



300627
11
20

UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**IDENTIFICACION DE LINFOCITOS T
CITOTOXICOS MURINOS
ESPECIFICOS CONTRA ANTIGENOS
DE *Salmonella typhimurium*.**

**T E S I S
P R O F E S I O N A L**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A

CECILIA BELEM MARTINEZ PARRA

**Q.F.B. MARTHA A. MUSTRE DE LEON.
ASESOR DE TESIS.**

MEXICO D.F.

1994

**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).

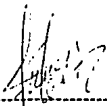
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

México, D.F. a 17 de agosto de 1994.

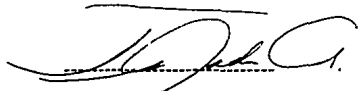
DIRECCION GENERAL DE INCORPORACION
Y REVALIDACION DE ESTUDIOS
P R E S E N T E.

A quien corresponda:

La presente es con el fin de informar a usted que la Tesis de Licenciatura de Química Farmacéutica Bióloga de la Srita. Cecilia Belem Martínez Parra titulada: " **IDENTIFICACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS MURINOS ESPECIFICOS CONTRA ANTIGENOS DE Salmonella typhimurium** " cumple con los requisitos necesarios para su titulación.



Q.F.B. Martha A. Mustre de León.
Asesor de Tesis.



Q. Ma. Teresa Estrada Alvarado.
Director de la Escuela de
Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

Por medio de la presente hago constar que el presente trabajo presentado por Cecilia Belem Martínez Parra de la carrera de Química Farmacéutica Bióloga ha sido concluido y revisado debidamente, quedando de manifiesto que el proyecto que lleva por título:

IDENTIFICACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS MURINOS ESPECIFICOS CONTRA ANTIGENOS DE Salmonella typhimurium.

cumple con los requisitos de manera aceptable, otorgando con ello mi visto bueno.

ATENTAMENTE.



Q.F.B. Martha A. Mustre de León.
Director de Tesis Interno.



Dr. Vianny F. Ortiz Navarrete.
Director de Tesis Externo.

REVISORES ASIGNADOS POR EL H. CONSEJO DE APROBACION DE
PROYECTOS DE TESIS.

Estoy de acuerdo que el presente trabajo que lleva por titulo :
**IDENTIFICACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS MURINOS
ESPECIFICOS CONTRA ANTIGENOS DE Salmonella typhimurium**
presentado por Cecilia Belem Martínez Parra de la carrera de Química Farmacéutica
Bióloga es aceptable para sustentar su Examen Profesional.



DR. MARIANO RAMIREZ DEGOLLADO.



DR. JOSE DOMINGO MENDEZ.



Q.F.B. ENRIQUE CALDERON GARCIA.

Este proyecto se realizó en los laboratorios de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de Q.F.B. Martha A. Mustre de León, Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete y Q.F.B. José Antonio García M.

Con profundo y especial agradecimiento a:

**Dr. Vianney F. Ortíz Navarrete, por su dirección y asesoría
en la realización de este proyecto, por su valiosa ayuda,
consejos, apoyo y amistad.**

**Dr. Armando Isibasi A. Jefe de la Unidad de
Investigación Médica en Inmunoquímica,
por brindarme la oportunidad de colaborar
en sus proyectos de investigación.**

**A Q.F.B. Martha A. Mustre de León por su
dirección y apoyo en la realización de este trabajo.**

**A José Antonio García M. maestro y
amigo por su valiosa colaboración en la
revisión de este trabajo.**

**A Natalia Martín compañera de
laboratorio por su ayuda y apoyo en
todo momento.**

**Gracias también a todas las personas de la Unidad
de Investigación Médica en Inmunología
que de alguna manera contribuyeron
en la realización de este trabajo.**

Con todo mi amor, cariño, respeto y admiración a mis padres:

José y Cecilia

De quienes he heredado lo más valioso que un ser humano puede poseer; el amor a la vida y a mis semejantes, mi educación en todos los aspectos que siempre ha sido con valores firmes palabras amorosas y buenos consejos. Por ser padres, amigos, compañeros, consejeros y tantas y tantas profesiones que por educar a sus hijos son capaces de desempeñar de la mejor manera y con una sonrisa siempre para nosotros.

A quienes amo no por lo que hacen por mí, sino por lo que soy gracias a ellos.

A mis hermanos:

José, Miguel Angel y Pedro

**A quienes tanto quiero y de quienes tanto
cariño y apoyo he recibido.**

**Porque siempre me han brindado todo su
amor y confianza, y han llenado mi
vida de alegría.**

**De ustedes admiro todo lo que son, porque
son los mejores hermanos que Dios me
pudo brindar.**

Con mucho cariño a Maricarmen y mi sobrino.

**Quienes forman parte de esta hermosa familia
que sigue creciendo y creciendo.**

A Raúl por ser mi gran amigo y compañero,
por todo su apoyo, consejos, ayuda y amor.
Por estar siempre a mi lado en todo momento.
A ti que has compartido todos mis momentos
de alegría y otros tantos de enojo. Por todo lo
que significas en mi vida.

A mis amigos, porque siempre sigamos conservando
nuestra amistad a través de toda la vida,
brindándonos apoyo, compañía
y buenos consejos.

**A ti Señor por estar presente en cada paso que doy, por
brindarme la libertad de elegir, por otorgarme tantas oportunidades
para ser completamente feliz.**

Infinitas Gracias.

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCION.....	2
3.	GENERALIDADES.....	3
	3.1. INFECCION POR <i>Salmonella typhimurium</i>	3
	3.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA INFECCION POR <i>Salmonella typhimurium</i>	6
	3.2.1. Gen Ity.	
	3.2.2. Gen LPS.	
	3.2.3. Gen Xid.	
	3.3. PROCESAMIENTO DE ANTIGENO.....	9
	3.3.1. Vía Citosólica.	
	3.3.2. Vía Endosomal.	
4.	OBJETIVOS.....	13
	4.1. OBJETIVO GENERAL.	
	4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	
5.	MATERIALES Y METODOS.....	14
	5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	14
	• Ratonés.	
	5.2. ESQUEMA DE INMUNIZACION.....	14
	5.2.1. Inmunización de ratones con células de bazo alogénicas.	
	5.2.2. Infección de ratones con <i>Salmonella typhimurium</i> .	
	5.3. METODOS BACTERIOLOGICOS.....	15
	5.3.1. Cepas Bacterianas.	
	5.3.2. Cultivo de la cepa bacteriana.	
	5.3.3. Digestión de la bacteria para obtener péptidos .	

5.4. METODOS ANALITICOS.....	17
5.4.1. Determinación de proteína (METODO DE LOWRY).	
5.4.2. Cuenta viable de bacteria.	
5.5. METODOS INMUNOLOGICOS.....	18
5.5.1. Líneas celulares.	
5.5.2. Obtención de esplenocitos.	
5.5.3. Obtención de macrófagos peritoneales.	
5.5.4. Infección de macrófagos <i>in vitro</i> .	
5.6. OBTENCION DE CELULAS EFECTORAS.....	21
5.6.1. Cultivo Mixto de Linfocitos.	
• Respuesta primaria.	
• Respuesta secundaria.	
5.6.2. Obtención de células efectoras anti- <i>Salmonella</i> .	
5.7. PREPARACION DE CELULAS BLANCO.....	22
5.8. ENSAYO DE LIBERACION DE CROMO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD CITOTOXICA.....	23
5.9. ENSAYO DE CITOFLUOROMETRIA INDIRECTA (FACS).....	24
6. RESULTADOS.....	26
6.1. ANALISIS DE LA EXPRESION EN LA SUPERFICIE DE MOLECULAS DE CLASE I Y DE CLASE II EN LA LINEA P388 D1.....	26
6.2. INDUCCION DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DE CLASE I Y CLASE II EN LA LINEA P388 D1 CULTIVADA EN MEDIO DE CULTIVO RICO EN LINFOCINAS.....	28

6.3.	EXPRESION DE MOLECULAS DE CLASE I Y CLASE II EN MACROFAGOS PERITONEALES Y MACROFAGOS PERITONEALES CULTIVADOS CON MEDIO DE CULTIVO RICO EN LINFOCINAS.....	30
6.4.	ANALISIS DE GENERACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS ANTI- <i>Salmonella</i> . ESTIMULACION CON CELULAS P388 D1 INFECTADAS.....	32
6.5.	ENSAYO DE INFECCION <i>in vitro</i>	34
6.6.	ANALISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CELULAS BLANCO A LA LISIS POR LINFOCITOS T CITOTOXICOS.....	36
6.7.	ANALISIS DE GENERACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS ANTI- <i>Salmonella</i> . ESTIMULACIONES CON MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON BALB/ c.....	38
6.8.	ACTIVIDAD CITOTOXICA EN RATONES INFECTADOS Y REESTIMULADOS CON PEPTIDO.....	40
7.	DISCUSION.....	42
8.	CONCLUSION.....	45
9.	BIBLIOGRAFIA.....	46

INDICE DE FIGURAS

1. Representación esquemática del procesamiento de antígeno en la infección por <i>Salmonella typhimurium</i>	12
2. Expresión de moléculas K ^d y L ^d sobre la superficie de la línea de monocitos-macrófagos P388 D1.....	27
3. Análisis de la expresión de moléculas clase I y clase II sobre la superficie de la línea celular P388 D1 activadas	29
4. Expresión de moléculas de clase I y clase II en macrófagos peritoneales activados y sin activar	31
5. Ausencia de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de <i>Salmonella typhimurium</i>	33
6. Citotoxicidad en poblaciones de esplenocitos de ratones BALB/c infectados con <i>Salmonella typhimurium</i> LT2.....	39
7. Actividad citotóxica en esplenocitos de ratón BALB/ c reestimulados con péptido.....	41

INDICE DE TABLAS

1. Cuenta en placa de bacteria empleada en infecciones de diferentes tipos de células.....	35
2. Análisis de la susceptibilidad a lisis por linfocitos T citotóxicos en diferentes líneas celulares.....	37

ABREVIATURAS

Ity	Gen que codifica la susceptibilidad a la infección por <i>S.typhimurium</i> .
IL	Interleucina.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
TcR	Receptor de antígeno del linfocito T
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
H-2	Complejo de histocompatibilidad del ratón.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecilsulfonato de sodio.
LPS	Lipopolisacárido.
Lps	Gen que codifica la respuesta a lipopolisacárido.
Con A	Concanavalina A.
FITC	Conjugado de inmunoglobulina conejo anti-ratón isocianato de fluoresceína.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
BHI	Infusión cerebro corazón.
MIPs	Proteínas inducidas en el macrófago.
MUp-1	Proteína urinaria mayor.
Tap	Transportador de péptidos antigénicos.
LTC's	Linfocitos T citotóxicos.
Ig	Inmunoglobulina.
Tris	Hidroximetil amino-metano.
SSI	Solución salina isotónica.
UFC	Unidad formadora de colonias.
MFC	Media canal de fluorescencia.

