía oral ( $p \leq 0.05$ ). Por el contrario, los animales inmunizados parenteralmente mostraron una respuesta menor al control  $p \leq 0.05$  a las 2 semanas (Tabla 4), estas diferencias no se observaron para las 18 semanas (Tabla 5). En ningún grupo de ratones inmunizados el LPS estimuló células provenientes de placas de Peyer (Tablas 4 y 5).

Los índices de estimulación para cada una de las fracciones antigénicas de *S. typhimurium* se obtuvieron como el cociente de las cuentas por minuto de cada muestra experimental, entre las cuentas por minuto de la muestra control, se consideró como positivo un índice mayor de 2.0 (Tablas 6 y 7). Dos semanas después de la última inmunización se observó que las fracciones estudiadas indujeron una respuesta proliferativa en células de bazo y NLM en animales inmunizados por vía oral, mientras que sólo la fracción de 64 a 68 kDa, indujo una respuesta proliferativa en las células de los animales inmunizados parenteralmente (Tabla 6). A las 18 semanas se observó una disminución en los índices de estimulación para las diferentes fracciones, con respecto a los encontrados a las 2 semanas (Tabla 7).

#### **Antígenos de Superficie en Células Linfoides**

La figura 5 presenta el porcentaje de células de bazo de nódulos linfáticos mesentéricos y de placas de Peyer peroxidasa-positivas obtenidas cinco días después de la cuarta inmunización, con la cepa F1 de *S. typhimurium*. Se observa que las células con

antígeno de superficie IgG provenientes de ratones normales, mostraron un porcentaje menor de células con marca que las obtenidas de ratones inmunizados, presentando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para bazo, PP y nódulos linfáticos, en la relación normal-parenteral (N:P) y en la relación normal-oral (N:O) en placas de Peyer. Los valores más altos se observaron en células de ratones inmunizados por vía parenteral.

De igual manera el porcentaje de células con marcador IgA en ratones no inmunizados, fue significativamente menor que el de ratones inmunizados. Las diferencias en los animales inmunizados fueron significativamente más altas con respecto al no inmunizado ( $p \leq 0.05$ ) en PP y NLM independientemente de la vía de inmunización.

El porcentaje de células con antígeno de superficie IgM fue menor en ratones no inmunizados, observándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer, en la relación N:P y oral-parenteral (O:P) además de N:O en placas de Peyer. El porcentaje más alto de células peroxidadas se observó en animales inmunizados por vía parenteral.

La figura 6 muestra el porcentaje de células de bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos peroxidasa-positivos, determinado dieciocho días posteriores a la última inmunización. Se observó que el porcentaje de células con marcador IgG fue menor en el grupo control, que en el grupo inmunizado, presentando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para células de

bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos en la relación N:P. En nódulos linfáticos y placas de Peyer se observaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) en relación N:O, y en el bazo ( $p \leq 0.05$ ) en la relación O:P. El mayor porcentaje de células con IgG de superficie se presentó en células de bazo, PP y NLM provenientes de ratones inmunizados por vía parenteral.

El porcentaje de células con IgA de superficie fue menor en el grupo control, que en el grupo inmunizado. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en células de bazo, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentericos en la relación N:O y N:P; así como en la relación O:P en placas de Peyer, con predominio de células positivas en los ratones inmunizados por vía oral.

El porcentaje de células con marcador IgM fue menor en el grupo control, que en el grupo inmunizado, se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para células de bazo, PP y NLM, en la relación N:O y N:P. En nódulos linfáticos mesentericos ( $p \leq 0.05$ ) en la relación O:P, con un porcentaje mayor de células positivas, en ratones que recibieron la *Salmonella* por vía oral.

La figura 7 presenta el porcentaje de células con marcador Ly-2 ó L3T4 detectados cinco días posteriores a la última inmunización. Se observa que el porcentaje de células provenientes de ratones normales e inmunizados con marcador L3T4 fue semejante. En el caso del marcador Ly-2 sólo se encontró un porcentaje menor de células de placas de Peyer para los animales inmunizados por vía parenteral con respecto a los inmunizados por vía oral ( $p \leq 0.05$ ).

A los dieciocho días (Fig. 8) la población celular con marcador LBT4 en ratones normales fue menor que la proveniente de ratones inmunizados, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre N:O para células de los tres órganos. Se observaron además diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre N:F en bazo y PF .

Las células con antígeno de superficie Ly-2 (Fig. 8), mostraron valores significativamente más altos ( $p \leq 0.05$ ) en el grupo inmunizado parenteralmente con respecto, tanto al grupo control, como al grupo inmunizado oralmente. A nivel de NLM los animales inmunizados por vía oral presentaron un porcentaje menor ( $p \leq 0.05$ ) que el grupo control de células peroxidadas.

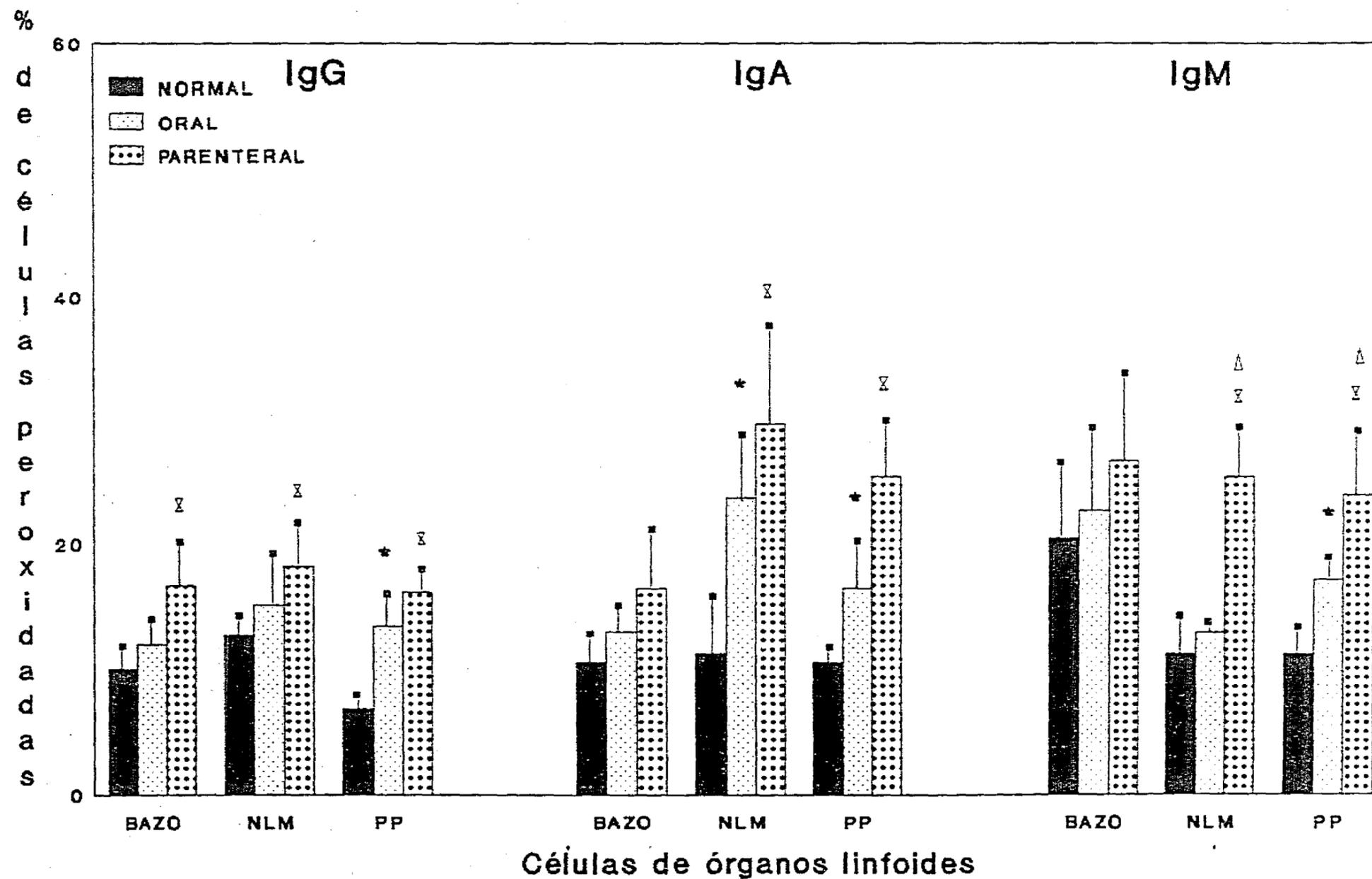


Figura 5. Porcentaje de células con inmunoglobulinas de superficie, determinado por el método de inmunoperoxidasa 5 días posteriores a la última inmunización. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos

