



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

“Modulación de la respuesta de células T y B
antígeno-específicas mediante la activación de
células iNKT por *Salmonella* Typhimurium
modificada con glicolípidos”

Memoria para optar al título de Bioquímico

Paula Elizabeth Bravo Rodríguez

Profesor Patrocinante

Dr. Dante Miranda Wilson

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

Director de Memoria

Dr. Leandro Carreño Márquez

Laboratorio de inmunomodulación

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Julio 2019

FINANCIAMIENTO Y PUBLICACIONES

Esta tesis formó parte del Proyecto Fondecyt N° 1160336 y Núcleo Milenio de Inmunología e Inmunoterapia. Los trabajos fueron realizados en el laboratorio de Inmunomodulación, Programa interdisciplinario de Inmunología, Instituto de ciencia Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Durante la realización de esta tesis, la alumna participó en los siguientes congresos:

Modulation of the response of antigen-specific cytotoxic T cells by activation of iNKT cells by glycolipid-modified recombinant bacteria. Paula Bravo-Rodríguez, Susan Bueno, Alexis Kalergis, Leandro Carreño.

XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, XL congreso chileno de Microbiología, II Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Inmunología, XI Reunión de la sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras micobacteriosis. Noviembre 2018

Modulation of the response of antigen-specific cytotoxic T cells by activation of iNKT cells by glycolipid-modified recombinant bacteria. Bravo-Rodríguez Paula, Bueno Susan, Kalergis Alexis, Carreño Landro.

XXXII ANNUAL MEETING Chilean society for cell biology. Octubre 2018

Improving α -galactosilceramide delivery by incorporation in bacterial membranes. Paula Bravo-Rodríguez, Cristián A. Gutiérrez, Paulina Muñoz y Leandro J. Carreño.

I Reunión Anual de la sociedad Chilena de Inmunología. Viernes 28 de abril 2017, Curauma, Valparaíso, Chile.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutor el Dr. Leandro Carreño Márquez, por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio, por la confianza y apoyo brindado durante este largo proceso. También al Dr. Dante Mirante Wilson quien aceptó ser mi profesor patrocinante apoyándome en el desarrollo de la memoria de título resolviendo dudas e inquietudes, siempre amable y comprensivo.

A mis padres, quienes siempre han creído en mí y en mis capacidades permitiéndome soñar y ser libre.

A mi querido Martin, compañero de vida, cada siesta, paseo o regaloneo me ayuda a recuperar energías, empezar de nuevo. Mi amigo de 4 patas, espero te queden muchos años más para seguir disfrutando de tu compañía.

A Francisco, llegaste a complementar mi vida, me mostraste que siempre se puede ser más, mirar más lejos, ampliaste mis horizontes haciéndome ver que nada es imposible. Gracias por tu cariño, comprensión y respeto.

A mis amigas Pili, Coté y Sile mujeres maravillosas llenas de sueños y aspiraciones, siempre ofreciendo apoyo con tan solo una conversación, compartir un té, un pancito o una tarde de risas.

A mis hermanos (Francisco, Jorge Ricardo y Sandra), mis jefes (Don Osvaldo y Sra Claudia) y todo aquel que confió en mí y me ayudo a conseguir este sueño.

A mis compañeros de laboratorio, Cristian, Pablo y Caro sin ustedes esto no habría sido lo mismo, cada día de trabajo largo e intenso se hacía más ameno gracias a ustedes.

Al final de este largo camino solo puedo agradecer y estar feliz.

ÍNDICE

FINANCIAMIENTO Y PUBLICACIONES.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
Células iNKT.....	3
Activación y ligandos de células iNKT.....	4
Perfiles de secreción de citoquinas generados por ligandos activadores de células iNKT.....	7
<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium y patogénesis.....	8
Respuesta inmune contra ST y rol de las células iNKT.....	9
Modulación de la respuesta inmune anti- <i>Salmonella</i> mediada por células iNKT.....	10
Modelo de ratón <i>knock-in</i> para CD1d humano y sus aplicaciones en el estudio de células NKT.....	11
II. HIPÓTESIS.....	13
III. OBJETIVOS.....	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
IV. METODOLOGÍA.....	14
4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	14
4.2 Hibridomas de célula iNKT hCD1d-KI (K2C10) y condición de cultivo.....	14
4.3 Glicolípidos activadores de células iNKT.....	14
4.4 Incorporación de ligandos glicolipídicos de células iNKT a ST.....	15
4.5 Animales.....	15
4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	15
4.7 Western Blot para detectar OVA.....	16
4.8 Obtención de células dendríticas desde precursores de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO.....	16
4.9 Obtención de esplenocitos de ratones OT-I.....	17
4.10 Infección de DCs con bacterias.....	18

4.11 Co-cultivo de DCs infectadas con linfocitos T (K2C10 o esplenocitos OT-I)	18
4.12 Medición de IL-2 mediante ELISA de tipo Sándwich	19
4.13 Expansión de células iNKT <i>in vivo</i> en ratones C57BL/6 y hCD1d-KI	20
4.13.1 α GC para uso <i>in vivo</i>	20
4.13.2 Preparación de cepas ST para uso <i>in vivo</i>	21
4.13.3 Extracción y procesamiento de bazo	21
4.13.4 Tinción de marcadores de superficie	21
4.14 Experimento <i>in vivo</i> para análisis de la respuesta antígeno-específica de células B y T ..	22
4.14.1.1 Preparación de cepas ST, glicolípidos y ovoalbúmina para uso <i>in vivo</i> para estudiar respuesta antígeno-específica.	22
4.14.1.2 Re-estimulación de linfocitos T CD4 y T CD8 específicos para OVA y ST.	23
4.14.1.3 Tinción de marcadores de superficie, viabilidad y fijación	23
4.14.1.4 Permeabilización y tinción intracelular de citoquinas	24
4.14.2.1 Obtención de suero de ratones C57BL/6 infectados con ST.....	24
4.14.2.2 Medición de IgG total anti-OVA mediante ELISA	24
4.14.2.3 Medición de IgG total anti-ST mediante ELISA.....	25
4.15 Análisis de datos.....	25
V. RESULTADOS	26
5.1 Objetivo específico 1. Generar cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium con glicolípidos incorporados en la membrana celular (ST-OVA-GL), de modo de optimizar la entrega de estos para la activación eficiente de células iNKT.	26
5.1.1 Curva de crecimiento de ST y ST-OVA.....	26
5.1.2 Incorporación de ligandos glicolipídicos de células iNKT a ST-OVA.....	27
5.1.3 Obtención de células dendríticas desde precursores de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO.....	27
5.1.4 Fenotipo hibridomas de célula iNKT hCD1d-KI (K2C10).....	31
5.1.5 Activación de los hibridomas de célula iNKT hCD1d-KI (K2C10) por presentación antigénica de células dendríticas derivadas de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO infectadas con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7.	33
5.1.6 Determinación de la expresión de ovoalbúmina de <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium 14028s Δ Spi-2:: kan/ pUC18-ova amp ^r (ST-OVA) por western blot.....	36
5.1.7 Activación de linfocitos T CD8 de ratones OT- I por presentación antigénica de células dendríticas derivadas de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO infectadas con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7	37