INF γ	Interferón gamma.
Nrmp	Proteína de resistencia natural en macrófagos.
Poly -I	Polinucitol.
PPD	Derivado purificado de proteína de <i>Micobacterium</i>
LFA	Molécula de adhesión de linfocitos.

1. RESUMEN.

En el presente trabajo se analizó la generación de linfocitos T citotóxicos en ratones infectados subletalmente con *Salmonella typhimurium*. Para lo cual, 10 días después de la administración de la bacteria, los esplenocitos fueron estimulados *in vitro*, de tres maneras diferentes: a) con la línea monocito-macrófagos P388 D1 infectada con *Salmonella*, b) con macrófagos peritoneales infectados con *Salmonella* y c) con una mezcla de péptidos obtenidos de la tripsinización de la bacteria. La actividad citotóxica presente en los cultivos fue evaluada mediante el ensayo de liberación de ^{51}Cr empleando como células blanco, la línea P388 D1 o los macrófagos peritoneales.

Solamente se observó actividad citotóxica cuando se emplearon los péptidos durante la estimulación, aunque la magnitud de la lisis refleja una respuesta inmune primaria más que una respuesta inmune secundaria. La ausencia de actividad citotóxica cuando se emplearon las diferentes células durante la estimulación, no se debió ni a la falta de moléculas de clase I del sistema principal de histocompatibilidad (MHC), ni a la falta de señales coestimuladoras.

Los resultados obtenidos señalan que durante la infección con *Salmonella typhimurium* no se induce respuesta de linfocitos T citotóxicos, estos hallazgos sugieren que la magnitud de la multiplicación intracelular de la bacteria, pudiera interferir con la generación de péptidos bacterianos que se presentan por moléculas de clase I, puesto que se ha descrito que es posible inducir respuesta de linfocitos CD8^+ con la inmunización de cepas avirulentas de *Salmonella*, las cuales tienen la característica de multiplicarse muy poco dentro del fagosoma.

2. INTRODUCCION.

La respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ conlleva a la lisis de células blanco. Este tipo de respuesta inmune específica es el efecto más importante contra virus, antígenos tumorales y todo tipo de antígenos intracelulares.

En el caso de las infecciones por patógenos el beneficio de esta citólisis es la liberación del agente infeccioso para así hacerlo accesible a otros mecanismos de la respuesta inmune específica, por ejemplo los anticuerpos. Existe la posibilidad de que *Salmonella*, al igual que otras bacterias intracelulares pueda pasar de un compartimento de la vía endocítica al citosol donde los antígenos serían presentados en el contexto de moléculas de clase I a linfocitos T citotóxicos. Este mecanismo se lleva a cabo en la infección por *Listeria monocytogenes*, donde la listeriolisina le permite perforar la membrana del compartimento endosomal y pasar al citosol.¹ En el caso de que un mecanismo similar se llevara a cabo en *Salmonella* los LCT's participarían como células efectoras lisando las células infectadas, lo que facilitaría la fagocitosis de estas bacterias por macrófagos previamente activados, que finalmente llevarían a la eliminación de la bacteria.²

Salmonella typhimurium es una bacteria Gram negativa clasificada como patógeno intracelular, capaz de invadir y multiplicarse dentro de células epiteliales y macrófagos, por lo tanto, durante esa fase de la infección la bacteria no es accesible a los mecanismos de la respuesta inmune específica, tales como anticuerpos neutralizantes.

La inducción de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ anti-*Salmonella* no se ha estudiado, sin embargo, evidencias experimentales indican que, ratones inmunizados por vía oral o intraperitoneal con una *Salmonella typhimurium* atenuada en la cual se han clonado y expresado los genes para la nucleoproteína de influenza o de la proteína circumsporozoita de *Plasmodium*, fue posible generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ contra esos antígenos exógenos;^{3,4} lo que sugiere que también

podiera existir una respuesta de ese tipo contra los antígenos de la bacteria. Por lo tanto se planteó evaluar si se genera respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium* en ratones infectados con la bacteria homóloga, la cual es un modelo natural de infección.

3. GENERALIDADES.

3.1. INFECCION POR *Salmonella typhimurium*.

La salmonelosis murina, infección causada por *Salmonella typhimurium*, es un modelo experimental que constituye la mejor alternativa para el estudio de la fiebre tifoidea, pues ambas tienen una patogenia semejante.⁵ La enfermedad se adquiere por la ingestión de agua o alimentos contaminados.⁶ El periodo de incubación es de 3 a 6 días, el cuadro clínico puede variar desde una infección leve a una infección aguda y mortal. Los ratones se muestran menos activos, adoptan una postura encorvada con distensión abdominal, el pelaje es áspero, pierden peso, a veces tienen diarrea y presentan esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía.⁷

Las *Salmonellas* ingeridas por vía oral se dirigen al intestino delgado distal donde atraviesan el epitelio intestinal, asociándose posteriormente a las células M en las placas de Peyer; de aquí se disemina vía linfática a todo el sistema sanguíneo y al sistema fagocítico mononuclear. Las salmonellas son fagocitadas por los macrófagos dentro de los cuales sobreviven y se multiplican para así ser transportadas a los ganglios linfáticos regionales, el bazo y el hígado, donde la bacteria continúa multiplicándose, llegando a alcanzar una densidad de 10^8 bacterias/ órgano, para finalmente diseminarse por vía sanguínea^{8,9}, lo que conduce a una bacteremia incontrolable y al choque endotóxico, que causa rápidamente la muerte. Es importante resaltar que el mecanismo básico de patogenicidad de todas las *Salmonellas*, es su capacidad de invadir (penetrar), sobrevivir y multiplicarse en diferentes tipos de células del huésped tales como células epiteliales y macrófagos.¹⁰

Los mecanismos moleculares de virulencia involucrados en la fase de invasión y multiplicación intracelular, sólo se conocen parcialmente; primero la bacteria es fagocitada por el macrófago alcanzando con ello la vía endocítica, es decir, que

intracelularmente la bacteria se va a localizar dentro de vacuolas endosomales genéricamente denominadas fagosomas. Posteriormente el fagosoma se fusionará con los lisosomas para formar la estructura conocida como fagolisosoma y es dentro de éste, donde las bacterias son destruidas por la acción de diversos mecanismos oxidativos y no oxidativos.¹¹

Ha sido demostrado que la mitad de los fagosomas, donde *Salmonella* es capaz de multiplicarse; no se fusionan con los lisosomas, por lo tanto, la inhibición de la formación del fagolisosoma es el mecanismo fundamental de virulencia que le permite a las *Salmonellas* sobrevivir dentro del macrófago.¹² Muy poco se conoce acerca de las moléculas bacterianas involucradas en este proceso pero se ha descrito que alrededor de 30 diferentes proteínas llamadas genéricamente proteínas inducidas en el macrófago (MIPs) son sintetizadas únicamente cuando *S. typhimurium* se localiza dentro de macrófagos.^{13,14} Lo anterior llevó a proponer que esas proteínas pudieran ser las responsables de la inhibición de la formación del fagolisosoma y de que las bacterias se multiplicaran intracelularmente. De las 30 proteínas las únicas caracterizadas hasta la fecha son las proteínas de choque térmico GroEL y Dnak.¹⁰ Otros factores que tal vez estén involucrados en la virulencia, son los productos del sistema de genes *phoP* y *phoQ*, ya que bacterias con mutaciones en esos genes no son capaces de sobrevivir dentro de los macrófagos por lo que son avirulentas para los ratones.^{15,16}

3.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA INFECCION POR *Salmonella typhimurium*.

En el control de la infección por *Salmonella typhimurium* participan tanto los mecanismos de resistencia natural como los mecanismos de inmunidad específica. La resistencia natural de los ratones a la infección esta controlada por diferentes genes:

3.2.1. Gen *Ity*.

En el desarrollo de la infección por *S. typhimurium* en ratones la influencia de un gen de susceptibilidad, denominado *Ity^s*, el cual esta codificado en el cromosoma I, controla la velocidad de crecimiento de la bacteria dentro del bazo e hígado. Se desconoce la forma exacta como actúa, pero es importante la participación de este gen durante la fase temprana de la infección. Los ratones BALB/c y C57Bl/6 tiene un alelo homocigoto de sensibilidad, (*Ity^{s/s}*), a la infección porque no pueden controlar la replicación temprana en bazo e hígado; de la *Salmonella*; y mueren en menos de 10 días de post-inoculación, observándose además un aumento paralelo en el peso del bazo.¹⁷ Los ratones A/J, CBA; DBA/2 y C3HeB/ FeJ tienen un alelo dominante, (*Ity^{r/s}*, *Ity^{r/r}*), de resistencia a la infección,^{18,19} es decir, son capaces de controlar bien el crecimiento bacteriano.^{20,21} Se ha demostrado que los linfocitos T no juegan un papel importante en la actividad del gen ⁷ y el producto del mismo es una proteína, denominada Nrmp, que se localiza en la membrana de los endosomas; donde es muy probable que funcione como una bomba para compuestos derivados del óxido nítrico, aunque aún no está establecido el mecanismo molecular que permite el control de la multiplicación bacteriana, ni cual es la diferencia entre los alelos de susceptibilidad y resistencia.²²

3.2.2. Gen *Lps*.

Estudios genéticos permitieron identificar el locus *Lps*^{23,24} en el cromosoma 4, del ratón, estrechamente unido al locus que codifica para la proteína urinaria mayor (Mup-1).^{25,26} Este gen participa en el control de la respuesta a la endotoxina o LPS, de las *Salmonellas*, así los ratones C3HeB/ FeJ, que son homocigotos o los ratones BALB/c y C57BL/6, que son heterocigotos para el alelo normal *Lps*ⁿ, mueren por la administración de dosis bajas de endotoxinas; mientras que los ratones C3HeB/ FeJ homocigotos para el alelo defectivo *Lps*^d son resistentes a los efectos letales del LPS^{20,27}. El hecho de que el ratón C3HeB/ FeJ sea resistente a los efectos letales del LPS ha proporcionado un modelo importante para investigar el control genético de la respuesta a la endotoxina tanto *in vivo* como *in vitro*.^{28, 29}

Se ha descrito que los linfocitos B de los ratones C3HeB/ FeJ no responden al estímulo policlonal del LPS y esta ausencia de proliferación celular es intrínseca a la célula B y no a la presencia de células supresoras o a la falta de linfocitos T cooperadores; además, existen evidencias que sugieren que la interacción del LPS con los linfocitos B de C3HeB/ FeJ producen una señal inhibitoria para la actividad celular³⁰ ya que los linfocitos B de estos ratones responden a otros mitógenos, como el Sulfato de dextrán, Poly-I y PPD.