\* = Normal vs Oral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$   $\zeta$  = Normal vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$   $\Delta$  = Oral vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$

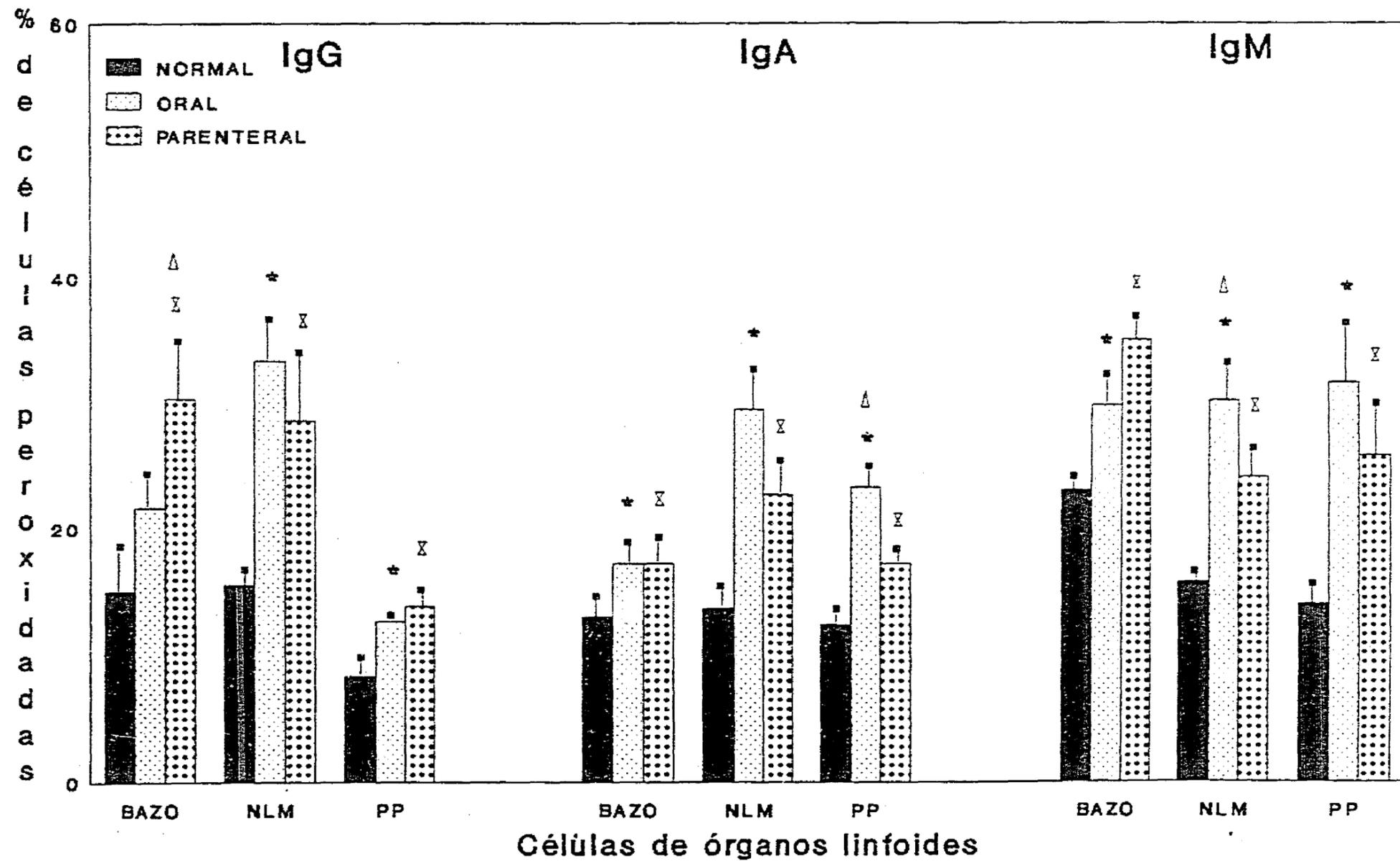


Figura 6. Porcentaje de células con Inmunoglobulinas de superficie, determinado por el método de Inmunoperoxidasa 18 días posteriores a la última Inmunización. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estandar de cuatro experimentos

\* = Normal vs Oral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$     x = Normal vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$     Δ = Oral vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$

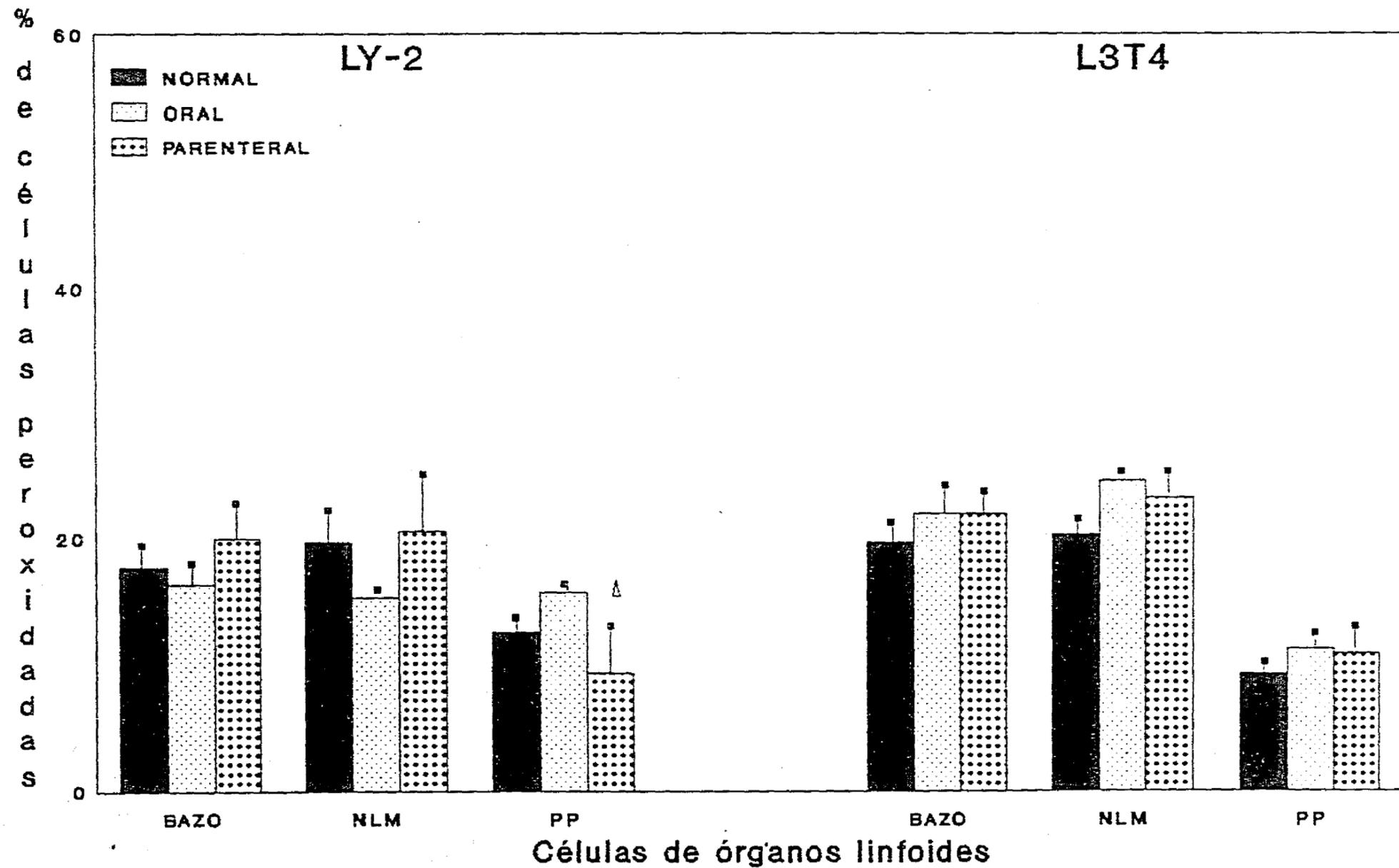


Figura 7. Porcentaje de células con moléculas de superficie Ly-2, L3T4, determinado por el método de inmunoperoxidasa 5 días posteriores a la última inmunización. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos

\* - Normal Vs oral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$      $\Sigma$  - Normal vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$      $\Delta$  - Oral vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$

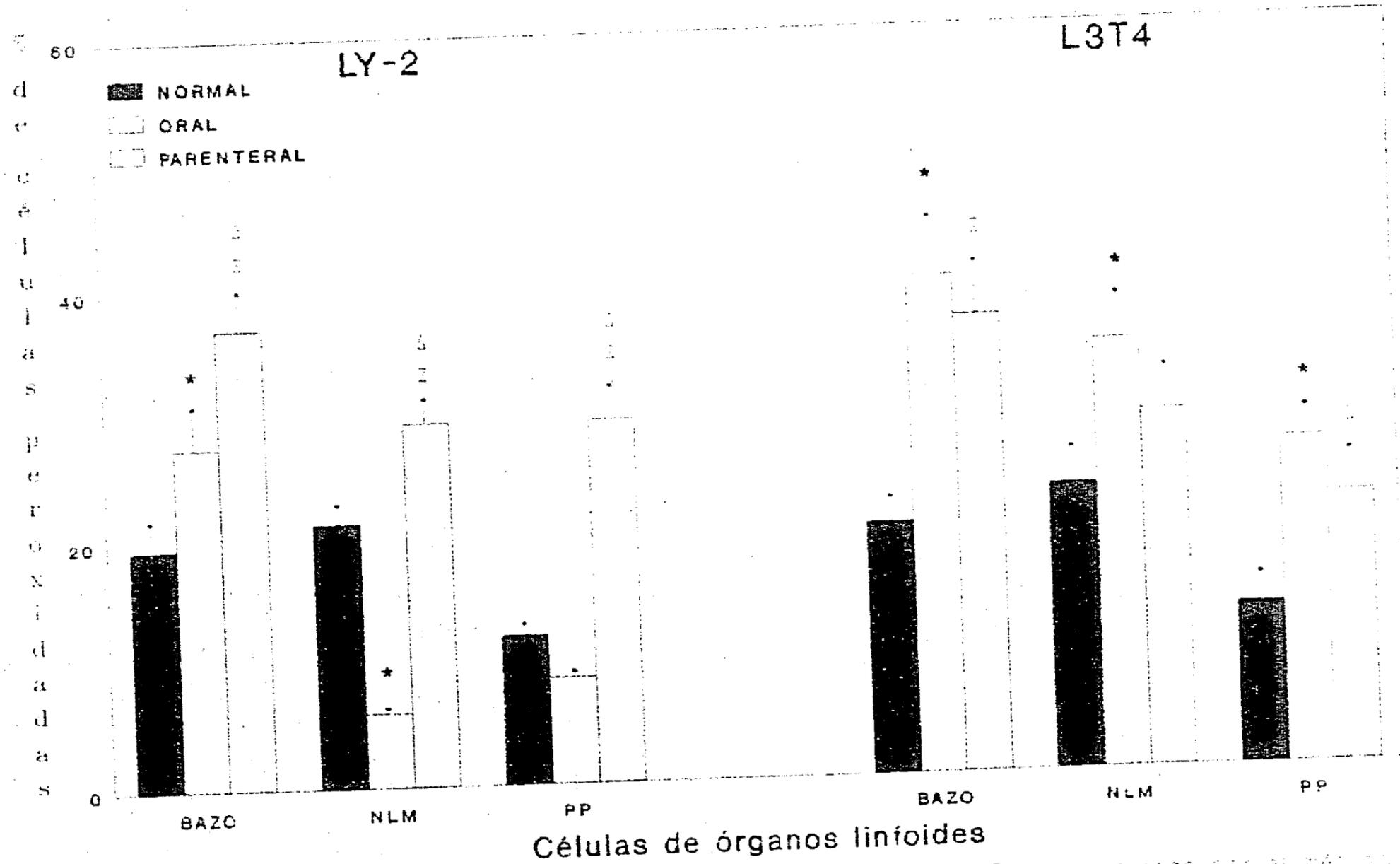


Figura 8. Porcentaje de células con moléculas de superficie LY-2 y L3T4 determinado por el método de inmunofluorescencia 18 días posteriores a la citación y multiplicación. Los valores representan el promedio y el error estándar de 4 experimentos.

\* Normal vs Oral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$ ; † Normal vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$ ; ‡ Oral vs Parenteral  $p < 0.05$  por  $\chi^2$ .

## DISCUSION DE RESULTADOS

A pesar de que los aspectos inmunológicos sobre la infección por *Salmonella* han sido ampliamente investigados, tanto en el humano como en diferentes modelos animales, no existen a la fecha datos concluyentes, siendo éstos en algunos casos contradictorios.

Estudios recientes en el modelo murino infectado por *Salmonella*, han permitido postular que la información genética del hospedero juega un papel importante en la susceptibilidad a la infección (64-72). Se ha demostrado de igual manera que la virulencia de *Salmonella*, la dosis y la vía de inmunización son factores que participan en la inducción de la enfermedad (58,70,72,74,75).

Los resultados del presente trabajo muestran que tanto la inmunización oral con *S. typhimurium*, como la parenteral pueden inducir la producción de anticuerpos de isotipo IgG, IgA e IgM en suero y en fluido intestinal. Sin embargo los niveles de anticuerpos producidos, así como el isotipo, varían considerablemente de acuerdo con la ruta de inmunización, el número de dosis administradas y el intervalo entre ellas.

Existen en la literatura reportes donde se indica que dosis repetidas de antígeno no viable administradas por vía parenteral, son poco efectivas o incapaces de provocar una respuesta específica de IgA en la mucosa intestinal de animales inmunizados (93,94). Sin embargo otros autores (76,81,95) afirman que ciertos

antígenos, administrados por vía parenteral, pueden inducir la presencia de anticuerpos específicos tanto en suero como en fluido intestinal. Issekults y col. (96) investigaron el tráfico de linfocitos a través de granulomas inducidos en ovejas por adyuvante de Freund. Colectaron y marcaron células de vasos linfáticos aferentes y eferentes con  $^{111}\text{In}$ . Detectaron la marca en varios sitios del sistema linfático y encontraron que las células marcadas migraban de sangre y, a través del granuloma, regresaban a los vasos linfáticos aferentes. Cahill y col. (96) marcan células de vasos linfáticos intestinales y de vasos linfáticos periféricos de ovejas y posteriormente se inyectaron por vía iv. Detectaron la marca en sangre periférica, linfa intestinal y pre-escapular. Al evaluar el porcentaje de marca recuperada encontraron un mayor porcentaje de marca en intestino delgado, en los animales que recibieron células de vasos linfáticos intestinales en relación a los que se le inyectaron células de vasos linfáticos periféricos. Estos investigadores sugirieron que existen dos poblaciones de linfocitos T circulantes, una dirigida preferentemente a nódulos linfáticos periféricos, y la otra a intestino. Mackay y col. (98) analizaron la migración de subpoblaciones de linfocitos T a través de vasos linfáticos aferentes o eferentes, y reportaron que una subpoblación de células T migró selectivamente a intestino.

En el presente trabajo se consideró que la presencia de anticuerpos intestinales en ratones inmunizados por vía parenteral, podría deberse al tráfico de células mencionado

(96,97,98), o bien al paso de *S. typhimurium* por la misma vía hasta llegar al intestino.