5.2 Objetivo específico 2. Determinar <i>in vivo</i> la expansión de células iNKT generada por las cepas ST-OVA-GL	40
5.2.1 Expansión de células iNKT <i>in vivo</i> por α GC soluble	40
5.2.2 Expansión de células iNKT <i>in vivo</i> por α GC soluble y <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium 14028s Δ Spi-2:: kan/ pUC18-ova amp ^r – α GC (ST-OVA- α GC).....	42
5.3 Objetivo específico 3. Estudiar <i>in vivo</i> la magnitud de anticuerpos provenientes de células B antígeno-específicas para ovoalbúmina (OVA) y <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) en ratones C57BL/6 luego de su inmunización con ST-OVA-GL	44
5.3.1 Respuesta antígeno-específica de linfocitos B de ratones C57BL/6 infectados con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7	44
5.4 Objetivo específico 4. Estudiar <i>in vivo</i> la respuesta celular antígeno-específica de linfocitos T CD8 y CD4 para ovoalbúmina (OVA) y <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) en ratones C57BL/6 luego de su inmunización con ST-OVA-GL	48
5.4.1 Respuesta antígeno-específica de linfocitos T CD4 y CD8 de ratones C57BL/6 infectados con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7	48
VI. DISCUSIÓN.....	67
VII. CONCLUSIÓN	75
VII. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características fenotípicas de células iNKT.	3
Figura 2. Reconocimiento de α GC-CD1d por el TCR de célula iNKT.	4
Figura 3. Tipos de activación de células iNKT.....	6
Figura 4. Estructura de antígenos glicolipídicos activadores de células iNKT.....	7
Figura 5. Transactivación de células T y B generada por la activación de células iNKT..	12
Figura 6. Planificación experimento <i>in vivo</i> para análisis de la expansión de células iNKT..	20
Figura 7. Planificación experimento <i>in vivo</i> para análisis de la respuesta antígeno-específica de células T y B.....	22
Figura 8. Curvas de crecimiento <i>Salmonella</i> Typhimurium.	26
Figura 9. Citometría de flujo de células dendríticas de 5 días de cultivo.....	29
Figura 10. Citometría de flujo de células dendríticas de 7 días de cultivo.....	29
Figura 11. Expresión de CD86 en células dendríticas de 5 días de cultivo.....	30
Figura 12. Expresión de CD86 en células dendríticas de 7 días de cultivo.....	30
Figura 13. Citometría de flujo de los hibridomas K2C10.....	32
Figura 14. Ensayo de activación <i>in vitro</i> de los hibridomas K2C10.	35
Figura 15. Caracterización de la expresión de OVA en ST.....	36
Figura 16. Ensayo de activación <i>in vitro</i> de esplenocitos derivados de ratones OT-I.	39
Figura 17. Expansión de células iNKT por administración de α GC soluble a ratones hCD1d-KI.	41
Figura 18. Citometría de flujo de esplenocitos de ratones C57BL/6 teñidos para observar células iNKT.	43
Figura 19. Detección de IgG anti-OVA en sueros.	45
Figura 20. Detección de IgG anti-ST en sueros.....	47
Figura 21. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de CD44.	50
Figura 22. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de CD62L.	51
Figura 23. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de LAMP-1.....	52
Figura 24. Frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN γ	53
Figura 25. Frecuencia de células T CD8+ para marcadores de memoria y citotoxicidad.....	55
Figura 26. Frecuencia de células T CD4+ productoras de TNF α	58
Figura 27. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ	59
Figura 28. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-2.....	60
Figura 29. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-4.	61
Figura 30. Frecuencia de células T CD4+ productoras de TNF α	62
Figura 31. Multifuncionalidad de células T CD4 re-estimuladas con ovoalbúmina.	64
Figura 32. Multifuncionalidad de células T CD4 re-estimuladas con SIINFEKL.	65
Figura 33. Multifuncionalidad de células T CD4 re-estimuladas con ST.	66

ABREVIATURAS

ACK-	Tampón de lisis ACK (cloruro de amonio-potasio)
APC –	Célula presentadora de antígenos
BSA –	Albumina de suero bovino
CFA-	Adyuvante completo de Freund's
DC -	Célula dendrítica
DMEM -	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO –	Dimetilsulfóxido
dNKT –	Células T asesinas naturales diversas
ELISA -	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FACS -	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FBS –	Suero fetal bovino
HRP -	Peroxidasa de rábano picante
iG3b -	<i>Isoglobotrihexosylceramide</i>
IgG –	Inmunoglobulina G
IL-	Interleuquina
iNKT-	Células T asesinas naturales invariantes
kDa -	Kilodalton
LB –	Luria Bertani
LPS -	Lipopolisacárido
MHC –	Complejo mayor de histocompatibilidad

NKT –	Célula asesina T
OD –	Densidad óptica
OVA -	Ovoalbúmina
PAGE -	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS -	<i>Phosphate buffered saline</i>
RPMI -	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDS -	Dodecilsulfato sódico
ST –	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium
ST-OVA -	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium recombinante para ova
ST-OVA-GL –	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium con glicolípidos y recombinante para ova
TCR –	Receptor de células T
TEMED -	Tetrametiletilendiamina
Th0 -	<i>T helper 0</i>
Th1 -	<i>T helper 1</i>
Th2 -	<i>T helper 2</i>
TMB -	Tetrametilbenzidina
UFC –	Unidades formadoras de colonias
α GC –	α -galactosilceramida
β GlcCer -	<i>β-D-glucoopyranosylceramide</i>

RESUMEN

Las células T asesinas naturales (NKT) son una población conservada de efectores de tipo innato que reconocen antígenos glicolípidos específicos presentados por la molécula CD1d. Un importante subgrupo de estas células se activa de manera específica por los glicolípidos de la familia α -galactosilceramida (α GC), el cual se conoce como células asesinas naturales invariantes (iNKT), las que además se caracterizan por presentar una cadena α del receptor de células T (TCR) invariante ($V\alpha 14J\alpha 18$ en ratones, $V\alpha 24J\alpha 18$ en humanos), junto un repertorio de cadenas TCR β semi-variante. La estimulación de las células iNKT por glicolípidos da como resultado la producción de una amplia gama de citoquinas que incluyen IFN γ e IL-4, además de otras involucradas en procesos como la activación células B y células T convencionales. Esta cascada de reacciones inmunitarias iniciada por las células iNKT en respuesta a glicolípidos ha demostrado generar inmunidad innata y adaptativa contra una amplia gama de infecciones en modelos de ratones. Además, los glicolípidos activadores de células iNKT se han considerado como posibles adyuvantes de vacunas. Se han descrito incorporaciones de ligandos activadores de células iNKT en bacterias como *Listeria monocitogenes* y *M. bovis BCG*, las que provocaron aumentos en la calidad de la respuesta inmune adquirida antígeno-específica de células B y T. En este trabajo se evaluó la capacidad de ocupar a la bacteria gram-negativo *Salmonella Typhimurium* (ST), como vector de entrega de glicolípidos activadores de células iNKT, para estudiar el efecto de su activación y secreción de citoquinas sobre la actividad de células B y T antígeno-específicas contra ST y el antígeno modelo ovoalbúmina. Los resultados dieron cuenta de que la incorporación de los ligandos α GC y AH10-7 sobre la membrana celular de ST fueron capaces de activar los hibridomas de células iNKT K2C10, evidenciando que las incorporaciones de ambos glicolípidos se realizaron de forma exitosa. Además, al analizar la expresión de la proteína ovoalbúmina en las cepas ST-OVA-GL estas no mostraron una disminución con respecto a la cepa control, por lo tanto, la incorporación de ligandos de células iNKT no afectó la expresión del antígeno a estudiar. La respuesta B antígeno-específica contra ST mostró la influencia de los ligandos activadores de células iNKT en la respuesta humoral anti-IgG al día 21. Por otro lado la respuesta celular con respecto a la incorporación del glicolípidos AH10-7 sobre la membrana bacteriana provocó un aumento en la producción de IL-2, IL-4 e IL17 por parte de las células T CD4 específicas para ST en comparación con la cepa control. En conclusión, la incorporación del ligando activador de células iNKT AH10-7 sobre la membrana celular de ST pudo inducir un aumento en la producción de IL-2, IL-4 e IL-17 en células T CD4+ específicas para ST.

ABSTRACT

Modulation of antigen-specific T and B cell response by activation of iNKT cells by *Salmonella* Typhimurium modified with glycolipids

Natural killer T cells (NKT) are a conserved population of innate-type effectors that recognize specific glycolipid antigens presented by the CD1d molecule. An important subgroup of these cells is activated specifically by the glycolipids of the α -galactosylceramide family (α GC), which is known as invariant natural killer cells (iNKT), which are also characterized by having an α chain of the receptor invariant T cells (TCR) ($V\alpha 14J\alpha 18$ in mice, $V\alpha 24J\alpha 18$ in humans), together a repertoire of TCR β semi-variant chains. The stimulation of iNKT cells by glycolipids results in the production of a wide range of cytokines including IFN γ and IL-4, in addition to others involved in processes such as activation of B cells and conventional T cells. This cascade of immune reactions initiated by iNKT cells in response to glycolipids has been shown to generate innate and adaptive immunity against a wide range of infections in mouse models. In addition, the activating glycolipids of iNKT cells have been considered as possible vaccine adjuvants. Incorporations of activating ligands of iNKT cells in bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *M. bovis* BCG have been described, which caused increases in the quality of the antigen-specific acquired immune response of B and T cells. In this work, the capacity of to occupy the gram-negative bacterium *Salmonella* Typhimurium (ST), as delivery vector of glycolipid activators of iNKT cells, to study the effect of its activation and secretion of cytokines on the activity of antigen-specific B and T cells against ST and the Ovalbumin antigen model. The results showed that the incorporation of the ligands α GC and AH10-7 on the cell membrane of ST were able to activate the hybridoma of iNKT K2C10 cells, realizing that the incorporations of both glycolipids were carried out successfully, in addition to analyzing the Ovalbumin protein expression in the ST-OVA-GL strains did not show a decrease with respect to the control strain, therefore the incorporation of iNKT cell ligands did not affect the expression of the antigen to be studied. The antigen-specific response B against ST showed the influence of the activating ligands of iNKT cells on the humoral anti-IgG response at day 21. On the other hand, the cellular response with respect to the incorporation of glycolipids AH10-7 on the bacterial membrane caused an increase in the production of IL-2, IL-4 and IL17 by ST-specific CD4 T cells compared to the control strain. In conclusion, the incorporation of the activating ligand of iNKT AH10-7 cells on the ST cell membrane could induce an increase in the production of IL-2, IL-4 and IL-17 in ST-specific CD4 + T cells.