Por otro lado, los ratones C3HeB/ FeJ son altamente susceptibles a infección por *S. typhimurium* a pesar de ser *Ity*^r³¹. Esta susceptibilidad parece también estar controlada por el alelo *Lps*^d, O'Brien y Rosenstreich proponen que la multiplicación no controlada de *S. typhimurium*, en esos ratones, puede resultar de la incapacidad de los macrófagos, *Lps*^d, de ser activados por el LPS²⁷.

3.2.3. Gen Xid.

Este tercer locus es un alelo recesivo ligado al cromosoma X que confiere susceptibilidad a *S. typhimurium* en pocas cepas de ratones (CBA/N).³² Es un gen aún no localizado, que no está ligado a los genes del complejo principal de histocompatibilidad. Participa para la susceptibilidad en la fase tardía de la infección.³³ La susceptibilidad innata a *S. typhimurium* de estos ratones es una consecuencia en la respuesta disminuida y retardada de anticuerpos IgG contra la bacteria ya que en fases más tardías de la infección, el control de ella depende de la producción de anticuerpos y del desarrollo de inmunidad celular.

Como se mencionó anteriormente la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune mediada por células participan en el establecimiento de inmunidad específica protectora contra la infección por *Salmonella typhimurium*. Así tenemos que la transferencia de anticuerpos específicos dirigidos contra componentes de la membrana externa tales como el antígeno somático O, o bien anticuerpos contra las proteínas de membrana externa (porinas), han demostrado que son capaces de transferir protección contra el reto con la bacteria homóloga^{34,35}. Sin embargo, se considera que la inmunidad mediada por linfocitos T, es la rama de la respuesta inmune más importante para llegar a establecer inmunidad protectora, debido a que, los linfocitos T CD4⁺ secretan una serie de linfocinas tales como: IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6³⁶ indispensables para la diferenciación del linfocito B a célula plasmática secretora de anticuerpos específicos anti-*Salmonella*, así como también liberan interferón gamma (INF γ), linfocina requerida para la activación de macrófagos, los cuales podrán de esa manera destruir las bacterias intracelulares.³⁷ En este contexto se ha descrito que ratones que se recuperan de una infección subletal por *Salmonella typhimurium*, presentan un estado de inmunidad adquirida, independientemente de su *Ity*, el cual se manifiesta por su capacidad de eliminar el inóculo bacteriano primario y por una resistencia a un segundo reto con la

misma bacteria. La participación de linfocitos T CD4⁺ en el establecimiento de esta inmunidad protectora, ha quedado de manifiesto por el hecho de que ratones a los que se les eliminan sus linfocitos T CD4⁺, pierden la capacidad de controlar la multiplicación de la bacteria así como también pierden la resistencia a la reinfección, además la transferencia, a ratones no inmunes, de linfocitos T CD4⁺ provenientes de los ratones infectados subletalmente, confieren inmunidad protectora.³⁸ Por otro lado, la participación de los linfocitos T CD8⁺, en los mecanismos de protección contra *Salmonella* no ha sido estudiado en detalle a pesar de que su participación podría ser de gran utilidad para liberar las bacterias residentes dentro de los macrófagos infectados.^{39,40}

3.3. PROCESAMIENTO DE ANTIGENO.

La penetración de un agente infeccioso en un organismo desencadena una serie de reacciones inmunes que tiene como resultado el establecimiento de un estado de protección el cual confiere al individuo inmunidad específica contra un contacto posterior con el mismo patógeno. Estas reacciones no se limitan a una resistencia adquirida, sino que constituyen un conjunto de fenómenos que intervienen en la fisiopatología de la enfermedad y pueden influir en la respuesta del huésped al agente infeccioso.⁴¹

En la inducción de la respuesta inmune específica participan fundamentalmente tres diferentes poblaciones celulares: linfocitos B, linfocitos T y células presentadoras de antígeno (CPA). La interacción del antígeno con los linfocitos B se lleva a cabo a través de la inmunoglobulina de superficie de los linfocitos B, este receptor para el antígeno es capaz de reconocer proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos, en su estado

nativo, así como también estructuras secuenciales de ellos. La consecuencia de la interacción entre el antígeno y la inmunoglobulina de superficie del linfocito B, es la proliferación y diferenciación de éste a célula plasmática secretora de anticuerpos específicos.

Los linfocitos T tienen en su superficie un receptor para el antígeno (TcR), el cual solamente es capaz de interactuar con péptidos antigénicos presentados éstos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Lo que significa que las CPA tienen que degradar (procesamiento del antígeno) los antígenos proteicos a péptidos.⁴² De acuerdo al origen de los antígenos reconocidos por los linfocitos T se han propuesto dos vías de procesamiento de antígeno: la vía citosólica y la vía endosomal

3.3.1. Vía Citosólica.

La vía citosólica provee los determinantes antigénicos que son presentados por moléculas de clase I del MHC a linfocitos T citotóxicos CD8⁺.^{43,44} A los antígenos presentados por moléculas de clase I del MHC, se les conoce como antígenos endógenos debido a que la mayoría de ellos son proteínas sintetizadas por la misma CPA, entre estos se incluyen antígenos virales, antígenos tumorales así como a todas las proteínas citosólicas de la misma CPA; sin embargo, también pueden ser presentados en el contexto de moléculas de clase I antígenos que no fueron sintetizados por la CPA pero que son liberados al citosol, como es el caso de péptidos de bacterias que rompen el fagolisosoma. Es decir, que el principal sitio de procesamiento de los antígenos endógenos es el citosol, aunque también algunos de los péptidos presentados por moléculas de clase I del MHC pueden ser generados en el lumen del retículo endoplásmico.⁴⁵

Se ha propuesto que el complejo multicatalítico proteasoma, es la proteasa encargada de degradar los antígenos endógenos; esta hipótesis se basa en que los proteasomas, son la proteasa más abundante del citosol ⁴⁶ y a que dos de las 20 diferentes subunidades que la constituyen están codificadas dentro del MHC.⁴⁷ Los péptidos generados en el citosol son translocados al lumen del retículo endoplásmico mediante un heterodímero, formado de las subunidades Tap1 y Tap2 (transportadores de péptidos antigénicos), los cuales están codificados dentro el MHC.⁴⁸ (Fig. 1, Proporcionada por el Dr. Vianney Ortiz Navarrete; de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico S. XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.)

3.3.2. Vía Endosomal.

Las moléculas clase II del MHC presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T cooperadores CD4⁺, estos péptidos provienen de proteínas exógenas internalizadas por la CPA mediante los diferentes mecanismos de endocitosis, los cuales son degradadas dentro de los endosomas y/o lisosomas por la acción de las proteasas de la familia de las catepsinas.⁴⁹ (Fig. 1)

La activación de estas células no sólo depende de la unión del complejo receptor (TcR)- CD3 al antígeno asociado a moléculas de histocompatibilidad, ya que existen otras moléculas en la superficie de los linfocitos T que intervienen en la regulación de la adhesión con la CPA, por ejemplo los correceptores CD4⁺ y CD8⁺ interactúan con la moléculas de clase II y de clase I respectivamente, así como también intervienen las moléculas CD2 que interactúa con la molécula LAF-3 y CD28 que interacciona con B7. Y es el conjunto de todas estas interacciones las responsables de que el linfocito T pueda llevar a cabo su función específica.⁵⁰

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESAMIENTO DE ANTIGENO
EN INFECCIONES POR *Salmonella typhimurium*.

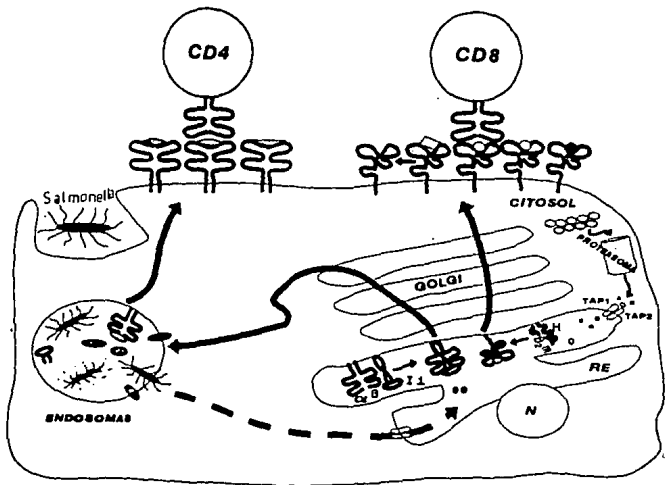


Figura 1

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la presencia de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium* en ratones infectados.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Estandarizar ensayos de citotoxicidad por liberación de cromo para la evaluación de la actividad de linfocitos T CD8⁺ provenientes de cultivos mixtos de linfocitos primarios y secundarios.
2. Identificar la presencia de moléculas de clase I y clase II sobre la superficie celular de células de diferentes orígenes.
3. Establecer ensayos de citotoxicidad que permitan evaluar la capacidad del reconocimiento de macrófagos infectados con *Salmonella typhimurium* por linfocitos T citotóxicos CD8⁺ específicos.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

RATONES.

Se emplearon ratones hembras de 8 a 12 semanas de edad de la cepa C3HeB/ FeJ, (H-2^k); así como, de la cepa BALB/c, (H-2^d). Proporcionados por los bioterios del Instituto Nacional de Higiene y del Instituto Mexicano del Seguro Social.

5.2. ESQUEMA DE INMUNIZACION.

5.2.1. INMUNIZACION DE RATONES CON CELULAS DE BAZO ALOGENICAS.

Se inmunizarón grupos de 10 ratones C3HeB/ FeJ via intraperitoneal con 10^7 células de bazo de ratón BALB/c previamente tratadas con mitomicina C (Sigma), [1 μ g por cada 1×10^6 células en 1ml de medio RPMI 1640 (GIBCO Lab.)]. Diez días después de la inmunización se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazos con los cuales se preparó una suspensión de células.

5.2.2. INFECCION DE RATONES CON *Salmonella typhimurium*.

Se infectaron grupos de 10 ratones BALB/c vía intraperitoneal con 10^4 bacterias de *Salmonella typhimurium*, crecida en medio mínimo A (fosfato dibásico de potasio 7 g/

I, fosfato monobásico de potasio 3 g/l, citrato de sodio 0.5 g/l, sulfato de amonio 1g/l, sulfato de magnesio 0.1 g/l) suplementado con 0.1 % de extracto de levadura y 0.5 % de glucosa y resuspendida en solución salina isotónica (SSI). Diez días después de la infección se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazos con los cuales se preparó una suspensión de células.