Se observó en general una correlación entre el número de dosis administradas y los niveles de anticuerpos generados. A las 18 semanas, se encontraron valores más altos de inmunoglobulinas tanto en el suero como en el fluido intestinal en ratones inmunizados por vía oral. La capacidad de *S. typhimurium* administrada por vía oral para inducir una respuesta de anticuerpos de mayor magnitud y duración, pudo haberse debido a la estimulación antigénica constante provocada por la persistencia de la salmonela viable en órganos linfoides, como lo han reportado Mackaness, Collins y Blanden (40,41,42) entre otros. Estos autores mostraron que la inmunización con bacterias vivas, inducía una mayor protección que la inmunización con bacterias inactivadas, dado que los animales inmunizados con *S. typhimurium* inactivada no lograban eliminar a la bacteria del desafío, permitiéndose su multiplicación en células fagocíticas.

Los resultados mostraron un efecto significativo del número de dosis administradas, en la inducción, de la síntesis de IgA en el intestino. Los niveles locales de IgA se elevaron más después de la inmunización oral que de la inmunización parenteral. Esto pudo haberse debido, a que los linfocitos precursores involucrados en la síntesis de IgA se localizaban principalmente en el tejido linfoide asociado a mucosas (99). Furhman y Cebra (73) afirman que vacunas preparadas con antígenos "vivos"

indujeron una respuesta inmune en la superficie de las mucosas, superior a la generada por vacunas que contenían antígenos no replicativos.

El intervalo entre dosis aplicadas afectó considerablemente la respuesta humoral, tanto en suero como en fluido intestinal, notándose a las dos semanas un franco predominio de los niveles locales de IgA en animales que se inmunizaron con 3 dosis en días consecutivos, comparado con el grupo inmunizado con las mismas dosis pero con una semana de intervalo. Es probable que el esquema de inmunización en días consecutivos indujera un proceso de división celular dependiente del antígeno, que favoreciera la síntesis de IgA por parte de células plasmáticas en la mucosa (98), o bien que la cantidad de antígeno recibido en días consecutivos hubiera generado una respuesta elevada de anticuerpos (100).

Se observó una disminución en los valores de inmunoglobulinas presentes en animales inmunizados con el esquema consecutivo a las dieciocho semanas, efecto que no ocurrió con los animales inmunizados a intervalos de una semana entre cada dosis, en los cuales la respuesta anti-*Salmonella* permaneció constante a excepción de la IgG, cuyo valor se triplicó en relación con el observado a las dos semanas. Sziegoleit y col. (101) han reportado resultados en los que se muestra la presencia de anticuerpos específicos después de tres meses en ratones infectados con *S. typhimurum* por vía oral.

El decremento de anticuerpos séricos e intestinales en

ratones inmunizados en días consecutivos se pudo haber debido a que el estímulo antigénico administrado durante tres días, generó una gran cantidad de clonas de memoria con una vida media muy parecida, las cuales fueron desapareciendo prácticamente al mismo tiempo; a diferencia del grupo inmunizado semanalmente, en el cual la aplicación de cada dosis de *S. typhimurium* activó las clonas existentes y generó nuevas clonas de memoria, las cuales se encargaron de producir anticuerpos varias semanas después de la última inmunización.

Cuando el antígeno se administró a intervalos de una semana los anticuerpos de clase IgG, predominaron en suero independientemente de la vía de inoculación y del número de dosis recibidas. Metcalf y col. (102) obtuvieron resultados similares en ratones inmunizados con *S. typhimurium* por vía intraperitoneal, subcutánea o intravenosa.

Los resultados de este estudio difieren de los obtenidos por Eddie y col. (103) los cuales encontraron niveles muy bajos de anticuerpos intestinales en conejos inmunizados con *S. typhimurium* por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Las diferencias observadas pudieron haberse debido a las especies utilizadas, o a la capacidad del antígeno administrado parenteralmente de inducir una respuesta de IgA, o al uso de esquemas diferentes de inmunización, ya que en el presente trabajo los niveles y clases de inmunoglobulinas obtenidas variaron considerablemente al cambiar el esquema de inmunización.

Numerosos reportes han mostrado (48,55,104,105) que vacunas

de *Salmonella* compuestas a base de células muertas o de extractos proteicos administrados por vía parenteral, protegían a ratones de la enfermedad. En estos estudios se utilizaron sin embargo diferentes vías para el desafío con bacterias virulentas. Otros reportes (40,41,42,106,107) han mostrado que la administración oral de *S. typhimurium* inducía una respuesta inmune protectora contra un reto con bacterias virulentas, la cual era superior a la obtenida por administración de la bacteria parenteral. En el presente estudio, se encontró que la inmunización por vía oral generó una mayor protección contra posteriores retos con bacterias virulentas que la inmunización por vía parenteral. Dicha protección sin embargo, no se relacionó con los niveles de anticuerpos presentes, tanto en suero como en fluido intestinal. Estos resultados concuerdan con reportes anteriores que muestran una falta de relación entre los títulos de anticuerpos y la protección observada (41,105,108).

En estudios realizados con animales inmunizados con diferentes cepas de *S. typhimurium* por vía oral Brisart y cols. (109), observaron una buena correlación entre títulos altos de anticuerpos IgA y protección. Los autores propusieron que este resultado podía considerarse como un buen marcador serológico para predecir la eficacia de vacunas, aunque aparentemente estos anticuerpos no estaban directamente relacionados con la resistencia a infección, ya que protegían contra desafío con cepas serológicamente diferentes. Estos datos difieren de los encontrados en el presente estudio, en los cuales, con el esquema

de inmunización en días consecutivos, se obtuvieron títulos elevados de anticuerpos IgG e IgA y sin embargo se encontró una baja protección. La diferencia puede deberse a que la cantidad de antígeno aplicado ( $1 \times 10^7$  bacterias durante 3 días), generó una respuesta de anticuerpos de baja afinidad, dificultando la eliminación de la bacteria. Koitt y col. (100) han afirmado que el grado de afinidad de los anticuerpos depende de la dosis de antígeno administrado, considerando que una concentración alta de antígeno interacciona con receptores de alta y baja afinidad de linfocitos B, generando la producción de anticuerpos con diferente grado de afinidad.

Aunque *S. typhi* y *S. typhimurium* comparten varias características, se conocen algunas diferencias importantes entre ellas (110) y por lo tanto los datos obtenidos en animales de experimentación no se pueden extrapolar al humano. Sin embargo es interesante mencionar que estudios realizados en humanos reportan datos que concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo. En Chile con la vacuna oral de *Salmonella typhi* Ty21a se encontró que la administración de 4 dosis confería mayor protección que un número menor de ellas (111). Recientemente se ha reportado que la vacuna oral Ty21a administrada con corto intervalo en varias dosis induce una respuesta de IgA intestinal superior a la encontrada cuando el intervalo fue mayor (112). Existen varios estudios en humanos utilizando diferentes esquemas de inmunización, para tratar de determinar cual es el que produce la mejor respuesta de anticuerpos secretores (112,113). En estos

estudios no se ha analizado simultáneamente la capacidad de protección de la vacuna con presencia de anticuerpos.

Se ha reportado (40,41,42) que las vacunas de bacterias vivas inducen una mejor protección debido a que son capaces de estimular una respuesta inmune celular, mientras que las vacunas con bacterias muertas no lo hacen. Los resultados de este estudio mostraron que las 3 fracciones antigénicas de *S. typhimurium* analizadas fueron capaces de estimular una respuesta proliferativa específica de células provenientes de animales inmunizados con la bacteria viva, y solamente la fracción de 64-68 kDa fue capaz de estimular las células de animales inmunizados parenteralmente. Existen datos en la literatura (114,115) los cuales muestran que bacterias muertas y algunas sustancias químicas pueden inducir respuesta inmune mediada por células. Así por ejemplo, Robertson y col. (114) han reportado que las células de bazo de terneras inmunizadas con *S. typhimurium* inactivada dan una buena respuesta de proliferación celular al estimularlas con porinas, aunque no han encontrado una correlación satisfactoria con la protección observada en dichos estudios. En general, en el modelo experimental del ratón se menciona que hay una mejor correlación entre protección con la respuesta inmune celular mediada por pruebas de hipersensibilidad tardía (116,117,118). Sin embargo Killar y Eisenstein (117,118) han realizado diversos estudios para medir la hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) en ratones infectados por *S. typhimurium* demostrando que: 1) existen marcadas diferencias entre las cepas de ratón para

presentar una respuesta tipo HTR; 2) la capacidad para montar una respuesta de HTR está relacionada con una susceptibilidad innata o con la resistencia del ratón a la infección por *Salmonella* virulenta; 3) la existencia de una respuesta anérgica no está relacionada con los loci H-2 de histocompatibilidad; 4) la anergia no está relacionada con la presencia o ausencia de reactividad al LPS en las diferentes cepas del ratón, y no está causada por una sobrecarga de antígeno en cepas no reactivas, y 5) una falta de respuesta HTR puede ocurrir simultáneamente con una inmunidad protectora, si la dosis de inmunización es baja.