I. INTRODUCCIÓN

Células iNKT

Las células T asesinas naturales (NKT) son un grupo especializado y heterogéneo de linfocitos T que se desarrollan en el timo y son sometidos a la reorganización y selección del receptor de células T (TCR) mediante la molécula CD1d (Gapin *et al.* 2001, Godfrey *et al.* 2010). Además, presentan receptores como NK1.1, CD161, NKG2D y miembros de la familia Ly-49, que comúnmente se expresan en linfocitos Natural Killer (NK) (Arase *et al.* 1996, Bricard *et al.* 2007, Carreño *et al.* 2014). Estas células pueden regular la respuesta inmune contra patógenos (Kinjo *et al.* 2013), tumores (Robertson *et al.* 2014) y auto-antígenos (Simoni *et al.* 2013), por lo tanto, son un importante blanco de estudio para el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas. Se pueden distinguir dos subconjuntos principales de células NKT en función de su repertorio del receptor de células T (TCR) y la reactividad ante lípidos: Las células tipo I, NKT invariantes (iNKT) y las células tipo II, NKT diversos (dNKT). Las células iNKT, se caracterizan por presentar una cadena TCR α invariante (V α 14J α 18 en ratones, V α 24J α 18 en humanos) junto un repertorio de cadenas TCR β semi-variante, utilizando predominantemente V β 8, V β 7 y V β 2 en ratones y V β 11 en humanos (Carreño *et al.* 2014).

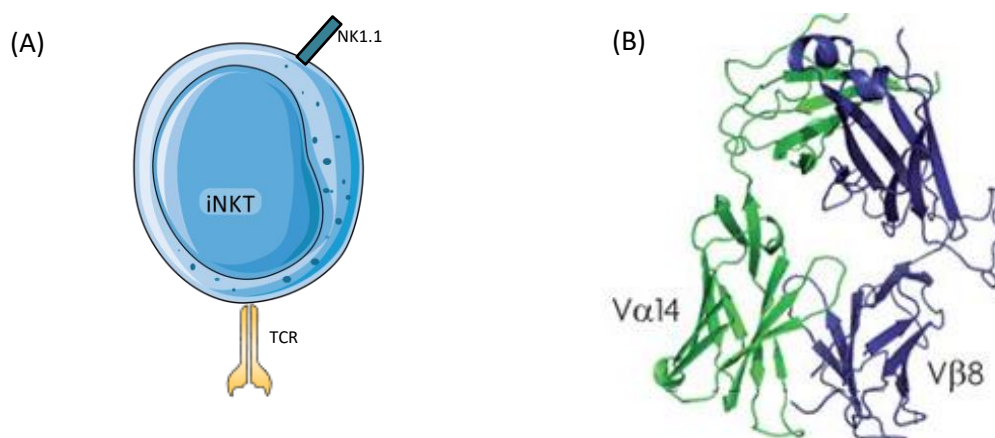


Figura 1. Características fenotípicas de células iNKT. En (A) figura representativa de una célula iNKT con co-expresión de receptores típicos como NK1.1 y TCR. En (B) representación tridimensional de la estructura de las cadenas V α 14 – V β 8 del TCR de las células iNKT de ratón. Figura modificada de (Gapin *et al.* 2010 y Brennan *et al.* 2013).

Activación y ligandos de células iNKT

La activación de células iNKT puede ser gatillada mediante la unión de su TCR con complejos CD1d-glicolípidos de células presentadoras de antígenos, con citoquinas inflamatorias o una combinación de ambos (Brigl *et al.* 2003, Uldrich *et al.* 2005). Una vez que las células NKT se activan, estas son capaces de modular la respuesta inmune hacia respuestas de tipo pro- o anti-inflamatorias dependiendo del lípido o glicolípido enlazado a la molécula CD1d y el reconocimiento de éste por el TCR de la célula iNKT (Schmieg *et al.* 2003, Padte *et al.* 2011). La secreción de citoquinas por células NKT ocurre de forma extremadamente rápida y es muy variada, incluyendo citoquinas clásicamente asociadas a respuestas de células T CD4 de tipo Th1 (pro-inflamatorias), como IFN γ y TNF α , y de tipo Th2 (anti-inflamatorias) como IL-4 e IL-13 (Coquet *et al.* 2008, Goto *et al.* 2009). En adelante hablaremos de respuestas de células T tipo Th1 y tipo Th2.

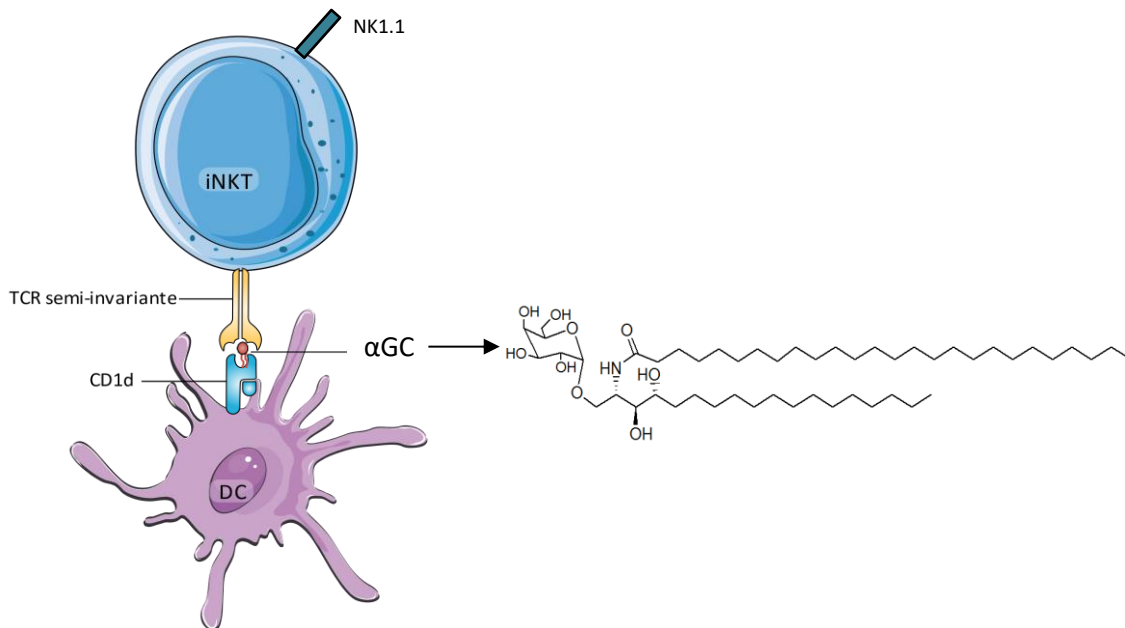


Figura 2. Reconocimiento de α GC-CD1d por el TCR de célula iNKT. En el esquema se muestra el reconocimiento del complejo α GC-CD1d de una célula dendrítica (DC) por el TCR de una célula iNKT. Además, se señala la estructura del antígeno lipídico α -galactosilceramida (α GC). Figura modificada de (Brennan *et al.* 2013).

El estudio de ligandos de células iNKT se ha centrado en caracterizar su función dividiéndolos en dos grupos. El primer grupo, constituido por ligandos lipídicos y glicolipídicos exógenos, como α -galactosilceramida (α GC) de la esponja marina *Agelas mauritanus* y ligandos provenientes de microorganismos como *Mycobacterium bovis*, *Borrelia burgdorferi*, *Sphingomonas spp.*, *Leishmania donovani* y *Streptococcus pneumoniae* (Amprey *et al.* 2004, Fischer *et al.* 2004, Venkataswamy *et al.* 2010). El glicolípido α GC ha sido el ligando de células iNKT más estudiado y su descubrimiento llevó al desarrollo de una forma sintética, también conocida como KRN7000, que unido a CD1d puede activar potentemente a células iNKT (Kobayashi *et al.* 1995, Kawano *et al.* 1997). Debido a que KRN7000 se une a CD1d para formar un complejo de alta afinidad por el TCR de células iNKT en modelos murinos y humanos, ha sido utilizado para la detección y cuantificación de células iNKT a través de citometría de flujo mediante su uso en tetrámeros KRN7000-CD1d marcados fluorescentemente (Sidobre *et al.* 2002, Im *et al.* 2004).