5.3. METODOS BACTERIOLOGICOS.

5.3.1. CEPAS BACTERIANAS.

Se utilizó la cepa virulenta de *Salmonella typhimurium* LT2, donada por el Instituto Nacional de Higiene.

5.3.2. CULTIVO DE LA CEPA BACTERIANA.

Las bacterias empleadas se cultivaron a 37 °C durante 18 hrs a 200 rpm en un incubador rotatorio (Shaker Labs-line Ins.), (fase de crecimiento logarítmico) en medio mínimo A complementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C (centrifuga IEC-PRJ BECKMAN Ins). La pastilla bacteriana se resuspendió en solución salina isotónica. Esta suspensión de bacteria se empleó para sembrar placas con medio BHI que se cultivaron durante 24 hrs a 37 °C, la bacteria se cosechó con SSI y posteriormente se utilizó para los ensayos de infección de macrófagos.

5.3.3. DIGESTION DE LA BACTERIA PARA OBTENER PEPTIDOS.

Salmonella typhimurium cultivada en medio mínimo A, como se indicó anteriormente se cosechó por centrifugación a 5000 rpm (Centrífuga IEC-PRJ BECKMAN Ins.) y se ajustó a una densidad óptica entre 1.0 a 1.3 a 660 nm (Beckman DU-64 Ins.)⁵¹. Las bacterias se rompieron por sonicación a 180 wats (Sonics and Material, Vibra Cell) por periodos de 2 min. en baño de hielo hasta obtener una absorbancia entre 0.4 a 0.3. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, ésta se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min (Sorvall Ins), del sobrenadante se sedimentó por ultracentrifugación la envoltura celular a 45,000 rpm durante 45 min a 4 °C (Ultracentrifuga BECKMAN L8-80 Ins), ésta se solubilizó con Tris-EDTA-Tritón (0.05M-5mM-2% respectivamente) pH 7.8 se incubó durante 15 min a 37 °C y posteriormente se ultracentrifugó a 45,000 rpm durante 45 min a 4 °C (Ultracentrifuga BECKMAN 18-80 Ins.). El sobrenadante se precipitó con acetona en una relación 6ml:1ml , se dejó toda la noche a -70 °C (REVCO Ins). Al cabo de este periodo de precipitación se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min (Sorvall Ins), el precipitado se resuspendió en el menor volumen de Tris 20 mM pH 8.5. Se determinó la concentración de proteína por Lowry.⁵⁰ Los péptidos se obtuvieron tripsinizando el sobrenadante con 1 mg de tripsina/ 50 mg de proteína durante 5 hrs a 37 °C.

Una vez tripsinizada se pasó através de filtros de caída libre (Ultrafree-CL; millipore) centrifugando a 9,000 rpm durante 6 hrs (Sorvall Ins). Para tener los fragmentos en condiciones estériles se esterilizó en filtro de 0.22 micras (Millipore), dentro de campanas de flujo laminar y se determinó la concentración de proteína por Lowry.⁵⁰ La solución de péptidos diluidos se concentró 5 veces (Speed vaccum, Heto, Dinamarca) y

se conservó a 4 °C en medio RPMI 1640 (Gibco) hasta su uso en ensayos de citotoxicidad.

5.4. METODOS ANALITICOS.

5.4.1. DETERMINACION DE PROTEINA. (METODO DE LOWRY).

La determinación de la concentración de proteína en la digestión de fragmentos de bacterias se realizó de acuerdo al método de Lowry⁵²; empleando albúmina sérica bovina (Sigma) como proteína de referencia.

5.4.2. CUENTA VIABLE DE BACTERIA.

La concentración de bacteria que se utilizó para inmunizar ratones y para infectar macrófagos se determinó por medio de una cuenta viable de las diluciones logarítmicas de la bacteria en agar Mc Conkey (Dibico) en estufa a 37 °C y en periodos de 24 hrs para corroborar resultados.

5.5. METODOS INMUNOLOGICOS.

5.5.1. LINEAS CELULARES Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Las líneas celulares que se emplearon para el desarrollo del proyecto fueron: mastocitomas de ratón P815 (H-2^d) derivado de un cultivo de tumor de ratón DBA/2; la línea de macrófagos-monocitos P388 D1 (H-2^d) derivada de un neoplasma linfoide inducido con metilcolantreno de un ratón DBA/2; el linfoma de ratón RMA derivado del linfoma del virus de Rausher por exposición al mutágeno etil-metano-sulfonato.^{53,54} Además macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Anticuerpos monoclonales: 11.4.1 que reconoce a moléculas de clase I K de haplotipo k, r,p; K9.18 que reconoce moléculas K^d; 25.9.17 que reconoce la cadena beta de moléculas de clase II de los haplotipos b,d,q; B22.249.1 que reconoce moléculas de clase I D^{b/d}; K10.56.1 que reconoce moléculas K^b y el 28.16.8S que reconoce moléculas clase II de haplotipo b,d.⁵² Tanto las líneas celulares como los anticuerpos fueron donados por el profesor Günter Hammerling del Instituto de Inmunología y Genética del Centro Alemán sobre Investigaciones Oncológicas.

5.5.2. OBTENCION Y CULTIVO DE ESPLENOCITOS.

Los bazo de los ratones inmunes y sin inmunizar se obtuvieron en condiciones de esterilidad, se depositaron en cajas petri que contenían 5 ml de solución de Hanks (Gibco). Dentro de una campana de flujo laminar, se disgregaron las células de los tejidos con ayuda de una jeringa y un émbolo haciéndolos pasar por un tamiz,

obteniendo una suspensión celular, la cual se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 min (centrífuga IEC- PRJ BECKMAN Ins), la pastilla formada se resuspendió en 2 ml de una solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio 0.16 M, carbonato de potasio 1.0 mM, EDTA-disódico 0.1 mM pH 7.4), conservándola a 37 °C durante 2 min. Posteriormente se lavó dos veces con solución de Hanks, por centrifugación a 1,200 rpm durante 10 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins). Por último la pastilla obtenida se resuspendió en medio RPMI 1640 (Gibco Co) complementado con L-glutamina 2 mM, 2-mercapto-etanol 50 μ M, penicilina sódica 100 U/ml, sulfato de estreptomycin 100 μ g/ml y suero fetal bovino 10%. El número de células se determinó empleando una cámara de Neubauer y utilizando azul tripano como colorante para evaluar la viabilidad; solamente se emplearon células con viabilidad mayor al 95%.

5.5.3. OBTENCIÓN DE MACROFAGOS PERITONEALES.

Los ratones se sacrificaron con cloroformo y se les inyectó con 5 ml de solución de Hanks con heparina 50 U/ml en el peritoneo. Posteriormente se dio masaje en el sitio de la inoculación recuperando las células peritoneales las cuales se lavaron con solución de Hanks por centrifugación a 1,200 rpm durante 10 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins) y se conservaron en hielo hasta su uso.

5.5.4. INFECCION DE MACROFAGOS *in vitro*.

La suspensión de células por infectar, ya sea de macrófagos peritoneales o la líneas celular P388 D1, se lavó por centrifugación con solución de Hanks sin antibiótico a 1,200 rpm durante 10 min (IEC-PRJ BECKMAN Ins). La pastilla formada se resuspendió en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 20 %, L-glutamina 2 mM, 2 mercapto-etanol 50 μ M. Se determinó viabilidad con azul tripano. La suspensión se mantuvo en hielo hasta su uso.

El cultivo bacteriano, en su crecimiento logarítmico, se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins). Se hicieron lavados con solución salina isotónica. Se ajustó la densidad óptica entre 0.58 a 0.60 en 540 nm. Obteniendo de esta forma 1×10^9 bacterias/ ml. La suspensión de bacteria requerida para la infección se centrifugó a 2,000 rpm (IEC- PRJ BECKMAN Ins) . A este tubo se le agregó la suspensión de células guardando una relación bacteria-macróforo de 5:1.

La suspensión macróforo-bacteria se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins), la pastilla se resuspendió en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino sin antibiótico. Se incubó durante 20 min con agitación a 37 °C. Posteriormente se lavó exhaustivamente con solución de Hanks con gentamicina (10 μ g / ml) y se cultivó con medio RPMI 1640 complementado con 20 % de suero fetal bovino toda la noche a 37 °C en atmósfera de humedad y 5 % CO_2 . Para cosechar los macrófagos de la botella de cultivo se empleó EDTA 10 mM en PBS pH 7.4 y la suspensión de macrófagos se trató con mitomicina C 1 μ g por cada 1×10^6 células durante 25 min. a 37 °C, después del periodo de incubación se lavarón los macrófagos con solución de Hanks.

5.6. OBTENCION DE CELULAS EFECTORAS.

5.6.1. CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

• **RESPUESTA PRIMARIA:** Se obtuvieron esplenocitos, como se indicó anteriormente, de ratones BALB/ c que se trataron con mitomicina C (1 μg por cada millón de células en 1 ml), se lavaron exhaustivamente para eliminar el exceso de mitomicina, posteriormente se determinó la viabilidad con tinción de azul tripano en un cámara de Neubauer. Al mismo tiempo se obtuvieron células de bazo de ratón C3HeB / FeJ y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Ambas poblaciones celulares se mezclaron en relación 1:1 (3×10^7 células en 10 ml) y se cultivaron en botellas de 50 ml en atmósfera húmeda, 5 % CO_2 , a 37 °C durante 5 días. Siendo éstas las células efectoras que se utilizaron en los ensayos de citotoxicidad.

• **RESPUESTA SECUNDARIA.** Se obtuvieron esplenocitos de ratón BALB/c que se trataron con mitomicina C, se lavaron exhaustivamente y se concentraron en la menor cantidad posible en solución de Hanks. Con esta suspensión se inoculó a ratones C3HeB/ FeJ por vía intraperitoneal un promedio de 10 a 30×10^6 células, contenidas en un volumen de 100 μl . Diez días después de la inmunización se sacrificaron los ratones para obtener esplenocitos que se cultivaron con células de bazo de ratón BALB/c tratadas con mitomicina C, como se describió anteriormente. Obteniendo de esta forma las células efectoras para los posteriores ensayos de citotoxicidad.

5.6.2. OBTENCIÓN DE CELULAS EFECTORAS ANTI- *Salmonella*.

Ratones BALB/c se inocularon vía intraperitoneal con *Salmonella typhimurium*, en concentraciones de 1×10^4 bacterias en 100 μ l de solución salina isotónica, diez días después se sacrificaron los ratones para obtener los esplenocitos que se reestimularon durante 5 días con macrófagos peritoneales o con la célula P388 D1 infectados con *S. typhimurium*, en una relación de 30:1. Al final de este periodo de incubación se cosecharon las células por centrifugación y se utilizaron para ensayos de citotoxicidad.