En el presente trabajo se encontró una mayor proliferación celular en el grupo de ratones inmunizados por vía oral (Tablas 6 y 7), lo cual indica que la inmunización por vía oral fue capaz de inducir respuesta celular superior a la obtenida con inmunización parenteral tanto a las dos como a las dieciocho semanas, y dado que el grupo de ratones que mostró mayor protección ante un desafío de 150 DL50 dos y dieciocho semanas después de la última inmunización, fue el que recibió la bacteria por vía oral, se considera que existe una mejor correlación entre protección y respuesta inmune celular.

Existen pocos estudios acerca de los componentes de *Salmonella* que son capaces de inducir una buena respuesta inmune celular, dentro de éstos se encuentran los trabajos con porinas, proteínas con peso molecular de 36-41 kDa. Estas proteínas son capaces de inducir respuesta inmunológica, celular y humoral (114) así como protección (porinas contaminadas con LPS) ante el

desafío con la bacteria virulenta (55,57). En el presente trabajo se obtuvo una fracción antigénica de *S. typhimurium* de 42-45 kDa la cual indujo linfoproliferación en células de ratones inmunizados por vía oral. Se considera que esta fracción antigénica, podría contener una de las porinas descritas para *S. typhimurium* (55,56,114). Recientemente se ha reportado que además de las porinas una proteína de superficie de 55 kDa es capaz de inducir una protección significativa contra infección experimental con *S. typhimurium* (118). La fracción de 50-53 kDa que indujo una buena proliferación en animales inmunizados por vía oral, pudo haber contenido esta proteína.

Se ha reportado (41,42,43) que la inmunización con bacterias inactivadas induce sólo respuesta inmune humoral. Se considera, por lo tanto que la fracción de 64-68 kDa que estimuló tanto a células de ratones inmunizados por vía oral como a células de ratones inmunizados por vía parenteral, podría corresponder a proteínas de choque térmico. Gaston y col. (120) han reportado que estas proteínas se encuentran altamente conservadas tanto en las bacterias como en células eucariontes, por lo tanto estas proteínas podrían reconocer un epítipo común para bacterias así como para células eucariontes. Young y col. (121, 122) han reportado que las proteínas de choque térmico son compartidas por diferentes géneros de bacterias. Por tanto, la linfoproliferación en células de animales inmunizados por vía oral y por vía parenteral podría deberse a una respuesta de reacción cruzada a diferentes antígenos bacterianos.

Debido a que *S. typhimurium* posee varias sustancias inmunomodulatorias con actividad mitogénica (123,124,125) se decidió en este trabajo estudiar la respuesta *in vitro* a mitógenos de células T, células B así como la presencia de inmunoglobulinas de superficie y de moléculas Ly-2, L3T4 en células de diferentes órganos de los animales normales, y en aquellos inmunizados por vía parenteral y por vía oral. Se encontraron pocas alteraciones a mitógenos *in vitro* en la respuesta de animales inmunizados con respecto a los ratones no inmunizados. El aumento en la respuesta al LPS de *E. coli*, utilizado en células de animales inmunizados, podría explicarse por presencia de antígenos de reacción cruzada. Duran y col. (126) han encontrado una respuesta de células B al estimular ratones normales con la cepa TML de *S. typhimurium*, esta respuesta se incrementó de 15 a 20 veces cuando los animales fueron expuestos al antígeno, mostrando un 30% de especificidad para el LPS. Se ha reportado que la inmunización parenteral con bacterias vivas, pero no con bacterias muertas, genera una supresión de la respuesta mitogénica de las células provenientes del bazo de los animales inmunizados (127) a concavalina A, sin embargo, en un trabajo reciente se encontró que esta supresión sólo se manifiestaba cuando estaban presentes grandes cantidades de bacterias en el bazo (128). En el presente estudio no se detectó la presencia de la bacteria en bazo a los tiempos que se realizaron los estudios de estimulación de cultivos celulares.

En el modelo experimental utilizado se encontró que, tanto

con inmunización oral como con inmunización parenteral, se producía un aumento de células con inmunoglobulinas de superficie y de células con moléculas L3T4 y Ly-2 en los órganos estudiados. Inicialmente el mayor porcentaje de células peroxidadas se presentó en el grupo inmunizado por vía parenteral. Estos datos indican que algunos componentes de la bacteria administrada parenteralmente son capaces de alcanzar en menor tiempo que antígenos administrados por vía oral, la mucosa intestinal, o que células de memoria generadas en el sitio de la inmunización pueden ser transportadas al intestino. El mayor porcentaje de células con inmunoglobulinas de superficie observado a los 18 días en el grupo inmunizado por vía oral en NLM y PP, pudiera explicarse por la replicación de bacterias vivas en estos órganos.

Tomando en cuenta que el grupo de ratones que mejor se protegió fue el que recibió la *Salmonella* por vía oral, y que la población de células con marcador Ly-2 ha sido reportada como población celular citotóxica-supresora, en el presente trabajo la disminución de células con marcador Ly-2 acompañada de un incremento de células con marcador L3T4 en NLM y PP dieciocho días posteriores a la última inmunización en el grupo inmunizado por vía oral, podría deberse a que la inmunización por vía oral indujo menor actividad supresora que la inmunización por vía parenteral, donde el porcentaje de células ayudadoras y citotóxicas-supresoras fue semejante. Se podría considerar por lo tanto que el grupo inmunizado por vía parenteral posee una

mayor actividad supresora que el grupo inmunizado por vía oral. Cabe mencionar que a pesar de que la metodología utilizada para la identificación de subpoblaciones de linfocitos no es la más adecuada en la actualidad, el porcentaje de células con marcador de superficie L3T4, coincidió con el reportado por Dialynas y col. (129) que caracterizaron la molécula de superficie de linfocitos T L3T4, por medio de anticuerpos monoclonales. Galdiero y col. (130) han reportado que animales infectados por vía subcutánea con *S. typhimurium* mostraron un aumento en el porcentaje de linfocitos T y B, tanto en bazo como en nódulos linfáticos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que tanto la inmunización oral con *S. typhimurium* viva, como inmunización parenteral con la bacteria inactivada por calor, fueron capaces de inducir respuesta inmune intestinal y sistémica tanto de tipo humoral como celular. En los dos casos se detectó respuesta inmunológica dieciocho semanas posteriores a la última inmunización. Se observó que la inmunización por vía oral generó respuesta celular y protección superior a la inmunización por vía parenteral. El intervalo entre cada dosis influyó de manera importante tanto en la inducción de anticuerpos como en la protección, mostrando que la administración de antígeno en días consecutivos, generó una gran producción de anticuerpos, así como una pobre protección. La vía de inmunización influyó en la inducción de subpoblaciones de linfocitos B presentando el grupo inmunizado por vía parenteral, un mayor incremento de células

peroxidadas en bazo, en nódulos linfáticos mesentéricos y en placas de Peyer, un aumento en el porcentaje de células peroxidadas fue mayor en el grupo inmunizado por vía oral.

## ABSTRACT

### INTESTINAL AND SYSTEMIC IMMUNE RESPONSE OF IMMUNIZED MICE WITH *Salmonella typhimurium*

The present work had the aim to study the effect of different schedules of immunization with *Salmonella typhimurium* on the intestinal and systemic immune response of mice and to estimate the relationship between local and/or systemic immune response with protection against infection. Balb/c mice were immunized with two, three, or four weekly doses of live *S. typhimurium* intragastrically, or parenterally with heat killed bacteria given weekly in the foot pad. Another group of animals was immunized orally with live bacteria for three consecutive days. A challenge study with virulent *S. typhimurium* two and 18 wk after last immunization was carried out to determine protection. Both serum and intestinal antibodies against *Salmonella* were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Spleen, Peyer's patches (PP) and mesenteric lymph node (MLN) cells were obtained from animals that received four weekly oral and parenteral doses of bacteria, to determine the cellular immune response and the presence of subpopulations of B and T cells, using immune peroxidase methods.

A lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>)  $2.6 \times 10^3$  cells was found. The best protected group was the one receiving four weekly oral doses of bacteria with a survival of 80% after two weeks and 37% at 18 weeks. Serum and intestinal antibodies levels showed a correlation with the number of doses administered. The interval between doses affected significantly the humoral response, both in serum and in the gut. In comparison with animals immunized weekly the group immunized sequentially during three days showed an increase in serum IgA and IgM antibodies; a similar increased response was found in the IgG and IgA intestinal antibodies found in the gut ( $p \leq 0.05$ ). This latter group showed an important decrease of the three antibody isotypes at 18 weeks, in relationship with the group immunized weekly ( $p \leq 0.05$ ). Spleen, PP, and MLN cells were cultured and stimulated with particulated antigen of *S. typhimurium*, with molecular weights of 42-45, 50-53 and 64-68 kDa and the results were compared with results obtained in the same cells using traditional mitogens such as concanavalin A and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. The results showed that the three *Salmonella* fractions stimulated specific proliferative response in cells obtained from mice immunized with live bacteria. Only the 64-78 kDa fraction stimulated cells from parenterally immunized mice. Both oral and parenteral immunization produced an increase in the percentage of surface antigens of B cells (IgG, IgA, IgM) and T cells (Ly-2, L3T24).

The results in the animal model used indicate that the route of immunization, the doses of antigen given and the schedule of immunization modified significantly the humoral and cellular immune response, at the local and systemic level, and modified the survival of the animals after challenge with live bacteria.

## REFERENCIAS

- 1.- Louis FCHA. Recherches anatomiques, pathologiques et therapeutiques sur la maladie connue sous les noms de gastroenterite, fièvre putride, adynamique, ataxique, typhoide, etc. etc., comparée avec les maladies aiguës les plus ordinaires. 2 vols. Paris, 1929.
- 2.- Budd W. Typhoid Fever: its nature, mode of spreading and prevention. London, 1873.
- 3.- Freeman BA. Tratado de Microbiología de Burrows. Nueva Editorial Interamericana 12<sup>a</sup> edición. México, 1983.
- 4.- Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. Edward's and Ewing 4<sup>th</sup> edition. New York, 1986.
- 5.- Beltrán P, Musser MJ, Helmuth R, Farmer JJ, Frerichs WM, Wachsmuth IK, Ferris K, McWhorter AC, Wells JG, Cravioto A, Selander RK. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: Genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:7753-7757.
- 6.- Le Minor L, Véron M, Popoff M. Taxonomie des *Salmonella*. Ann Inst Pasteur (Paris) 1982; 133B:223-243.
- 7.- Le Minor L, Popoff M, Laurent B, Hermant D. Individualization d'une septieme sous-espece of *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. Ann Inst Pasteur (Paris) 1986; 137B:211-217.

- 8.- Davis ED, Dulbecco R, Eisen NH, Ginsberg HS. Microbiology. Harper and Row 3<sup>rd</sup> edition. Maryland, 1980.
- 9.- Angerman CR, Eisenstein TK. Correlation of the duration and magnitude of protection against *Salmonella* infection afforded by various vaccines with antibody titers. Infect Immun 1980; 27:435-443.
- 10.- Sneller MC, Strober W. Perspective. M cells and host defense. J Infect Dis 1986; 154:737-741.
- 11.- Germanier R. Preface and Typhoid fever. Bacterial Vaccines. Academic Press Inc. New York, 1984.
- 12.- Edelman R, Levine MM. Summary of an international workshop on typhoid fever. Rev Infect Dis 1986; 8:329-350.
- 13.- Hoffman SL, Punjabi NH, Kumala MD, Moechtar MA, Pulungsih SP, Rivai AR, Rockhill RC, Woodward TE, Loedin AA. Reduction of mortality in chloramphenicol-treated severe typhoid fever by high-dose dexamethasone. N Engl J Med 1984; 310:82-88.
- 14.- Volk WA, Wheeler MF. Basic Microbiology. Harper and Row 5<sup>th</sup> Edition. Maryland, 1984.
- 15.- Soe GB, Overturf GD. Treatment of typhoid fever and other systemic salmonellosis with cefotaxime, ceftriaxone, cefoperazone, and other newer cephalosporins. Rev Infect Dis 1987; 9:719-736.
- 16.- Calva E, Puente JL, Calva JJ. Research opportunities in typhoid fever: Epidemiology and molecular biology. BioEssays 1988; 9:173-177.

- 17.- Boletín Mensual de Epidemiología. Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud. México 1986-7.
- 18.- Boletín Epidemiológico Anual. Jefatura de Servicios de Medicina Preventiva. Subdirección General Médica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México 1980-6.
- 19.- **Wright AE.** On the association of serious hemorrhages with conditions and defective blood coagulability. *Lancet* 1896; 2:807-809.
- 20.- **Pfeiffer R, Kollé W.** Experimentelle untersuchungen zur frage der schützimpfung des menschen gegen. *Typhus abdominalis.* *Dtsch Med Wochenschr* 1896; 22:735-737.
- 21.- **Felix A, Pitt RM.** A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet* 1934; 2:186-191.
- 22.- **Felix A, Pitt RM.** Virulence of *B. typhosus* and resistance to O antibody. *J Pathol Bacteriol* 1934; 38:409-420.
- 23.- **Felix A., Pitt RM.** The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. *J Hyg (Cambridge)* 1951; 49:92-109.
- 24.- **Landy M.** Enhancement of the immunogenicity of typhoid vaccine by retention of the Vi antigen. *Am J Hyg* 1953; 58:148-164.
- 25.- **Walter Reed Army Institute of Research.** Preparation of dried acetone-inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines. *Bull WHO* 1964; 30:635-646.

- 26.- Walter Reed Army Institute of Research, International Laboratory for Biological Standards, Statens Seruminstitut. Physical and chemical studies on two dried inactivated typhoid vaccines (vaccine K and L). Bull WHO 1964; 30: 647-652.
- 27.- Bodhidatta L, Taylor DN, Thisyakorn U, Echeverria P. Control of typhoid fever in Bangkok, Thailand, by annual immunization of schoolchildren with parenteral typhoid vaccine. Rev Infect Dis 1987; 9:841-845.
- 28.- Tacket OC, Losonski G, Taylor DN, Baron LS, Kopecko D, Cryz S, Levine MM. Lack of immune response to the Vi component of a Vi-positive variant of the *Salmonella typhi* live oral vaccine strain Ty21a in human studies. J Infect Dis 1991; 163:901- 904.
- 29.- Wahdan MH, Serié C, Cerisier Y, Sallam S, Germanier R. A controlled field trial of live *Salmonella typhimurium* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: three-years results. J Infect Dis 1982; 145:292-296.
- 30.- Robbins JD, Robbins JB. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide Vi antigen of *Salmonella typhi*. J Infect Dis 1984; 150:436-449.
- 31.- Tacket CO, Ferreccio C, Robbins JB, Tsai C-M, Schulz D, Cadoz M, Goudeau A, Levine MM. Safety and characterization of the immune response to two *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine candidates. J Infect Dis 1986; 154:342-345.

- 32.- Acharya IL, Lowe C, Thapa R., Gurubacharya VI, Shrestha MB, Cadoz M, Schulz D, Armand J, Bryla DA, Trollfors B., Cramton T, Schneerson R, Robbins JB. Prevention of typhoid fever in Nepal with Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. N Engl J Med 1987; 317:1101-1114.
- 33.- Klugman KP, Gilbertson IT, Koornhof HJ, Robbins JB, Schneerson R, Schulz D, Cadoz M, Armand J. Vaccination Advisory Committee. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. Lancet 1987; 2:1165-1169.
- 34.- Hackett J, Wyk P, Reeves P, Mathan V. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. J Infect Dis 1987; 155:540-549.
- 35.- Fields PI, Groisman FA, Heffron F. *Salmonella* locus that controls resistant to microbicidal proteins from phagocytic cells. Science 1989; 243:1059-1062.
- 36.- Alpuche-Aranda C, Swason J, Loomis W, Miller S. FH dependent *Salmonella* gene transcription within phagosome inhibit lysosome fusion. American Society for Microbiology 92nd General Meeting. May 26-30 1992. New Orleans, Louisiana USA. Abstract 162, p 53.
- 37.- Weinstein DL, Carsiotis M, Lissner CH R, O'Brien AD. Flagella help *Salmonella typhimurium* survive within murine macrophages. Infect Immun 1984; 46:819-825.