El segundo grupo lo constituyen los ligandos endógenos como lípidos y fosfolípidos (glicosilfosfatidilinositoles y glicoesfingolípidos), los que se han propuesto como responsables de la selección y mantenimiento homeostático de las células iNKT (Gumperz *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2004), sin embargo, estudios han demostrado que éstos también son capaces de activar las células iNKT en contextos infecciosos (Mattner *et al.* 2005). En estudios con ratones infectados con ST, bacteria que no expresa moléculas activadoras de células NKT, se descubrió que la activación de estas células se produce como resultado de la estimulación de los receptores de tipo toll (TLR) de las células presentadoras de antígenos (CPA) por lipopolisacárido (LPS), induciendo la secreción de citoquinas como IL-12 e IFN γ por parte de las células dendríticas, lo que a su vez provoca la activación de las células iNKT (Mattner *et al.* 2005, Paget *et al.* 2007, Darmoise *et al.* 2010). En el mismo estudio se observó que las células dendríticas a su vez sintetizan y presentan un lípido endógeno estimulante conocido como iGb3 (isoglobotrihexosilceramida), molécula capaz de activar a células iNKT (Darmoise *et al.* 2010). Este proceso se denominó activación indirecta, debido a que las bacterias inducen la síntesis de un antígeno estimulante y citoquinas por parte de las células presentadoras de antígeno del hospedero. Estas a su vez son capaces de provocar la

activación de células iNKT, las que al activarse secretan grandes cantidades de IFN γ (Darmoise *et al.* 2010). A la fecha, aún no se ha identificado el espectro completo de lípidos estimulantes endógenos, pero se conocen con certeza el iGb3 y la β -D-glucopyranosylceramide (β GlcCer), también llamados glicolípidos propios (Zhou *et al.* 2004, Brennan *et al.* 2011).

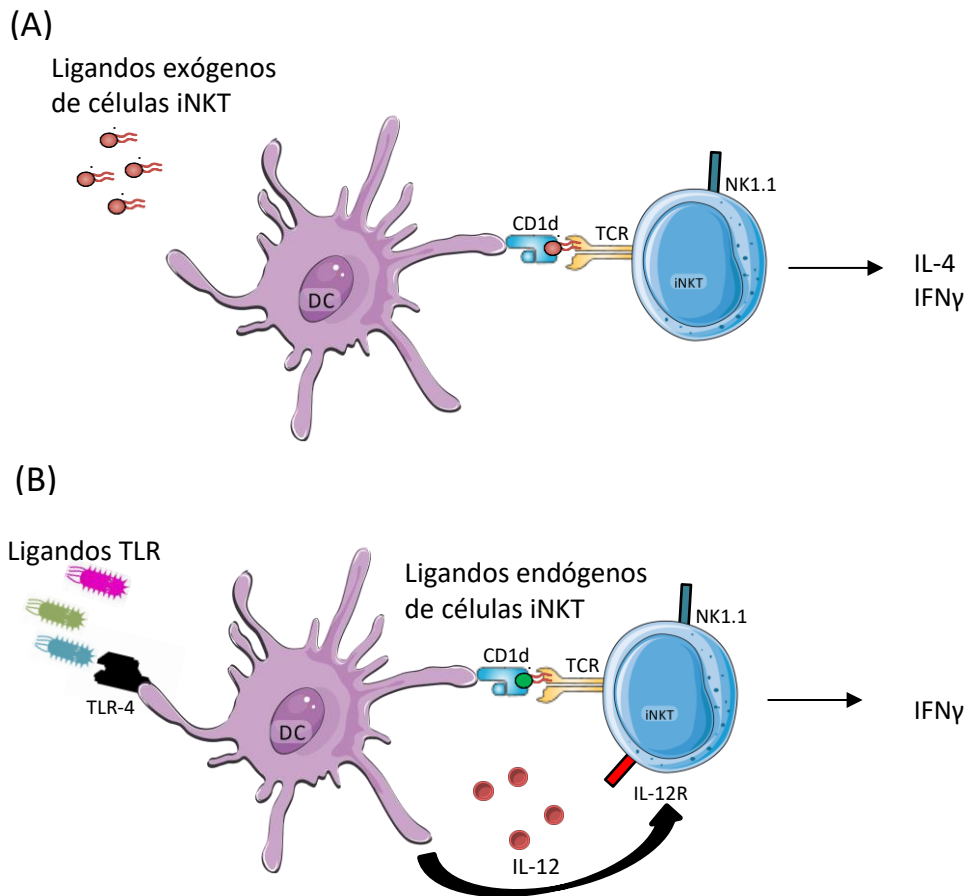


Figura 3. Tipos de activación de células iNKT. En (A) se muestra un esquema de la activación directa de células iNKT provocada por antígenos exógenos procesados por células dendríticas y presentados en el contexto de la molécula CD1d y el reconocimiento por el TCR de células iNKT generando su activación y liberación de citoquinas. En (B) se muestra un esquema de la activación indirecta de células iNKT mediada por ligandos de receptores de tipo Toll (TLR) de células dendríticas, los cuales provocan la producción y secreción de interleuquina 12 (IL-12) por parte de las células dendríticas lo que genera la activación de células iNKT. En conjunto las células dendríticas también son capaces de presentar antígenos endógenos y presentarlos mediante CD1d para contribuir a la activación de las células iNKT y la consecuente liberación de citoquinas. Figura modificada de (Van Kaer 2007).

Perfiles de secreción de citoquinas generados por ligandos activadores de células iNKT

Una de las limitaciones que tiene el uso *in vivo* de KRN7000 para estudiar la activación de células iNKT en ratones, es la inducción de una respuesta inmune mixta, lo que significa una secreción de citoquinas de tipo Th1 y Th2, las cuales se detectan a las pocas horas posteriores a su inyección (Im *et al.* 2009). La respuesta mixta generada *in vivo* por KRN7000 llevó a que este compuesto se clasificara como ligando iNKT tipo Th0 (Arora *et al.* 2011). Tomando en consideración este hecho, se han desarrollado múltiples análogos estructurales del compuesto capaces de inducir una respuesta inmune específica, desarrollando un perfil de secreción de citoquinas definido, ya sea de tipo Th1 o Th2 en células iNKT. Entre los análogos con capacidad de inducir respuestas tipo Th1, el derivado C-glicósido (α -C-GalCer) y el derivado del ácido graso fluorofentil (7DW8-5) han mostrado gran potencial como activadores de células iNKT en modelos *in vivo* (Li *et al.* 2010, Padte *et al.* 2011). También se han identificado análogos de α GC capaces de inducir un perfil de secreción tipo Th2, tales como el análogo OCH, con cadenas de esfingosina y acil truncadas y α GC C20:2, con una cadena truncada y una cadena acil insaturada (Miyamoto *et al.* 2001, Yu *et al.* 2005). Las modificaciones de los ligandos que aumentan la hidrofobicidad generan un perfil de respuesta tipo pro-inflamatorio (Th1), mientras que las modificaciones que realzan la solubilidad de los ligandos en ambientes acuosos presentan un perfil de respuesta anti-inflamatorio (Th2) (Zhou *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2007). Como se mencionó anteriormente existen bacterias capaces de activar células iNKT de forma indirecta por medio de la presentación de iG3b y la secreción de IL-2 por APC, una bacteria capaz de provocar tal activación es ST (Darmoise *et al.* 2010).

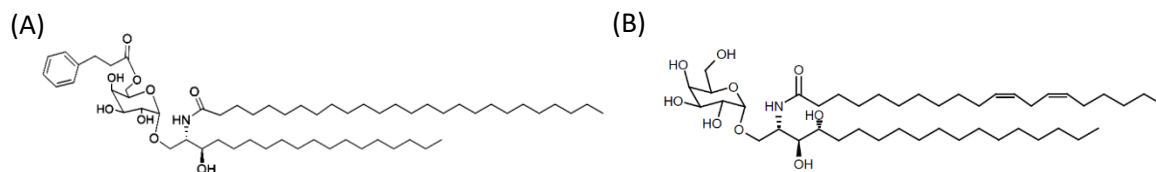


Figura 4. Estructura de antígenos glicolipídicos activadores de células iNKT. En (A) se muestra la estructura del glicolípido AH10-7 capaz de inducir un perfil de secreción de citoquinas de tipo Th1 por parte de células iNKT. En (B) se muestra la estructura del glicolípido DB03-4 capaz de inducir un perfil de secreción de citoquinas de tipo Th2 por parte de células iNKT. Figura modificada de (Carreño et al. 2016).

***Salmonella enterica* spp. *enterica* ser. Typhimurium y patogénesis**

Salmonella enterica spp. *enterica* ser. Typhimurium (ST) es una bacteria intracelular Gram-negativo, la cual se contagia a través de agua o alimentos contaminados, su periodo de incubación varía entre 6 a 72 horas, lo que depende de la susceptibilidad del hospedero y del inoculo (Mäkelä *et al.* 1997). En humanos, ST causa una gastroenteritis autolimitada con manifestaciones clínicas que abarcan náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarreas, mientras que en ratones produce una enfermedad sistémica con una patogénesis parecida a la fiebre tifoidea en humanos (Haraga *et al.* 2008).