5.7. PREPARACIÓN DE CELULAS BLANCO.

Las células blanco que se utilizaron en los experimentos de citotoxicidad fueron :

P815

RMA

P388 D1

Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c

P388 D1 infectadas con *Salmonella typhimurium*

Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c infectados con *Salmonella typhimurium*

P815 cocultivada con péptidos de *Salmonella typhimurium*

P388 D1 cocultivada con péptidos de *Salmonella typhimurium*

Los macrófagos peritoneales y la línea celular P388 D1 se infectaron como se indicó en el punto 5.5.4. Las células que fueron cocultivadas con péptido se les agregó 100 μ g/ml y se cosecharon con EDTA 10 mM en PBS pH 7.4. Todas las células blanco se

cosecharon en tubos de plástico de 15 ml (Corning), se ajustaron a 3×10^6 células/ml. Se tomó una alícuota de 1 ml en tubos Ependorf, se centrifugó durante 5 min a 1,200 rpm (IEC- PRJ BECKMAN Ins). La pastilla se resuspendió en 100 μ l de suero fetal bovino (SIGMA) y 200 μ Ci de cromato de sodio ^{51}Cr (Dupont) pH 8-10, se mantuvo a 37 °C durante 2 hrs para que las células blanco incorporaran el cromo. Posteriormente se lavaron exhaustivamente para eliminar todo el cromo en exceso, se determinó la viabilidad de las células y se ajustaron a 3×10^4 /ml en medio RPMI 1640 complementado.

5.8. ENSAYO DE LIBERACION DE CROMO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD CITOTOXICA.

Las células efectoras se cosecharon, concentraron y ajustaron a 3×10^6 /ml. Se prepararon placas de 96 pozos de fondo redondo (Nunc) en relaciones célula blanco: célula efectora de 1:100, 1:50, 1:25, 1:12.5, 1:6.25, con 100 μ l de las suspensiones de células blanco y 100 μ l de la suspensión de las células efectoras en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 20 %, L- glutamina, 2 mercapto- etanol, penicilina y sulfato de estreptomycin. Como testigo de liberación espontánea de cromo se prepararon pozos con 100 μ l de RPMI 1640 con suero fetal al 20 % y 100 μ l de células blanco; como testigo de liberación máxima de cromo se prepararon pozos con 100 μ l de célula blanco y 100 μ l de SDS al 20 %. Todas las muestra fueron analizadas por triplicado.

Una vez que se preparó la placa con las células efectoras y blanco ésta se incubó durante 4 hrs a 37 °C, 5 % CO_2 y atmósfera húmeda. Después de este periodo se

centrifugó a 2,000 rpm durante 1 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins), se tomaron 100 µl del sobrenadante se colocaron en tubos y se cuantificó la radioactividad en un contador de rayos gamma. El porcentaje de citotoxicidad se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lisis} = 100 \times \frac{\text{liberación de } ^{51}\text{Cr de la muestra problema} - \text{liberación de } ^{51}\text{Cr espontánea}}{\text{liberación de } ^{51}\text{Cr máxima} - \text{liberación de } ^{51}\text{Cr espontánea}}$$

5.9. ENSAYO DE CITOFLOUROMETRIA INDIRECTA (FACS).

Las células a analizar se cosecharon por centrifugación a 1,200 rpm (IEC- PRJ BECKMAN Ins), la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS pH 7.4 complementado con suero fetal bovino al 2 %, de esta suspensión se agregó en 200 µl, aproximadamente 5×10^5 a pozos de placas de cultivo de 96 pozos de fondo redondo (Nunc). La placa se centrifugó a 2,000 rpm durante 1 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins), el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 100 µl de cada uno de los siguientes diferentes anticuerpos: 11.4.1 Anti K^k, K9.18 Anti K^d D^d, 25.19.7 Anti AB^{db}, B22.249.1 Anti D^b, 28.6.8S anti-I-A^d, K10.56.1 anti-K^b

Se incubó en hielo durante 30 min, después de este periodo, se lavó dos veces con PBS- suero fetal bovino, se centrifugó en cada lavado a 2,000 rpm durante 1 min (IEC- PRJ BECKMAN Ins), se incubó en hielo durante 30 min. con Ig G de cabra anti- Ig G de ratón conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Gibco), en una dilución 1:100. Por último se lavó dos veces con PBS-suero fetal bovino y se resuspendió en 200

μ l de yoduro de propidio (dilución 1:1000 en PBS), la fluorescencia se cuantificó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Ins.).

6. RESULTADOS.

6.1. ANALISIS DE LA EXPRESION EN LA SUPERFICIE DE MOLECULAS DE CLASE I Y CLASE II EN LA LINEA P388 D1.

Con la finalidad de cuantificar y corroborar que las líneas celulares, que se emplearían en los ensayos de citotoxicidad, expresaban adecuadamente moléculas de clase I del MHC se procedió a cuantificar las moléculas K^d ; empleando para ello el anticuerpo específico K9.18. También se cuantificó la molécula L^d empleando en este caso el anticuerpo B22.249.1 el cual reconoce principalmente las moléculas D^b pero tiene una reacción cruzada con L^d . Se emplearon dos testigos, uno fue el anticuerpo irrelevante, K10.56.1, que está dirigido contra moléculas K^b ; el segundo testigo fue el segundo anticuerpo solamente. Se puede observar que la línea P388 D1 presentó en superficie mayor abundancia de moléculas K^d (MFC = 90, Fig. 2 E) que L^d (MFC= 50, Fig. 2 B), la reacción fue específica ya que la reacción fue negativa cuando se empleó el anticuerpo K10.56.1 (MFC= 7, Fig. 2 C) o el segundo anticuerpo (MFC=3, Fig. 2 A). También fue evaluada la presencia de moléculas clase II sobre la superficie de la línea P388 D1 empleando para ello los anticuerpos 25.9.17 y 28.16.8S dirigidos contra las moléculas I-A^d. Como se puede observar en la figura 2 D y 2 F la línea P388 D1 no expresa moléculas de clase II ya que la reacción fue negativa con ambos anticuerpos, MFC= 8 para el anticuerpo 25.9.17 y MFC= 8 para el anticuerpo 28.16.8S.

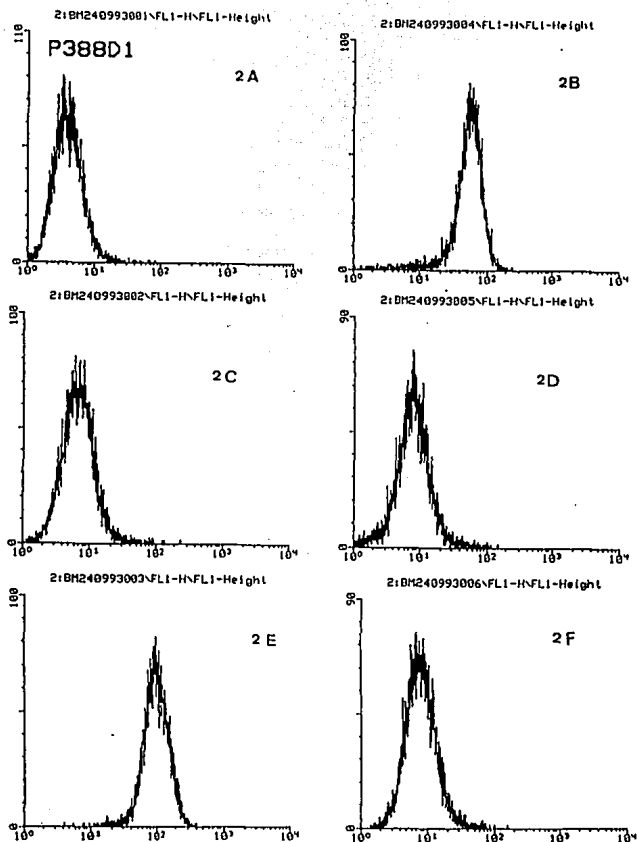
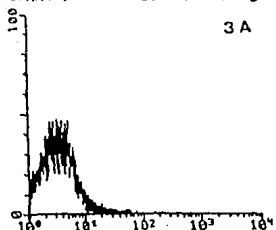


Fig. 2 Expresión de moléculas K^d y L^d sobre la superficie de la línea de monocitos macrófagos P388 D1. a) Testigo negativo segundo anticuerpo únicamente, b) Anticuerpo monoclonal B22.249. (anti- D^b), c) Anticuerpo monoclonal K10.56.1(anti- K^b), d) Anticuerpo monoclonal 25.9.17(anti $I-A^d$), e) anticuerpo monoclonal K9.18(anti- K^d), f) Anticuerpo monoclonal 28.16.8S. (anti- $I-A^d$). En el eje X se expresa MFC (escala logarítmica) y en el Y % de células viables.

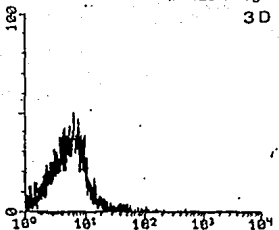
6.2 INDUCCION DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DE CLASE I Y CLASE II EN LA LÍNEA P388D1 CULTIVADA CON MEDIO DE CULTIVO RICO EN LINFOCINAS.

Debido a que no se observó expresión de moléculas de clase II en la línea P388 D1 se decidió investigar si ello era debido a un defecto genético o bien a que en estado de reposo de dicha línea esas moléculas no se expresan; por lo tanto, para inducir un estado de activación; la línea P388 D1 se cultivó en presencia de sobrenadante de esplenocitos de rata activados con concanavalina A (Con A), debido a que como está claramente establecido este sobrenadante contiene altas concentraciones de IL-2 e INF γ . Así, después de 48 hrs de activación fue evaluada la expresión de moléculas K^d e I-A^d y como se puede observar en la figura 3E en estado de activación hubo un aumento de la expresión de la moléculas K^d, MFC= 116 contra MFC=58 (Fig. 3B) en estado no activado. El mismo tipo de efecto se observó para la molécula I-A^d (Fig. 3F) MFC= 47 contra (Fig. 3C) MFC= 3 en estado no activado. Por lo tanto estos resultados demuestran que las moléculas de clase II en la línea P388 D1 solamente se expresan en estado de activación de las células.