- 38.- Schmit CK, Tesh VL, Carsiotis M, O'Brien AD. Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* virulence gene *muis*. American Society for Microbiology. 92nd General Meeting. 26-30 of May, 1992. New Orleans, Louisiana USA. Abstract 174, p 55.
- 39.- Mackaness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. J Exp Med 1964; 120:105-108.
- 40.- Blanden RV, Mackaness GB, Collins FM. Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. J Exp Med 1966; 124:588-600.
- 41.- Mackaness GB, Blanden RV, Collins FM. Host-parasite relations in mouse typhoid. J Exp Med 1966; 124:573-584.
- 42.- Collins FM. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice preimmunized with living or ethyl alcohol-killed vaccines. J Bacteriol 1969; 97:676-683.
- 43.- Mitushashi S, Sato I, Tanaka T. Experimental Salmonellosis: intracellular growth of *Salmonella enteritidis* ingested in mononuclear phagocytes of mice, and cellular basis of immunity. J Bacteriol 1961; 81:863-870.
- 44.- Saito K, Nakano M, Akiyama T, Ushiba D. Passive transfer of immunity to typhoid by macrophages. J Bacteriol 1962; 84:500-507.
- 45.- Mackaness GB. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage-activity *in vivo*. J Exp Med 1969; 129:973-992.

- 46.- Mackaness GB. Resistance to intracellular infection. J Infect Dis 1971; 123:439-446.
- 47.- Jenkin CR, Rowley D. Partial purification of the protective antigen of *Salmonella typhimurium* and its distribution among various strains of bacteria. Aust J Exp Biol Med 1956; 43:65-72.
- 48.- Herzberg M, Nash P, Hino S. Degree of immunity induced by killed vaccines to experimental salmonellosis in mice. Infect Immun 1972; 5:83-90.
- 49.- Ornellas EP, Roantree RJ, Steward JP. The specificity and importance of humoral antibody in the protection of mice against intraperitoneal challenge with complement-sensitive and complement-resistant *Salmonella*. J Infect Dis 1970; 121:113-123.
- 50.- Hochadel JF, Kenneth FK. Protective effects of passively transferred immune T or B-lymphocytes in mice infected with *Salmonella typhimurium*. J Infect Dis 1977; 135:613-623.
- 51.- Angerman CR, Eisenstein TK. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, acetone-killed cells, lipopolysaccharide and a live cell vaccine prepared from *S. typhimurium*. Infect Immun 1978; 19:575-582.
- 52.- Molinari JL, Larralde C. Acquired immunity to murine typhoid induced in mice with ribosomal fractions of *Salmonella typhimurium*. Rev Latinoamer Microbiol 1974; 16:189-197.

- 53.- Tato P, Flisser A, Gavilanes M, Molinari JL. Immunogenic complexes obtained from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* Ty2 by the bacterial acetone powder method. Ann Microbiol (Inst Pasteur) 1979; 130A:47-60.
- 54.- Kiefer W, Gransow P, Schmidt G, Westphal O. Salmonellosis in mice: Immunization experiments with *Salmonella-Escherichia coli* hybrids. Infect Immun 1976; 13:1517-1518.
- 55.- Kussi N, Nurminen M, Saxén H, Valtonen M, Makela PH. Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice. Infect Immun. 1979; 25:857-862.
- 56.- Kussi N, Nurminen M, Saxén H, Makela PH. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. Infect Immun 1981; 34:328-332.
- 57.- Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, González C, Moreno J, Kumate J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12.d.Vi. Infect Immun 1988; 56:2953-2959.
- 58.- Eisenstein TK, Deakins LW, Killar L, Saluk PH, Sultzler BM. Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3HeB/FeJ mice and other strains in the C3H lineage. Infect Immun 1982; 36:696-703.

59. Eisenstein TK, Killar LM, Sultzer BM. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: Mouse-strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J Infect Dis* 1984; 150:425-435.
- 60.- Tagliabue A, Villa L, Boraschi D, Peri G, Gori V, Nencioni L. Natural anti-bacterial activity against *Salmonella typhi* by human T4<sup>+</sup> lymphocytes armed with IgA antibodies. *J Immunol* 1985; 135:4178-4182.
- 61.- Nencioni L, Villa L, Boraschi D, Berti B, Tagliabue A. Natural and antibody-dependent cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by peripheral and intestinal lymphoid cells in mice. *J Immunol* 1983; 130:903-907.
- 62.- Tagliabue A, Nencioni L, Villa L, Keren DF, Lowell GH, Boraschi D. Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA. *Nature* 1983; 306:184-186.
- 63.- Tagliabue A, Boraschi D, Villa L, Keren DF, Lowell GH, Rappuoli R, Nencioni L. IgA-dependent cell-mediated activity against enteropathogenic bacteria: distribution, specificity, and characterization of the effector cells. *J Immunol* 1984; 133:988-992.
- 64.- Plant J, Glynn AA. Locating salmonella resistance gene on mouse chromosome 1. *Clin Exp Immunol* 1979; 37:1-6.
- 65.- O'Brien AD, Taylor BA, Rosenstreich DL. Genetic control of natural resistance to *Salmonella typhimurium* in mice during the late phase of infection. *J Immunol* 1984; 133:3313-3318.

- 66.- Benjamin WH Jr, Turnbough CHL Jr, Posey BS, Briles DE. *Salmonella typhimurium* virulence genes necessary to exploit the *lty<sup>s7s</sup>* genotype of the mouse. *Infect Immun* 1986; 51:872-878.
- 67.- Hormaeche CE. Natural resistance to *Salmonella typhimurium* in different inbred mouse strains. *Immunol* 1979; 37:311-318.
- 68.- Lissner CR, Swanson RN, O'Brien AD. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *lty* gene in peritoneal and splenic macrophages *in vitro*. *J Immunol* 1983; 131:3006-3013.
- 69.- O'Brien AD, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. Susceptibility of CBA/N mice to infection with *Salmonella typhimurium*: Influence of the X-linked gene controlling B lymphocyte function. *J Immunol* 1978; 123:720-724.
70. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott P, Formal SB. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: Role of the *lps* gene. *J Immunol* 1980; 124:20-24.
- 71.- Watson J, Riblet R. Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. *J Exp Med* 1974; 140:1147-1153.
- 72.- O'Brien AD, Weinstein DA, Soliman MY, Rosenstreich DL. Additional evidence that the *lps* gene locus regulates natural resistance to *S. typhimurium* in mice. *J Immunol* 1985; 134:2820-2823.

- 73.- Fuhrman JA, Cebra JJ. Special features of the priming process for a secretory IgA response. J Exp Med 1981; 153:534-544.
- 74.- Collins FM. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in nonvaccinated mice challenged by various routes. J Bacteriol 1969; 97:667-675.
- 75.- Svennerholm AM, Lange S, Holmgren J. Intestinal immune response to cholera toxin: Dependence on route and dosage of antigen for priming and boosting. Infect Immun 1980; 30:337-341.
- 76.- Pierce NF, Gowans JL. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. J Exp Med 1975; 142:1550-1563.
- 77.- Hamilton SR, Yardley JH, Brown GD. Suppression of local intestinal immunoglobulin A immune response to cholera toxin by subcutaneous administration of cholera toxoids. Infect Immun 1979; 24:422-426.
- 78.- Keren DF, Scott PJ, McDonald RA, Wiatrak M. Effect of parenteral immunization on the local immunoglobulin A response of the intestine to *Shigella flexneri* antigens. Infect Immun 1983; 42:202-207.
- 79.- André C, Heremans JF, Vaerman JP, Cambiaso CL. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: Antigen-antibody complexes. J Exp Med 1975; 142:1509-1519.