En ratones, luego de la ingesta de agua o alimentos contaminados, ST puede sobrevivir al pH ácido del estómago y llegar al íleon donde es capaz de invadir las células epiteliales del intestino. ST utiliza distintas estrategias para invadir la mucosa intestinal, siendo la principal vía de invasión a través de las células M hacia los parches de Peyer, fenómeno conocido como transcitosis. Alternativamente, ST invade mediante captación por enterocitos, o como tercer mecanismo, mediante la interacción con proteínas efectoras bacterianas del sistema de secreción de tipo 3, las que inducen la captura de la bacteria por células dendríticas y macrófagos (Richter-Dahlfors *et al.* 1997). Es importante destacar que ST puede entrar y sobrevivir en el interior de células fagocíticas y no fagocíticas, lo que permite su replicación y diseminación a otros tejidos como el bazo e hígado (Richter-Dahlfors *et al.* 1997). Además, ST es capaz de escapar de la presentación antigénica mediada por células dendríticas controlando la expresión de genes de virulencia codificados en las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2), con lo que interfiere con la función de las células dendríticas. SPI-1 y SPI-2 codifican el sistema de secreción de tipo 3 (TTSS) que transloca proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedera. Estas proteínas efectoras modifican el metabolismo celular para la entrada y supervivencia dentro de las células hospederas. La translocación de las proteínas efectoras por el TTSS codificado en la SPI-2 aumenta la supervivencia intracelular bacteriana al prevenir la fusión de las vacuolas contenedoras de ST con el lisosoma (Uchiya *et al.* 1999).

Respuesta inmune contra ST y rol de las células iNKT

El desarrollo de la infección provocada por ST desencadena el despliegue tanto de la respuesta inmune innata como adquirida durante el curso de la infección. En las etapas iniciales macrófagos y neutrófilos son los encargados de controlar la infección mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (Vassiloyanakopoulos *et al.* 1998, Rydstrom *et al.* 2007). El IFN γ es una citoquina importante para el control de la replicación bacteriana en la fase temprana de la infección, pero ha demostrado no ser suficiente para lograr su completa erradicación (Blanchette *et al.* 2003). La citoquina TNF α ayuda a mejorar la actividad bactericida de IFN γ , desencadenando la producción especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por macrófagos (Nauciel *et al.* 1992, Gulig *et al.* 1997). Se ha demostrado que citoquinas como IFN γ , IL-12 y TNF α son importantes para el aclaramiento en la infección con ST (Nauciel *et al.* 1992), mientras que IL-10 e IL-4 han demostrado ser permisivas para la infección (Arai *et al.* 1995, Everest *et al.* 1997). Las células NKT también contribuyen a la liberación de grandes cantidades de IFN γ en etapas tempranas de la infección, ya que tienen la particularidad de responder rápidamente (Brigl *et al.* 2003). El IFN γ secretado por células NKT después de su activación podría servir para desencadenar las funciones efectoras mediadas por células como macrófagos o modular la producción de anticuerpos por células B (Brigl *et al.* 2003). En cuanto a la respuesta inmune adquirida contra ST, se ha descrito que la generación de anticuerpos específicos contra antígenos bacterianos juega un rol fundamental en la erradicación de la infección, así como la generación de memoria inmunológica (Brown *et al.* 1989, Mittrucker *et al.* 2000). En cuanto a la respuesta celular, la producción temprana de IFN γ e IL-12 puede afectar la magnitud de la respuesta de células T CD4 y CD8 específicas, en la extensión y durabilidad de la memoria. Además, IL-12 es capaz de polarizar los linfocitos T a una respuesta de tipo Th1, la que se caracteriza por la participación de IFN γ en etapas más tardías de la infección (Trinchieri 1995). Si bien la respuesta inmune innata contribuye a la eliminación de ST en las etapas iniciales de la infección, es la respuesta inmune específica la encargada de erradicar la infección por completo, así como la generación de la memoria inmunológica que será la encargada de responder en infecciones posteriores (Brown *et al.* 1989, Mittrücker *et al.* 2000).

Modulación de la respuesta inmune anti-*Salmonella* mediada por células iNKT

La capacidad de las células iNKT de secretar una gran variedad de citoquinas permite la activación de otros tipos celulares del sistema inmune como células dendríticas, células NK, células B y células T durante el establecimiento de la respuesta inmune, proceso conocido como transactivación (Carnaud *et al.* 1999, Kitamura *et al.* 2000, Bricard *et al.* 2007).

La activación de células B se relaciona con la cantidad de los anticuerpos que serán secretados, los isotipos que participarán en la respuesta inmune efectora y el establecimiento de la memoria inmunológica (Parker 1993). Estudios han demostrado que la activación de células iNKT por α GC ejerce influencia en las células B, llevando a la generación de memoria y provocando un aumento en la producción de anticuerpos. Sin embargo, aún no se ha estudiado la influencia de otros glicolípidos estimulantes de células iNKT en la producción diferencial de anticuerpos y el cambio de isotipo en células B (Galli *et al.* 2007, Lang *et al.* 2008).

En experimentos de infección de ratones con ST se encontró que el agotamiento de las células T CD4, a diferencia de las células T CD8, tuvo un efecto más pronunciado en el control de la infección primaria por ST y en la protección inducida por la vacunación con cepas atenuadas de ST (Nauciel 1990, Mastroeni *et al.* 1992, Pie *et al.* 1997). Sin embargo, también hay evidencia de la participación de células T CD8 en la inmunidad contra ST, ya que el agotamiento de las células T CD8 redujo la capacidad de transferir protección contra cepas virulentas (Nauciel 1990, Mastroeni *et al.* 1992). Experimentos *in vivo* de activación de células iNKT por administración de α GC soluble a ratones evidenciaron la transactivación de células B y células T CD8 y CD4, lo que se analizó por medio del aumento en la expresión del marcador de activación CD69 (Kitamura *et al.* 2000).

Considerando la importancia de las células B y células T CD8 y CD4 en el establecimiento de la respuesta inmune antígeno-específica y en la generación de la memoria inmunológica, la modulación de su respuesta mediada por la activación de células iNKT representa un gran potencial inmunoterapéutico.

Modelo de ratón *knock-in* para CD1d humano y sus aplicaciones en el estudio de células NKT

Los ensayos *in vivo* realizados para el estudio de la activación de células iNKT utilizando modelos murinos no consideraron el hecho de que la frecuencia de células iNKT, así como la relación iNKT/dNKT, es más alta que en comparación con los humanos, hecho que no permite extrapolar los datos obtenidos en modelos murinos (Godfrey *et al.* 2000, Bendelac *et al.* 2007). Estas limitaciones sustentaron el desarrollo de un modelo murino humanizado, el ratón *knock-in* para CD1d humano, el cual presentó frecuencia, distribución tisular y relación iNKT/dNKT semejante a la relación observada en humanos, manteniendo sus funciones inmunomoduladoras en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Wen *et al.* 2013).

Una de las limitaciones del uso de lípidos y glicolípidos en ensayos *in vivo* en modelos murinos para la inmunoterapia basada en células iNKT, es la ocurrencia de efectos no deseados tales como toxicidad hepática con presencia de daño tisular, y la elevación de transaminasas hepáticas debido a la administración de altas dosis de lípidos libres (Osman *et al.* 2000). Adicionalmente, otro efecto secundario fue la anergia de las células NKT luego de administraciones repetidas de glicolípidos solubles (Sullivan *et al.* 2005). Una manera de resolver los efectos no deseados es entregar los glicolípidos mediante su incorporación en la membrana celular de vectores bacterianos, de modo de tener un mejor control de la dosis, solubilidad y destino de estos. Ciertas bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* han sido utilizadas para estudiar la protección celular mediada por la inmunidad adaptativa, realizando modificaciones tanto a nivel génico para la expresión de antígenos, como modificaciones externas en la membrana celular, incorporando glicolípidos activadores de células NKT (Venkataswamy *et al.* 2009). La incorporación de α GC al bacilo *Calmette-Guérin*, una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* utilizada como vacuna en la prevención de la enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, permitió la activación de células NKT, el aumento de la maduración de células dendríticas y la preparación de respuestas inmunes ejecutadas por linfocitos T CD8 antígeno-específicos (Venkataswamy *et al.* 2009). La incorporación de α GC a una cepa recombinante de *Listeria monocytogenes* que expresaba el antígeno asociado a tumor Mage-b, empleada como vector de entrega del glicolípido para la activación de células NKT en un modelo murino

para cáncer de mama metastásico, permitió la eliminación completa de las metástasis sin producir toxicidad (Singh *et al.* 2014). Estos estudios avalan el potencial que posee la incorporación de ligandos glicolipídicos en vectores bacterianos para la activación de células NKT y la transactivación de células B y T potenciando la inmunidad adaptativa, así como el uso del ratón *knock-in* para CD1d humano en el estudio de las propiedades inmunomoduladoras de las células NKT tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. En relación a los antecedentes descritos se propone utilizar una cepa de ST recombinante para la expresión de la proteína ovoalbúmina, como vector de entrega de glicolípidos activadores de células iNKT, para estudiar su influencia en la inmunomodulación de la respuesta de células B y células T antígeno-específicas para la proteína ovoalbúmina en un modelo de ratón C57BL/6.