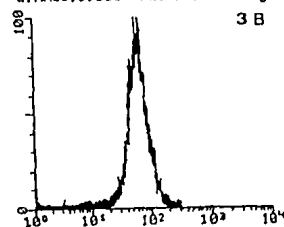
2:NM251093005\FL1-H\FL1-Height



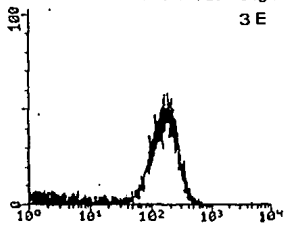
2:NM251093001\FL1-H\FL1-Height



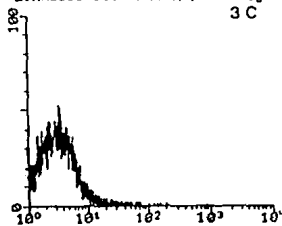
2:NM251093007\FL1-H\FL1-Height



2:NM251093009\FL1-H\FL1-Height



2:NM251093008\FL1-H\FL1-Height



2:NM251093004\FL1-H\FL1-Height

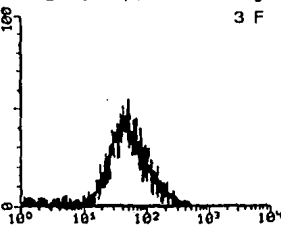


Fig.3 Análisis de la expresión de moléculas de clase I y clase II sobre la superficie de la línea celular P388 D1 activadas . Durante 48 hrs previo al ensayo de citofluorometría las células fueron cultivadas en presencia de sobrenadante de cultivo de esplenocitos de rata activados con Con A. Para la cuantificación de las moléculas se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales: 3A, 3D) Testigo negativo con segundo anticuerpo únicamente, 3B, 3E) anticuerpo monoclonal K9.18, 3C, 3F) anticuerpo monoclonal 25.9.17. Las células de las figuras 3A,B,C no fueron activadas con el cultivo rico en linfocinas. En el eje X se expresa MFC (escala logarítmica) y en el Y % de células viables.

6.3 EXPRESION DE MOLECULAS DE CLASE I Y CLASE II EN MACROFAGOS PERITONEALES Y MACROFAGOS PERITONEALES CULTIVADOS EN MEDIO DE CULTIVO RICO EN LINFOCINAS.

Debido a que no se observó expresión de moléculas de clase II en la línea P388 D1, únicamente después de haber sido activada, se decidió emplear macrófagos peritoneales de ratones BALB/c. Se cuantificó la molécula K^d empleando el anticuerpo K9.18. Se emplearon dos testigos; uno fue el anticuerpo irrelevante K10.56.1 anti- K^b y el segundo fue el segundo anticuerpo únicamente como testigo negativo.

Se puede observar que los macrófagos peritoneales activados presentan en superficie mayor abundancia de moléculas K^d (MFC= 199.50, Fig. 4D) que los macrófagos no activados (MFC= 79.56, Fig. 4C). El mismo tipo de efecto se observó con la expresión de moléculas de clase II donde macrófagos no activados son prácticamente negativos (MFC= 18.31 Fig 4E) y en macrófagos activados ya se expresan moléculas de clase II en la superficie (MFC= 56.54, Fig 4F)

Por lo tanto estos resultados demuestran que las moléculas de clase II en los macrófagos peritoneales, al igual que en la línea P388 D1, solamente se expresan en estado de activación de las células.

EXPRESION DE MOLDE CLASE I Y CLASE II MQ's PERITONEALES ACTIVADOS Y S/ACTIVAR

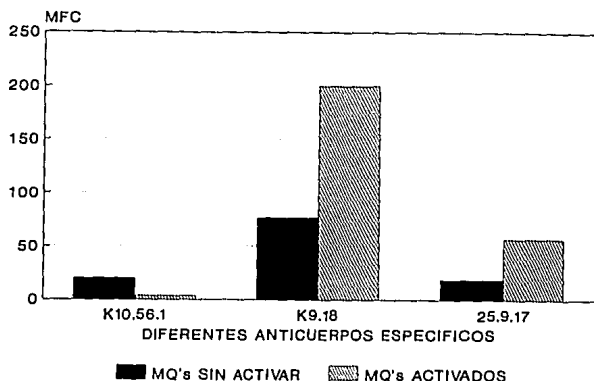


Fig. 4 Expresión de moléculas de clase I y clase II en macrófagos peritoneales activados y sin activar. Durante 72 hrs previo al ensayo de citofluorometría las células fueron cultivadas en presencia de sobrenadante de cultivo de esplenocitos de rata activados con Con A. Para la cuantificación de las moléculas se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales: 4A, 4B) anticuerpo monoclonal K10.56.1; 4C, 4D) anticuerpo monoclonal 25.9.17; 4E, 4F) anticuerpo monoclonal K9.18. Las células de la figura 4 A, C, E no fueron activadas con el cultivo rico en linfocinas. Para cada uno de los anticuerpos que se presentan en la figura se le restó la media de fluorescencia del testigo negativo.

6.4. ANALISIS DE GENERACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS ANTI-*Salmonella*. ESTIMULACION CON CÉLULAS P388 D1 INFECTADAS.

Para determinar la presencia de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium*, los esplenocitos de ratones infectados subletalmente; fueron reestimulados, *in vitro*, durante 5 días con la línea P388 D1 infectada con la misma bacteria. La actividad citotóxica presente en los cultivos se evaluó por ensayos de liberación de cromo donde se emplearon como células blanco la línea P388 D1 infectada con *Salmonella typhimurium* LT2 y células P388 D1 sin infectar.

El resultado que se muestra en la gráfica de la figura 5, es un ejemplo de ensayos que se realizaron tres veces de manera independiente y como se puede observar empleando ese modelo experimental no fue posible observar actividad citotóxica específica contra antígenos de *Salmonella*.

RESPUESTA CITOTOXICA ESPECIFICA
ESTIMULACIONES CON CEL P388D1

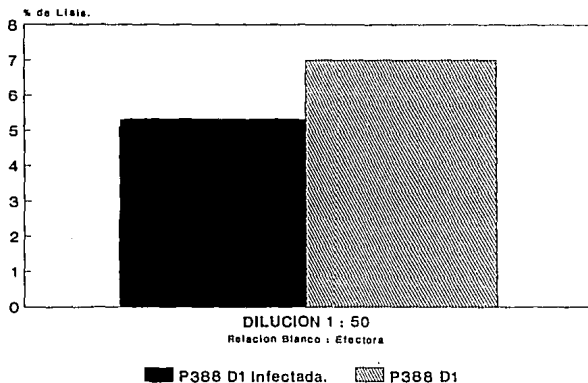


Figura 5. Ausencia de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium*. Esplenocitos provenientes de ratones BALB/c infectados con 1×10^4 de *Salmonella typhimurium* LT2 fueron reestimulados, durante 5 días, con células P388 D1 infectadas con la bacteria. Al término del periodo de reestimulación las células se emplearon para los ensayos de citotoxicidad. Utilizando como célula blanco: P388 D1 infectada y P388 D1 sin infectar.

6.5. ENSAYO DE INFECCION *in vitro*.

Para evaluar la concentración de bacteria que se utilizó en los ensayos de infección de macrófagos peritoneales, de la línea celular P388 D1 y las células de bazo de ratones infectados por vía intraperitoneal; se utilizó el método de cuenta en placa.

Las líneas celulares como los macrófagos obtenidos de exudado de peritoneo y las células de bazo se infectaron con *Salmonella typhimurium* LT2 partiendo de una concentración aproximada de 1×10^9 bacterias / ml, la cantidad de bacteria administrada a cada ratón fue de 1×10^4 y la concentración para los macrófagos fue de bacteria : célula de 5:1.

Para excluir la posibilidad de que la ausencia de citotoxicidad no se debió a la falta de infección de la línea P388 D1 se realizaron ensayos de cuenta en placa de bacteria y como se puede observar en la tabla 1, no solamente la línea P388 D1 estaba infectada con la bacteria (72 placas formadoras de colonias por 2×10^5 células) sino también las células de bazo que provenían de los ratones infectados subletalmente (100 placas formadoras de colonias por 2×10^5).

CUENTA EN PLACA DE BACTERIA EMPLEADA EN INFECCIONES DE

DIFERENTES TIPOS DE CELULAS.

DILUCION	MACROFAGOS PERITONEALES	LINEA CELULAR P388 D1	SUSPENSION DE BACTERIAS PARA INFECCION DE RATONES
1 X 10 ⁻⁸	1.5	1	3
1 X 10 ⁻⁷	10	6	8
1 X 10 ⁻⁶	126	72	100

Tabla 1. Los datos están dados en UFC/ ml en placas de 15 de ml de agar Mc Conkey. Cada valor de la tabla es el promedio de los triplicados de cada dilución y se llevaron a cabo cada vez que se hicieron ensayos de infección. Los datos de la dilución indican hasta qué punto se permitió evaluar la cuenta de las bacterias.

6.6. ANALISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CELULAS BLANCO A LA LISIS POR LINFOCITOS T CITOTOXICOS .

La falta de lisis específica sobre las líneas P388 D1 pudiera deberse a la resistencia de la célula al efecto de los mecanismos citotóxicos de los linfocitos T CD8⁺ o a que en la infección subletal con *Salmonella typhimurium* no se genera una respuesta de linfocitos T CD8⁺, o bien a que la línea P388 D1 no proporciona los coestimulos indispensables para la activación de los linfocitos T, como por ejemplo, la interacción CD28-B7.

Para evaluar la susceptibilidad a lisis de la línea P388 D1, ésta se empleó como célula blanco en ensayos de citotoxicidad donde los linfocitos efectores provienen de estimulaciones alogénicas primarias o secundarias. Para realizar este análisis se prepararon cultivos mixtos de linfocitos, de ratones C3HeB/ FeJ (H-2^b) estimulados con células de bazo de ratones BALB/c (H-2^d). Como control positivo de lisabilidad se empleó la línea de mastocitoma de ratón P815(H-2^d), como célula problema la línea P388 D1 y como testigo negativo el timoma de ratón RMA (H-2^b).

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en estos ensayos de citotoxicidad. Y como se observa, se detectó que la línea P388 D1 es capaz de ser lisada bajo estas condiciones de experimentación tanto por linfocitos provenientes de una respuesta primaria como de una respuesta secundaria, y tal como era de esperarse la citotoxicidad fue mayor en el caso de la respuesta secundaria de cultivo mixto (76% de lisis) de linfocitos que en el de la respuesta primaria (42% de lisis). Esta susceptibilidad de lisis fue semejante a la observada para la línea P815 para la cual se obtuvo un 45 % de lisis en la respuesta primaria y un 55% de lisis en la respuesta secundaria. La lisis del testigo negativo fue del 11% en la respuesta primaria y del 12% en la respuesta secundaria.

ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LISIS POR LINFOCITOS T

CITOTOXICOS EN DIFERENTES LINEAS CELULARES.

	MRL PRIMARIO	MRL SECUNDARIO
RMA (H-2b)	11	12
P815 (H-2d)	45	55
P388D1 (H-2d)	42	76

Tabla 2. Análisis de la susceptibilidad a lisis por linfocitos T citotóxicos de las líneas celulares RMA, P815 y P388 D1. Las células efectoras provienen de cultivos mixtos de linfocitos primarios y secundarios. Los datos representan el porcentaje de lisis de una relación célula blanco: efectora de 1: 50.

6.7. ANALISIS DE GENERACION DE LINFOCITOS T CITOTOXICOS ANTI-*Salmonella*. ESTIMULACION CON MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON BALB/c.

Para tener una célula que proporcionara todos los coestímulos indispensables en la inducción de una respuesta inmune se utilizaron, durante la reestimulación de los esplenocitos de ratones infectados subletalmente con *Salmonella typhimurium*, macrófagos peritoneales de ratones BALB/c infectados con la bacteria.

Los resultados se observan en la figura 6 donde se aprecia que, al igual que la línea celular P388 D1, los macrófagos peritoneales no estimularon una respuesta citotóxica específica contra antígenos de *Salmonella*. Donde el porcentaje de lisis de los macrófagos peritoneales que se emplearon como blanco no fue mayor del 8 % .

La gráfica presenta los promedios de la liberación de cromo de muestras que se realizaron por triplicado y se observó el mismo comportamiento en ensayos que se realizaron de manera independiente.

RESPUESTA CITOTOXICA ESPECIFICA
ESTIMULACIONES C/MACROFAGOS PERITONEALES

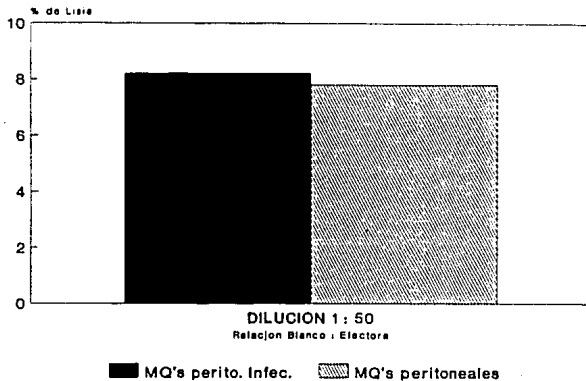


Figura 6. Citotoxicidad en poblaciones de esplenocitos de ratones BALB/c infectados con *Salmonella typhimurium* LT2. Las células efectoras provenientes de ratones BALB/c infectados con *Salmonella typhimurium* fueron reestimuladas con macrófagos peritoneales infectados con la bacteria. Las células blanco empleadas fueron : Macrófagos peritoneales infectados y sin infectar. Los datos que se muestran son tomados únicamente de una relación de célula blanco: efectora de 1: 50

6.8. ACTIVIDAD CITOTOXICA EN RATONES INFECTADOS Y REESTIMULADOS CON PEPTIDO.

Debido a que en los experimentos anteriores no se generó una respuesta inmune específica contra antígenos de *Salmonella typhimurium* y que esta ausencia de linfocitos T CD8⁺ específicos, no se debía a que las células estimuladoras presentaran una deficiencia en la expresión de moléculas de clase I, ni a la falta de señales coestimuladoras se decidió emplear la propiedad que tienen algunos péptidos, (en exceso en el medio extracelular), de unirse a moléculas de clase I en la superficie de células. Por lo tanto, durante la reestimulación se emplearon 100 µg / ml de péptidos de *Salmonella typhimurium* que se obtuvieron por tripsinización de la bacteria (de un concentrado que contenía 9.9 mg / ml de proteína) y poder así contar con complejos molécula de clase I -péptido de *Salmonella* para reestimar los linfocitos provenientes de los ratones infectados subletalmente con la bacteria.

En la figura 7 se muestra la actividad citotóxica que se obtuvo empleando el procedimiento descrito anteriormente y en la cual podemos observar una vez más la ausencia de citotoxicidad sobre la línea P388 D1 infectada con *Salmonella* sin embargo, observamos un aumento de citotoxicidad de alrededor del 2% sobre las células blanco pulsadas con péptido, tanto para la P388 D1 como para la P815.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESPUESTA CITOTOXICA ESPECIFICA
ESTIMULACION CON PEPTIDO

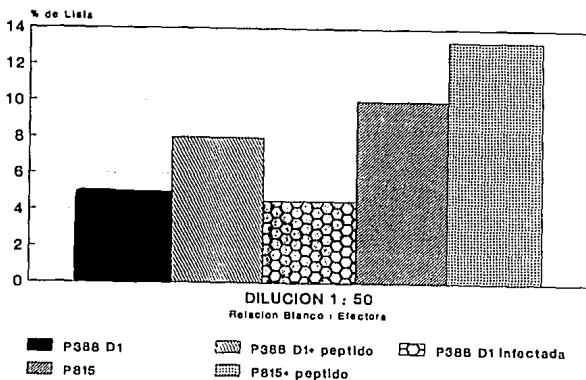


Figura 7. Actividad citotóxica en esplenocitos de ratón BALB/ c reestimulados con péptido. Las células efectoras provenientes de ratones BALB/ c infectados con *Salmonella typhimurium* fueron reestimuladas con 100 µg / ml de péptido obtenido por tripsinización de la bacteria. Las células blanco empleadas fueron : Las células P388 D1, P388 D1 pulsada con péptido, P388 D1 infectada con *Salmonella typhimurium*, P815 y P815 pulsada con péptido. Los datos que se muestran son tomados únicamente de una relación de célula blanco: efectora de 1: 50

7. DISCUSION.

El cuerpo humano esta protegido por diferentes células y moléculas que trabajan en conjunto ante la presencia de un antígeno, el cual normalmente es una molécula extraña que proviene de bacterias, virus u otros patógenos. Las células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos, fagocitan los antígenos y lo fragmentan para formar péptidos antigénicos. El complejo principal de histocompatibilidad reconoce esos péptidos antigénicos y los transporta hasta su superficie. El linfocito T cooperador tiene receptores de moléculas para reconocer la unión péptido-MHC, una vez que esto sucede, las células activadas secretan diferentes linfocinas que sirven para activar otros componentes del sistema inmune, como es el caso del linfocito B y los macrófagos,⁵⁵ en cambio; los receptores de los linfocitos T citotóxicos reconocen antígenos presentes sobre la superficie de células extrañas, este reconocimiento permite la lisis de la célula por el linfocito T citotóxico.⁵⁶

La activación específica de linfocitos T, es indispensable para inducir en los ratones un estado de inmunidad protectora contra infecciones causadas por virus, bacterias o parásitos. En este proyecto se indujo una infección con *Salmonella typhimurium* en ratones BALB/c susceptibles a la bacteria, tratando de establecer un modelo natural de infección y de resistencia a la reinfección ya que se ha descrito que en los ratones infectados con una dosis subletal de *Salmonella typhimurium*, adquieren resistencia a la infección expresada por dos fenómenos:

- a) La capacidad de eliminar el primer inóculo.
- b) La capacidad a la resistencia a un segundo reto con la bacteria.⁵⁷

Para descartar que la ausencia de citotoxicidad no se debía a ningún problema metodológico, fue evaluado en primer término la expresión de moléculas del MHC en las diferentes células que se emplearon en los ensayos realizados. Los resultados obtenidos mostraron claramente que tanto las células de bazo provenientes de los ratones

infectados, como las células empleadas en las reestimulaciones *in vitro* expresaban altos niveles de moléculas de clase I y moléculas de clase II en estado activado. Además ello permitió corroborar que el sistema era totalmente singénico. Tampoco puede argumentarse la falta de señales coestimuladoras, como por ejemplo, interacción B7-CD28, pues se emplearon macrófagos peritoneales como células reestimuladoras garantizando así la presencia de los mecanismos coestimuladores los cuales son indispensables para llevar a cabo las funciones efectoras de los linfocitos T.

Se realizaron estimulaciones de linfocitos T provenientes de ratones BALB/c que se estimularon con péptidos no caracterizados de la bacteria *Salmonella typhimurium* obtenidos por tripsinización de dicha bacteria. Las células efectoras se enfrentaban a células blanco que en algunos casos habían sido cultivadas previo al experimento con el péptido. Las células blanco que se utilizaron fueron P388 D1, P388 D1 infectada con bacteria, P388 D1 con péptido, P815 y P 815 con péptido. En este tipo de ensayos se observó una respuesta citotóxica muy baja que refleja una respuesta inmune primaria y no una respuesta inmune secundaria como era de esperarse.

En todos los experimentos llevados a cabo se realizó cuenta de cultivos bacterianos y tanto los bazos de los ratones infectados como las células estimuladoras estaban adecuadamente infectados lo que garantiza técnicamente la fuente de antígenos bacterianos, sin embargo es importante señalar que haber recuperado bacterias del bazo de los ratones infectados pudiese significar que la infección no está siendo controlada adecuadamente y ello altera de alguna forma la inducción de la respuesta de linfocitos T.

Considerando todos los resultados se puede decir, que en los experimentos llevados a cabo, no se generó respuesta de linfocitos T CD8⁺ lo que contrasta con los resultados obtenidos con la inmunización de bacterias atenuadas. Esta descripción puede explicarse de dos maneras:

1. Las bacterias virulentas entran a los macrófagos por fagosomas, donde se multiplican, y ello interfiere con el procesamiento de antígenos.

2. En cambio las bacterias avirulentas pudieran entrar a compartimentos endosomales donde son degradadas y de alguna manera se pueden proporcionar los péptidos que se presentan por moléculas de clase I

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que para este modelo experimental no existen linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de *Salmonella typhimurium* por lo que la inmunidad generada radica en los linfocitos T CD4⁺ y probablemente también en los linfocitos B; sin embargo para descartar la participación de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ será necesario realizar experimentos donde se eliminen cada una de las subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos y poder así obtener las evidencias experimentales que documenten esta observación.

8. CONCLUSIONES.

Dada la importancia de conocer el posible mecanismo de acción que se lleva a cabo en las infecciones causadas por *Salmonella typhi* y debido a que es un gran problema la falta de un modelo experimental humano, es necesario relacionar los estudios experimentales realizados con ratones.

En este proyecto se emplearon ratones BALB/c susceptibles a la infección y una bacteria homóloga que resulta ser virulenta para el ratón.

El modelo de infección natural a ratones con *Salmonella typhimurium* permite evaluar la ausencia de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de la misma bacteria. Pero esto no quiere decir que en otros modelos experimentales sea posible.