- 80.- Pierce NF. Induction of optimal mucosal antibody responses: Effects of age, immunization route(s), and dosing schedule in rats. *Infect Immun* 1984; 43:341-346.
- 81.- Dunkley ML, Husband AJ. The induction and migration of antigen-specific helper cells for IgA responses in the intestine. *Immunol* 1986; 57:379-385.
- 82.- Reed IJ., and Muench H. A simple method of estimating fifty percent points. *Am J Hyg* 1938; 27:439.
- 83.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- 84.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- 85.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
86. Calderón GM. Análisis de la respuesta inmune contra fracciones antigénicas de *Salmonella typhimurium* y su correlación con protección. (Tesis de Maestría). Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. 1991.
- 87.- Lamb JR, O'Hehir R, Young D. The use of nitrocellulose immunoblots for the analysis of antigen recognition by T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1988; 110:1-10.

- 88.- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969; 244:4406-4412.
89. Williams F. Razonamiento estadístico. Nueva Editorial Interamericana, 2<sup>a</sup> edición, México, 1988.
- 90.- Elson CO, Calding W, Lefkowitz J. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *J Immunol* 1984; 67:101-108.
- 91.- Ortiz-Ortiz L, Ximénez C, Mendoza F, Michalk C, Melendro EI, Oliva A. *Entamoeba histolytica*: specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp Parasitol* 1986; 61:390-397.
92. Taylor CR. Immunoperoxidase Techniques: Practical and Theoretical Aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102:113-121.
93. Pierce NF. Suppression of the intestinal immune response to cholera toxin by specific serum antibody. *Infect Immun* 1980; 30:62-68.
94. Crabbe PA, Nash DR, Bazin H, Eyessen H, Heremans JF. Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germ free mice after oral or parenteral immunization with ferritin. *J Exp Med* 1969; 130:723-744.
95. Fubara ES, Freter R. Availability of locally synthesized and systemic antibodies in the intestine. *Infect Immun* 1972; 6:964-981.

96. Issekutz BT, Chin W, Hay JB. Lymphocyte traffic through granulomas: Differences in the recovery of indium-111-labeled lymphocytes in afferent and efferent lymph. *Cell Immunol* 1980; 54:79-86.
97. Cahill RNP, Poskitt DC, Frost H, Trnka Z. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: Migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J Exp Med* 1977; 145:420-428.
98. Mackay CHR, Martson WL, Dudler L, Spertini O, Tedder TF, Hein WR. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur J Immunol* 1992; 22:887-895.
99. Gearhart PJ, Cebra JJ. Differentiated B lymphocytes. Potential to express particular antibody variable and constant regions depends on site of lymphoid tissue and antigen load. *J Exp Med* 1979; 216-217.
100. Roitt J, Brostoff J, Male D. *Immunology*. J.B. Lippincott Company 2nd Edition. Philadelphia, 1989.
101. Sziegoleit A. Secretory immunoglobulins and serum antibodies after oral infection of the white mouse with *Salmonella typhimurium*. *Immunitatsforsch Immunobiol* 1976; 152:244-259.
102. Metcalf ES, O'Brien AD. Characterization of murine antibody response to *Salmonella typhimurium* by a class-specific solid-phase radioimmunoassay. *Infect Immun* 1981; 31:33-34.

103. Eddie DS, Schulkid ML, Robbins JB. The isolation and biological activities of purified secretory IgA and IgG anti-*Salmonella typhimurium* "O" antibodies from rabbit intestinal fluid colostrum. *J Immunol* 1971; 106:181-190.
104. Svenson SB, Nurminen M, Lindberg AA. Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1979; 25:863-872.
105. Angerman CR, Eisenstein TK. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1978; 19:575-588.
106. Germanier R. Immunity in experimental salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1972; 5:792-797.
107. Robertson JA, Lindberg AA, Hoiseth S, Stocker BAD. *Salmonella typhimurium* infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 1983; 41:742-750.
108. Lindberg AA, Robertson JA. *Salmonella typhimurium* infection in calves: Cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 1983; 41:751-757.

109. Srisrat P, Reynolds BL, Rowley D. The correlation between serum IgA antibody levels and resistance to infection with *Salmonella typhimurium* after oral immunization with various *Salmonellae*. *Aus J Exp Biol Med Sci* 1985; **63**:177-182.
110. Galan JE, Curtiss III R. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *InvA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* 1991; **59**:2901-2906.
111. Ferreccio C, Levine MM, Rodriguez H, Contreras R. Comparative efficacy of two, three, or four doses of TY21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsules: A field trial in an endemic area. *J Infect Dis* 1989; **159**:766-769.
112. Forrest BD, LaBrooy JT, Beyer L, Dearlove ChE, Shearman DJC. The human humoral immune response to *Salmonella typhi* Ty21a. *J Infect Dis* 1991; **163**:336-345.
113. Kantele A. Immune response to prolonged intestinal exposure to antigen. *Scand J Immunol* 1991; **33**:215-219.
114. Robertsson JA, Fossum C, Svenson SB, Lindberg AA. *Salmonella typhimurium* infection in calves: Specific immune reactivity against O-antigenic polysaccharide detectable in *in vitro* assays. *Infect Immun* 1982; **37**:728-736.
115. Matsui K, Arai T. Protective immunity induced by porin in experimental mouse salmonellosis. *Microbiol Immunol* 1989; **33**:699-708.

116. Collins EM, Mackaness GB. Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance in *Salmonella*-infected mice. *J Immunol* 1968; **101**:830-845.
117. Killar LM, Eisenstein TK. Differences in delayed-type hypersensitivity responses in various mouse strains in the C3H lineage infected with *Salmonella typhimurium*, strain SL3235. *J Immunol* 1984; **113**:1190-1196.
118. Killar LM, Eisenstein TK. Delayed-type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1986; **52**:504-508.
119. Foulaki K, Schlechi S. Isolation and immunological characterization of 65-kilodalton surface protein from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1989; **57**:1399-1404.
120. Gaston JSH, Life PF, Bailey LC, Bacon PA. *In vitro* responses to a 65-kilodalton mycobacterial protein by synovial T cells from inflammatory arthritis patients. *J Immunol* 1989; **143**:2494-2500.
121. Young DB, Ivanyi J, Cox JH, Lamb JR. The 65 kDa antigen of mycobacteria—a common bacterial protein? *Immunol Today* 1987; **8**:215-219.
122. Thole J ER, Hinderesson P, Bruyn J de, Cremers F, Zee J van der, Cock H de, Tommansen J, Eden W van, Embden J DA van. Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDa mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen. *Microb Pathog* 1988; **4**:71-78.

123. Morris DD, Morre JN. The effect of immunity to core lipopolysaccharide (LPS) on the production of thromboxane and prostacyclin by equine peritoneal macrophages. *Cornell Vet* 1989; 79:231-247.
124. Cavailion JM, Cavailion NH. The role of serum in interleukin 1 production by human monocytes activated by endotoxins and their polysaccharide moieties. *Immunol Lett* 1985; 10:35-41.
125. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanism of endotoxin resistance. *Science* 1986; 232:977-980.
126. Duran LW, Metcalf ES. Clonal analysis of primary B cells responsive to the pathogenic bacterium *Salmonella typhimurium*. *J Exp Med* 1987; 165:340-358.
127. Lee J-C, Gibson CW, Eisenstein TK. Macrophage-mediated mitogenic suppression induced in mice of the C3H lineage by a vaccine strain of *Salmonella typhimurium*. *Cell Immunol* 1985; 91:75-91.
128. Brunner H, Kroll HP. Reduced proliferative response of mouse spleen cells to mitogens during infection with *Salmonella typhimurium* or *Listeria monocytogenes*. *Microbial Pathogenesis* 1989; 6:265-276.

129. Dialynas DP, Quan ZS, Wall KA, Pierres A, Quintáns J, Loken MR, Pierres M, Fitch FW. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J Immunol* 1983; 131:2445-2451.
130. Galdiero F, Benedetto N, Quarto N, Romano C. Cellular response in *Salmonella typhimurium*-infected mice: Evaluation of *Salmonella* receptors of B lymphocytes. *Infect Immun* 1978; 21:349-353.