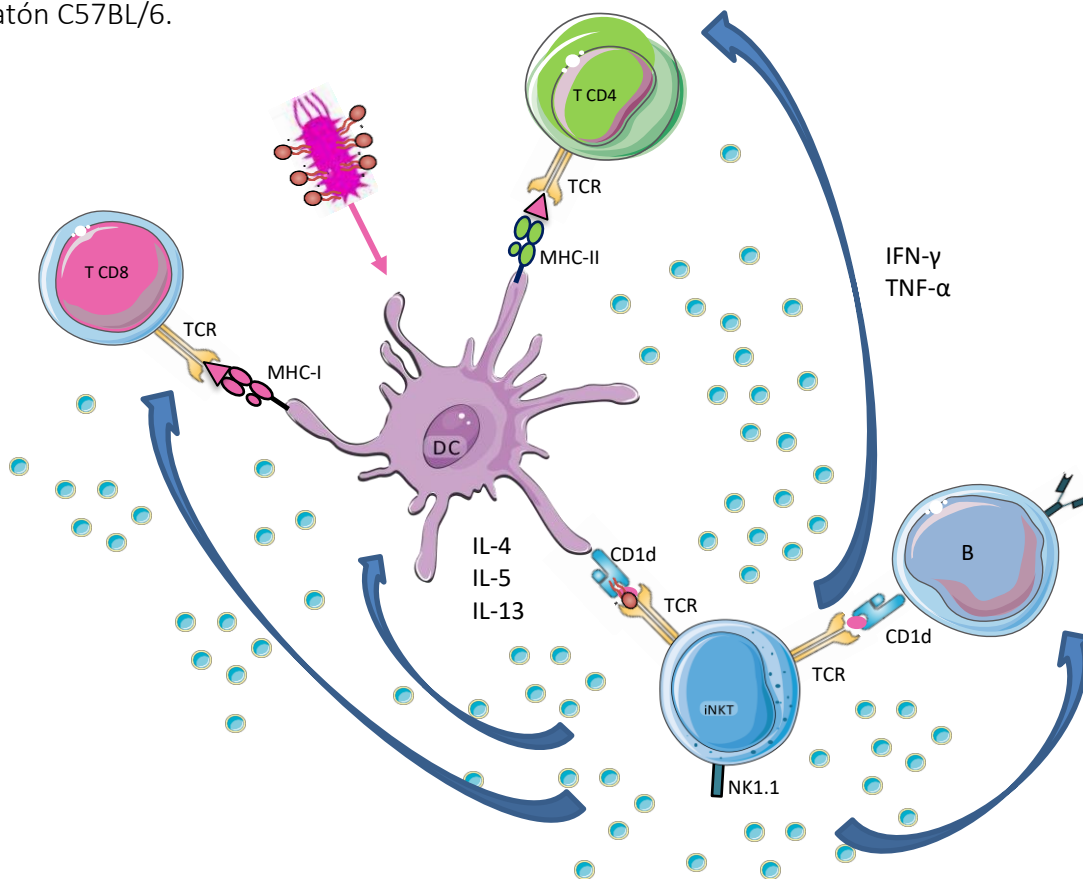


Figura 5. Transactivación de células T y B generada por la activación de células iNKT. En el esquema se muestra como la incorporación de ligandos activadores de células iNKT en la membrana celular bacteriana puede generar la activación directa de células iNKT luego del procesamiento y presentación antigénica de glicolípidos por parte de las células dendríticas en el contexto de la molécula CD1d con la consecuente activación de las células iNKT y la liberación de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-13, TNF α e IFN γ para modular la respuesta de células B y células T CD4 y CD8. Figura original de elaboración propia.

II. HIPÓTESIS

La activación de células iNKT mediante ST-OVA-GL potencia la respuesta T y B antígeno-específica contra ovoalbúmina (OVA) y *Salmonella* Typhimurium (ST) en ratones C57BL/6.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

1. Evaluar la respuesta T y B antígeno-específica contra OVA y ST en ratones C57BL/6 inoculados con *Salmonella* Typhimurium modificada con glicolípidos activadores de células iNKT (ST-OVA-GL).

Objetivos específicos

1. Generar cepas de *Salmonella* Typhimurium con glicolípidos incorporados en la membrana celular (ST-OVA-GL), de modo de optimizar la entrega de estos para la activación eficiente de células iNKT.
2. Determinar *in vivo* la expansión de células iNKT generada por las cepas ST-OVA-GL
3. Estudiar *in vivo* la magnitud de anticuerpos provenientes de células B antígeno-específicas para ovoalbúmina (OVA) y *Salmonella* Typhimurium (ST) en ratones C57BL/6 luego de su inmunización con ST-OVA-GL.
4. Estudiar *in vivo* la respuesta celular antígeno-específicas de linfocitos T CD8 y CD4 para ovoalbúmina (OVA) y *Salmonella* Typhimurium (ST) en ratones C57BL/6 luego de su inmunización con ST-OVA-GL.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas *Salmonella enterica* spp. *enterica* ser. Thyphimurium 14028s Δ Spi-2::kan (ST) y *Salmonella enterica* spp. *enterica* ser. Thyphimurium 14028s Δ Spi-2::kan/pUC18-ova amp^r (ST-OVA) (Tobar *et al.* 2006), se obtuvieron gracias a la colaboración con el Dr. Alexis Kalergis de la Pontífice Universidad Católica de Chile. Las cepas fueron crecidas en medio LB a 37 °C en un agitador de cultivo bacteriano. La cepa ST recombinantes para OVA fue crecida en medio LB con Ampicilina 100 µg/ml. Todos los stocks de bacterias fueron guardados a -20 °C en 37 % vol/vol de glicerol.

4.2 Hibridomas de célula iNKT hCD1d-KI (K2C10) y condición de cultivo

Los hibridomas de células iNKT hCD1d-KI K2C10 fueron generados en el laboratorio de inmunomodulación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por la estudiante de doctorado Carolina Schäfer. Para la generación de este hibridoma, células iNKT aisladas desde esplenocitos de ratón hCD1d-KI se fusionaron con la línea celular BW5147.G.1.4 T-TCR negativas para obtener los hibridomas de células iNKT según (Mayer 1991). Estos fueron cultivados en medio DMEM suplementado al 10% con FBS en estufa de cultivo celular a 37°C, 5% CO₂ y 100% humedad.

4.3 Glicolípidos activadores de células iNKT

Los glicolípidos utilizados α GC y AH10-7 fueron reconstituidos en DMSO 100% a concentración de 1 mg/mL. El glicolípido α GC (KRN7000) se obtuvo desde Avanti polar lipids, USA y la variante AH10-7 se obtuvo gracias a la colaboración con el Dr. Steven A. Porcelli, *Albert Einstein college of medicine*.

4.4 Incorporación de ligandos glicolipídicos de células iNKT a ST

Para la incorporación de ligandos glicolipídicos activadores de células iNKT sobre la membrana celular de ST-OVA se utilizó un protocolo descrito previamente (Venkataswamy *et al.* 2009). Se prepararon inóculos de ST-OVA en presencia de 100 µg/mL ampicilina en medio LB a 37 °C en un agitador de cultivo bacteriano hasta OD₆₀₀: 0,6 - 0,7. Una vez alcanzado el crecimiento bacteriano indicado, se procedió a preparar un nuevo inóculo concentración 1/100 en medio LB precalentado a 37°C en presencia de 20 µg/mL de glicolípido (αGC o AH10-7) y 0,05% tyloxapol, hasta OD₆₀₀: 0,6 – 0,8. Luego de realizar la incorporación de los glicolípidos a la membrana de ST-OVA, se realizaron tres lavados con una solución de tyloxapol 0,05% preparada en PBS 1X. Las cepas ST-OVA-GL se guardaron en 37 % vol/vol medio LB/ glicerol a -20 °C con OD definidas.

4.5 Animales

Todos los trabajos con animales fueron realizados de acuerdo a las normas institucionales de bioética y bioseguridad establecidas por el ICBM y CONICYT. El uso de los animales usados en esta tesis se enmarca en el protocolo aprobado del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile código CBA 0873.