Los resultados sugieren que en la infección con *S. typhimurium* no se genera una respuesta de linfocitos T citotóxicos probablemente debido a que la bacteria entra en los macrófagos a través de los fagosomas donde se multiplica y ello pudiera estar interfiriendo con los mecanismos de procesamiento de antígeno que proveen los péptidos que se presentan por moléculas de clase I; está propuesta esta de acuerdo con la inducción de linfocitos T citotóxicos cuando se administra *Salmonella typhimurium* avirulenta las cuales son deficientes en la capacidad de multiplicarse dentro de macrófagos.

9. BIBLIOGRAFIA.

- ¹ Kaufmann, S.H.E. 1991. Role of T-cell subset in bacterial infections. *Curr. Opin. in Immunol.* 3: 465-470.
- ² Kaufmann, S.H.E., Munk, M.E., Steinhoff, U., Wand-Württenberger, A. Gastril, A.J., Flesch, I. and Shoel, B. 1989. Effector T cell in bacterial infections. *En Progress in Immunology VII. Proceeding of the 7th Internacional Congress of Immunology.* Melchers F. Springer-Verlag. RFA. 963-970.
- ³ Gao, X.; Tite, J.; Lipscombe, M.; Rowland-Jones, S.; Ferguson, D. and McMichael, A. 1992. Recombinant *Salmonella typhimurium* strains that invade nonphagocytic cells are resistant to recognition by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Infection and Immunity.* 60: 3780- 3789.
- ⁴ Aggarwal, A.; Kumar, S.; Jaffe, R.; Hone, D.; Gross, M. and Sadoff, J. 1990 Oral *Salmonella*: Malaria Circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cell. *Salmonella* induces protective immunity against Malaria. pp 1083-1089.
- ⁵ Eisenstein, T.K.; Kallar, L.M. and Sultzer, B.M. 1984. Immunity to infection with *Salmonella typhimurium*: Mouse-strain differences in vaccine- and serum-mediated protection. *J. Infect. Dis.* 150: 425-435,
- ⁶ Hoham, A.W. 1978. Intestinal colonization an virulence of *Salmonella* in mice. *Infect. Immunol.* 22: 763-770.
- ⁷ Killar, L.M. and Eisenstein, T.K. 1986. Delayed-type hypersensitivity and immunity to *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 52: 504-508.
- ⁸ Horneache, C.E. 1992. *Salmonella*, infection and immunity. In *Encyclopa of Immunology.* Ed(s). Roitt, I.M. and Delves, P.J. Academic Press. pp 1350-1352.

- 9 Eisenstein, T.K.; Deakins, L.W.; Killar, L.M.; Saluk, P.H. and Sultzer, B.M. 1982. Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3HeB/FeJ mice and other strains in the C3H lineage. *Infect. Immun.* 36: 696-703.
- 10 Liew, F.Y. and Cox, F.E.G. 1992. *Fundamental Immunology*. ed. Paul, W.E. Raven Press. pp 105- 1032.
- 11 Gallin, J.J. 1993. Inflammation. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul, W.E. Raven Press. pp 105-1032.
- 12 Carrol, M.E.; Jackett, P.S.; Aber, V.R. and Lowrie, D.B. 1979. Phagolysosome formation cyclic adenosine 3'5' monophosphate and the fate of *Salmonella typhimurium* within mouse peritoneal macrophages. *J. Gen. Microbiol.* 110: 421-429.
- 13 Buschmeier, N.A. and Heffron, F. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science.* 248: 730-732.
- 14 Abshire, K. Z. and Neidhart, F.C. 1990. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophages. *J. Bacteriol.* 175: 3734-3743.
- 15 Alpuche- Aranda, C.M.; Swason, J.A.; Loomis, W.P. and Miller, S.I. *Salmonella typhimurium* activator virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10079-10083
- 16 Miller, S.I. Kukral, A. and Mekalanos, J.J. A two component regulatory system (Pho/PHQ) controls virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5054-5058.
- 17 Plant, J. and Glynn, A.A. 1974. Natural resistance to *Salmonella* infection, delayed hypersensitivity and Ir genes in different strains of mice. *Nature.* 248: 345-347.
- 18 Hsu, H.S. 1989. Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. *Microbiol. Rev.* 53: 390-409.
- 19 Skamene, E. and Pietrangeli, C. 1991. Genetic of the immune response to infectious pathogens. *Curr. Opin. Immun.* 3: 511-517.

- 20 Swanson, R.N. and O'Brien, A.D. 1983. Genetic control of innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: *Ity* gene expressed *in vivo* by 24 hrs. after infection. J. Immunol. 131: 3041-3020.
- 21 O'Brien, A. D. and Metcalf, E. F. 1982. Control of early *Salmonella typhimurium* growth in innately *Salmonella* -resistance mice does not require functional T lymphocytes. J. Immunol. 129: 1349-1351.
- 22 Swason, R. N. and O'Brien. 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: *Ity* gene expressed *in vivo* by 24 hours after infection. J. Immunol. 131: 3014-3020.
- 23 Colwell, D.E.; Michalek, S.M. and MGhee, J.R. 1986. *Ips* gen regulation of mucosal immunity and susceptibility to *Salmonella* infection in mice. Curr. Topics. Microbiol. Immunol. 124: 121-147.
- 24 O'Brien, A.D.; Rosenstreich, D.L.; Scher, I.; Campbell, G.H.; MacDermott, R.P. and Formal, S.B. 1980. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: Role of the LPS gene. J. Immunol. 124: 20-24.
- 25 Watson, J.W.; Kelly, K.; Largen, M. and Taylor, B.A. 1978. The genetic mapping of a defective LPS response genetic in C3H/ HeJ mice. J. Immunol. 120: 422-424.
- 26 Hsu, H.S. 1989. Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. Microbiol. Rev. 53: 390-409.
- 27 O'Brien, A.D.; Scher, I. and Metcalf, E. S. 1981. Genetically conferred defect in anti-*Salmonella* antibody formation renders CBA/N mice innately susceptible to *Salmonella typhimurium* infection. J. Immunol. 126: 1368-1372.
- 28 Glode, M.L.; Osborne. B. and Rosenstreich, D.L. 1976. Cellular mechanism of toxin unresponsiveness in C3H/ HeJ mice. J. Immunol. 116: 454-461.
- 29 Veghese, M.; Brigley, N.J. and Berry, L.J. 1970. Genetic control of peripheral leukocyte response to endotoxin in mice. J. Immunol. 124: 2468-2484.

- 30 Rosenstreich, D.L. and Glode, M. 1975. Difference in B cell mitogen responsiveness between closely related strains of mice. *J. Immunol.* 115: 777-780.
- 31 O'Brien, A. D. and Rosenstreich, D.L. 1983. Genetic control of susceptibility of C3HeB/FeJ mice to *Salmonella typhimurium* is regulated by a locus distinct from known *Salmonella* response genes. *J. Immunol.* 131: 2613-2615.
- 32 Mossmann, T.R. and Coffman, R.L. 1984. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173.
- 33 Nauciel, C.; Ronco, E.; Guenet, J.J. and Pla, M. 1988. Role of H-2 and non-H-2 genes in control of bacterial clearance from the spleen in *Salmonella typhimurium*-infected mice. *Infect. Immun.* 56: 2407-2411.
- 34 Sveson, S.B. and Lindberg, A.A. 1980. Protection against mouse typhoid by artificial *Salmonella* vaccines. *Scan. J. Infect. Dis. Supp.* 24: 210-215.
- 35 Kussi, N.; Nurmien, M.; Saxén, H.; Voltonen, M. and Makela, P.H. 1979. Immunization with major membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25: 857-862.
- 36 Howard, M.K. Miyajima, A. and Coffman, R. 1993. T-cell derived cytokines and their receptors. In *Fundamental Immunology*. Ed. Paul, W.E. Raven Press. pp 763-800.
- 37 James, S.L. and Nancy, C. 1993. Effector functions of activated macrophages against parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 518-523.
- 38 Nauciel, C. 1990. Role of CD4⁺ T Cell and T-independent mechanism in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol.* 145: 1265-1269.
- 39 Kaufmann, S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Ann. Rev. Immunol.* 11: 129-163.
- 40 Parmer, E.G. 1993. Cellular immunity to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 492-496.

- 41 Syamal, R.; Tonks, M.; Carbone, F.; Ryskamp, T.; Jonh, W.; Morrow, W. and Hanna, N. 1992. Induction of antigen-specific class I- restricted cytotoxic T Cells by soluble proteins *in vivo*. *Immunol.* 89: 8308-8312.
- 42 Unanue, E. R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 395-428
- 43 Monaco, J.J. 1992. A molecular model of MHC class I restricted antigen processing. *Immunol. Today.* 13: 173-179.
- 44 Tsomides, T.J. and Eisen, H.N. 1991. Antigenic structures recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 3357-3360
- 45 Nabholz, M. and MacDonald, H. R. 1983. Cytolytic T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1: 273-306.
- 46 Orlowski, M. The multicatalytic proteinase complex a major extralysosomal proteolytic system. *Biochem.* 29: 10289-10297.
- 47 Ortiz-Navarrete, V.; Seeling, A. ; Gernold, M.; Frentzel, S.; Kloetzel and Hammerling, G. 1991. Subunit of the 20'S proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature.* 353: 662- 664.
- 48 Deverson, E. V.; Gow, I. R.; Coadwell, W.J.; Monaco, J. J.; Butcher, G.W. and Howard, J.C. 1990. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature.* 348: 738-741.
- 49 Unanue, E.R. and Cerrottini, J.C. 1989. Antigen presentation. *FASEB.* 3: 2496-2502.
- 50 Davis, M.M. and Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T -cell recognition. *Nature.* 334: 395-401.
- 51 Schnaitman, C. A. 1971. Effects of ethylenediamine tetracetic acid , Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 108; 553-563.

- 52 Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 53 Townsend, A.; Elliot, T.; Cerundolo, V.; Foster, L.; Barber, B. and Tse, A. 1990. Assembly of MHC class I molecules analyzed. Cell. 62: 285-295.
- 54 Hay, R.; Caputo, J.; Macy, M.; McClintock, P. and Reid, Y. 1992. American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas. Seventh Edition. pp 28, 139,291 and 301.
- 55 Sher, A. and Coffman. R. L. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cell and T cell-derived cytokines. Annual Rev. of Immunol. 10: 385-409.
- 56 Stefan, H. E. and Kaufmann. 1993. Immunity to intracellular bacteria. Ann. Rev. of Immunol. 11: 129-163.
- 57 Nauciel, C.. 1990. Role of CD4⁺ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. Journal of Immunol. 145: 1265-1269.