Los ratones utilizados corresponden a las siguientes cepas: C57BL/6; ratones transgénicos OT-I, con células T que reconocen el complejo pMHC H-2Kb/OVA257-264 ya que poseen TCRs específicos para péptidos derivados de la proteína ovoalbúmina (Hogquist *et al.* 1994); ratones *knock-in* para CD1d (hCD1d-KI), los que se caracterizan por tener reemplazado el gen CD1d murino por el gen CD1d humano (Wen *et al.* 2013) y ratones knock-out para el gen CD1d, por lo tanto estos ratones no expresan la molécula CD1d (CD1d-KO) (Exley *et al.* 2003) (Sonoda *et al.* 1999).

4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La resolución de la proteína ovoalbúmina desde cepas lisadas de ST-OVA se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %. Para el gel resolutivo se preparó una solución mezclando acrilamida/bisacrilamida 30%, persulfato de amonio 10%, TEMED, agua

y solución tampón A (Tris-HCL 1,5 M, 0,4 % SDS, pH 8,8) o solución tampón B (Tris-HCL 0,5 M, 0,4 % SDS, pH 6,8) para el gel concentrador. La electroforesis se realizó en una cámara Miniprotean3. Las muestras fueron mezcladas con *buffer* de carga (4X Laemmli Sample Buffer, BIO RAD cat#161-0747) hasta concentración 1X y calentadas a 100 °C por 5 min. Las muestras fueron cargadas en el gel de poliacrilamida y resueltas en solución tampón SDS-PAGE por 2,5 horas a 120 V.

4.7 Western Blot para detectar OVA

La detección de la proteína OVA en las bacterias transformadas con el plasmidio pUC18-ova amp^r se llevó a cabo mediante Western Blot. Las muestras fueron mezcladas con *buffer* de carga para quedar a concentración 1X y calentadas a 100 °C por 5 min. También se prepararon muestras de extractos bacterianos de cepas sin transformar y OVA soluble (50 ng) como controles negativo y positivo, respectivamente. Posteriormente las muestras fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 12 % por 2,5 horas a 120 V y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis a 350 mA por 1,5 horas. Enseguida la membrana fue bloqueada con solución PBS-leche descremada 5 % por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente incubada con anticuerpo anti-SIINFEKL, dilución 1/200 preparado en PBS-leche descremada 5 %, por 12 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 0,1%, luego fue incubada con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a HRP en PBS-leche descremada 1 %, dilución 1/5000, por 2 horas a temperatura ambiente y agitación. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 0,1 %, se agregó solución de revelado Pierce west y se reveló en fotodocumentador.

4.8 Obtención de células dendríticas desde precursores de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO

Las DCs usadas en esta tesis fueron diferenciadas a partir de células progenitoras de médula ósea de ratón. Para ello se removieron, en condiciones estériles, tibias y fémures de ratones C57BL/6 (Para obtención de DCs con CD1d murino), hCD1d-KI (Para obtención de DCs con CD1d humano) y hCD1d-KO (Para obtención de DCs carentes de CD1d). Los huesos fueron

cortados en sus extremos y perfundidos con medio RPMI suplementado para extraer la médula ósea de su interior, la que posteriormente fue homogeneizada en medio RPMI suplementado con jeringa de tuberculina. Este homogeneizado fue filtrado y trasvasiado a un tubo de 50 mL para obtener el pellet celular por centrifugación a 1800 rpm por 5min. El sobrenadante se descartó y el *pellet* fue resuspendido con 5 mL de solución de lisis ACK durante 2 minutos para lisar los glóbulos rojos presentes. Posteriormente, las células progenitoras de médula ósea de ratón se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* de células se lavó con PBS-FBS 1 %. Finalmente, las células fueron resuspendidas en medio fresco RPMI suplementado con FBS 10 %, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, glutamina, Hepes, Piruvato, β -mercaptoetanol y GM-CSF (50 U/ml). Se cultivaron 3×10^6 células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos, y se incubaron en una estufa de cultivo celular a 37°C con atmósfera 5 % CO₂ y 100 % humedad. A los 2, 4 y 6 días se cambió el medio de cultivo por medio fresco suplementado con FBS 10 %, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, glutamina, Hepes, Piruvato, β -mercaptoetanol y GM-CSF (50 U/ml)

4.9 Obtención de esplenocitos de ratones OT-I

La obtención de esplenocitos de ratones OT-I se realizó mediante el procesamiento de los bazoos luego de la eutanasia de ratones OT-I. Los bazoos fueron homogeneizados con los extremos esmerilados de dos portaobjetos en 5 mL de medio RPMI. El contenido de este homogeneizado fue filtrado por *cells strainer* y traspasado a un tubo de 50 mL, para centrifugarse a 1800 rpm por 5 min. Luego se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 5 ml de solución de lisis de glóbulos rojos ACK. Esta mezcla fue incubada por 2 min y luego centrifugada a 1800 rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en PBS 1X, para el conteo de células en cámara de Neubauer. Se ajustó concentración celular a 1.000.000 esplenocitos/mL en medio RPMI suplementado con FBS 10 %, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, glutamina, Hepes, Piruvato, β -mercaptoetanol.

4.10 Infección de DCs con bacterias

Se sembraron 100.000 DCs de 5 días de cultivo resuspendidas en medio RPMI suplementado con FBS 10 %, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, glutamina, Hepes, Piruvato, β -mercaptoetanol, sin antibióticos, en placas de cultivo de 96 pocillos fondo redondo y fueron infectadas con bacterias de las cepas ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 a índices de multiplicidad de infección (MOI) 0,1, 1, 10 y 100. Las bacterias fueron crecidas en medio LB (ST) o LB con ampicilina 100 μ g/mL (ST-OVA) hasta que alcanzaron una $OD_{600nm} = 0,6$, y luego fueron usadas para infectar las DCs. El conteo de las DCs se realizó usando una cámara de Neubauer, y el conteo bacteriano se realizó mediante espectrofotometría, midiendo la OD_{600nm} , usando la relación: $OD_{600nm} = 1$ corresponde a 1×10^9 bacterias/mL. Las DCs se dejaron pulsando por 2 horas en una estufa de cultivo celular a 37 °C con atmósfera 5% CO_2 y 100 % humedad. Como controles DCs se incubaron con 100 μ g/mL de proteína OVA, 50 μ g/mL de péptido SIINFEKL y 100 nM de glicolípidos (α GC y AH10-7). Posteriormente, las DCs se lavaron una vez con medio RPMI suplementado sin antibióticos y luego se agregó medio de cultivo fresco con 50 μ g/mL de gentamicina, incubándose en una estufa de cultivo celular a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las DCs se lavaron una vez con medio RPMI fresco y nuevamente se agregó medio RPMI suplementado sin antibióticos.

4.11 Co-cultivo de DCs infectadas con linfocitos T (K2C10 o esplenocitos OT-I)

Luego de la infección, las 100.000 DCs (infectadas) se co-cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos fondo redondo con 100.000 hibridomas K2C10 o con 100.000 esplenocitos derivados de ratones OT-I durante 24 horas en estufa de cultivo celular a 37°C con 5% CO_2 y 100% humedad. Transcurrido este tiempo, la placa fue centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos, y se determinó la presencia de IL-2 en el sobrenadante de los co-cultivos mediante ELISA de tipo Sándwich.

4.12 Medición de IL-2 mediante ELISA de tipo Sándwich

La cuantificación de la citoquina IL-2 en los sobrenadantes de los co-cultivos descritos en el punto anterior se realizó mediante ELISA de tipo sándwich. Para esto, placas de ELISA de 96 pocillos fueron activadas con 100 μ L/pocillo de anticuerpo monoclonal de captura anti IL-2 (Purified Rat Anti-mouse IL-2, Cat 554424, BD Biosciences) dilución 1/750 en PBS-BSA 1 %, por 12 horas a 4 °C. Luego los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1 % por 2 horas a temperatura ambiente. Después fueron lavados cuatro veces con 200 μ l de PBS-Tween 20 0,05 %. Posteriormente, se agregó 100 μ l del sobrenadante de co-cultivo a cada pocillo y se incubó la placa por 12 horas a 4 °C. Luego, los pocillos fueron lavados cuatro veces con 200 μ L de PBS-Tween 20 0,05 %. Enseguida se agregó 100 μ L/pocillo de anticuerpo monoclonal de detección anti IL-2 conjugado a biotina (Biotin Rat anti-mouse IL-2, Cat 554426, BD Biosciences), dilución 1/1500 en PBS-BSA 1 %, por 1 hora con 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los pocillos fueron nuevamente lavados cuatro veces con 200 μ L de PBS-Tween 20 0,05%. Después del lavado, se agregó 100 μ L/pocillo de estreptavidina-HRP (Streptavidin HRP, Cat 554066, BD Biosciences) dilución 1/1500 en PBS-BSA 1 %, por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó cada pocillo de la placa cuatro veces con 200 μ L de PBS-Tween 20 0,05 %. Finalmente se agregó el sustrato TMB (Tetrametilbenzidina) para la enzima HRP, para revelar. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 1 minuto y se detuvo con 50 μ L H₂SO₄ 2 N. El resultado colorimétrico fue leído en un lector para placas de ELISA a absorbancias de 450 nm y 540 nm.

4.13 Expansión de células iNKT *in vivo* en ratones C57BL/6 y hCD1d-KI

La Figura 6, muestra la planificación temporal en horas de los ensayos *in vivo* para analizar la expansión de células iNKT generada por la administración de α GC soluble y las cepas ST-OVA-GL en ratones C57BL/6 o hCD1d-KI (2 ratones por grupo). La expansión de células iNKT de los ratones hCD1d-KI inmunizados con α GC soluble será analizada a las 24, 48 y 72 horas post-inmunización por citometría de flujo multiparamétrica, mientras que la expansión de células iNKT en los ratones C57BL/6 inmunizados con las cepas ST-OVA-GL será analizada por citometría de flujo multiparamétrica a las 72 horas post-inmunización.

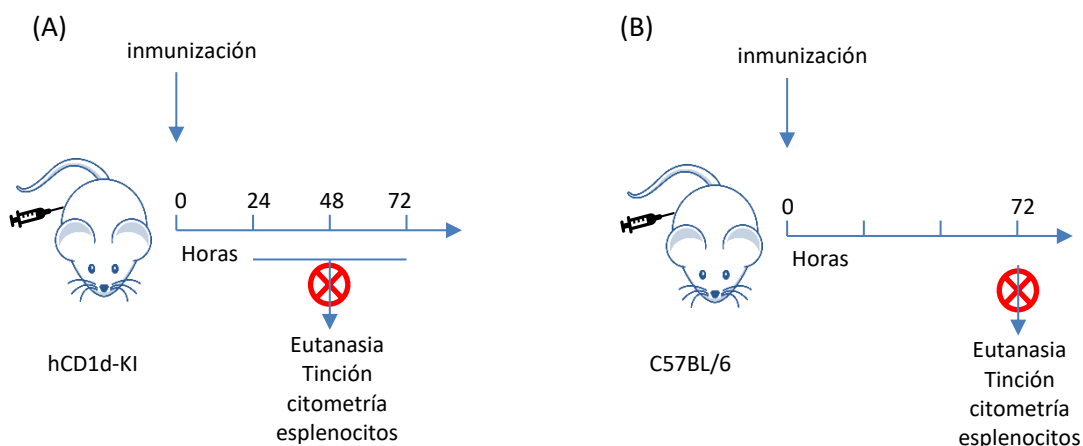


Figura 6. Planificación experimento *in vivo* para análisis de la expansión de células iNKT. En (A) el esquema muestra la planificación temporal del experimento *in vivo* para analizar la expansión de células iNKT por α GC soluble en ratones hCD1d-KI (2 ratones por grupo). En (B) el esquema muestra la planificación temporal del experimento *in vivo* para analizar la expansión de células iNKT por ST-OVA-GL en ratones y C57BL/6 (2 ratones por grupo).

4.13.1 α GC para uso *in vivo*

La preparación del glicolípido α GC para uso *in vivo* se utilizó como control positivo de la expansión de células iNKT y se realizó diluyendo el glicolípido a 200 μ M en PBS 1X y 0,5% Tween20. La dosis de α GC inyectada a los ratones fue de 200 μ L a 20 μ M preparada en PBS 1X, es decir 4 nmoles de α GC activo, 0,1% DMSO y 0,05% Tween20, siendo administrada de forma intraperitoneal (2 ratones por condición).

4.13.2 Preparación de cepas ST para uso *in vivo*

Las cepas bacterianas ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 se utilizaron para estudiar la expansión de células iNKT *in vivo*. Para ello se prepararon dosis de 1×10^5 UFC en 200 μ L de PBS 1X para ser inoculadas intraperitonealmente a ratones C57BL/6 hCD1d-KI (2 ratones por condición).

4.13.3 Extracción y procesamiento de bazo

La expansión de células iNKT fue confirmada mediante citometría de flujo. Para esto se extrajo el bazo de los ratones inoculados con α GC y las cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) transcurridas 24, 48 y 72 horas desde su inmunización. Los bazos fueron homogeneizados con los extremos esmerilados de dos portaobjetos en 5 mL de medio RPMI. El contenido de este homogeneizado fue filtrado por *cells strainer* y traspasado a un tubo de 50 mL, para ser centrifugado a 1800 rpm por 5 min. Luego se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 5 mL de solución de lisis de glóbulos rojos ACK. Esta mezcla fue incubada por 2 min y luego centrifugada a 1800 rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en PBS 1X, para el conteo de células en cámara de Neubauer. Se ajustó concentración celular a 5.000.000 esplenocitos/mL en PBS 1X.

4.13.4 Tinción de marcadores de superficie

En placas de 96 pocillos fondo diamante fueron sembrados 500.000 esplenocitos/pocillo en triplicado por condición, los cuales fueron tratadas con sonda de viabilidad Live/Dead (Aqua fluorescent reactive dye, Invitrogen) concentración 1/600 durante 30 min a 4°C y oscuridad. Luego fueron lavadas con PBS 1X e incubadas con Fc Block (Fc γ receptor Blocking antibody, supernatant from clone 2.4G2) durante 5 min seguido de la tinción con los anticuerpos tetrámeros α GC-hCD1d-APC, anti-mouse NK1.1-PE, anti-mouse TCR β -FITC, anti-mouse B220-PerCP concentración 1/400 durante 2 horas a 4°C y oscuridad. Finalmente, la tinción se fijó con PFA 2% y las muestras se analizaron por citometría de flujo.

4.14 Experimento *in vivo* para análisis de la respuesta antígeno-específica de células B y T

La Figura 7, muestra la planificación temporal en días del ensayo *in vivo* para estudiar la respuesta T y B antígeno-específica luego de la inmunización de ratones C57BL/6 (4 ratones por grupo). Para el experimento se analizaron 9 grupos los que corresponden a ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC, ST-OVA-AH10-7, OVA, OVA- α GC, OVA-CFA y PBS. La respuesta B se analizará a partir de los sueros obtenidos a los días 14 y 21 post-inmunización, por determinación de IgG anti-OVA e IgG anti-ST. La respuesta T antígeno-específica se analizará al día 22 post-inmunización por citometría de flujo multiparamétrica luego de la tinción de marcadores extracelulares y citoquinas intracelulares de los esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados.

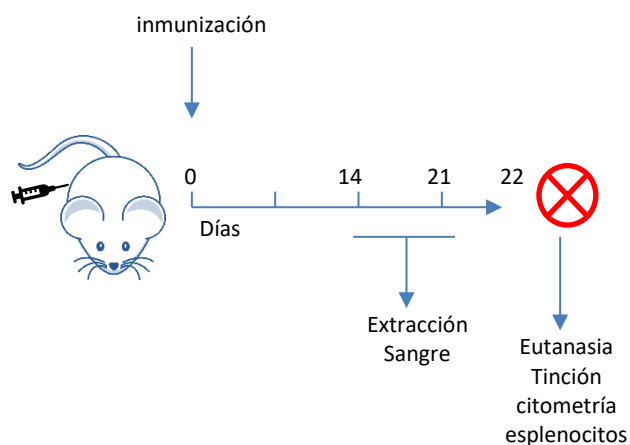


Figura 7. Planificación experimento *in vivo* para análisis de la respuesta antígeno-específica de células T y B. En el esquema se muestra la planificación temporal del experimento *in vivo* para analizar la respuesta inmune de células T y B antígeno-específica contra OVA y ST en ratones C57BL/6 (4 ratones por grupo). La inmunización de los ratones para ambos ensayos *in vivo* se realizará de forma intraperitoneal.

4.14.1.1 Preparación de cepas ST, glicolípidos y ovoalbúmina para uso *in vivo* para estudiar respuesta antígeno-específica.

Las cepas bacterianas ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 fueron utilizadas para estudiar la respuesta de células T CD8 y T CD4 antígeno específicas para OVA y ST *in vivo*. Para ello se prepararon dosis de 1×10^5 UFC en 200 μ L de PBS 1X las que fueron inoculadas intraperitonealmente a ratones C57BL/6 (4 ratones por grupo).

Como controles del ensayo se incluyeron grupos inmunizados con 50 μg ovoalbúmina (grupo OVA), 200 μM αGC + 50 μg OVA (grupo αGC -OVA), como control positivo se inmunizó con 50 μg OVA en 100 de μL PBS1X + 100 μL de adyuvante completo de Freund's (CFA) (grupo OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS 1X (grupo PBS). De cada una de las preparaciones se inocularon 200 μL por ratón. Todas las inmunizaciones se realizaron de forma intraperitoneal y se utilizaron 4 ratones por grupo.

4.14.1.2 Re-estimulación de linfocitos T CD4 y T CD8 específicos para OVA y ST.

Se sembraron 1.000.000 esplenocitos/pocillo en placas de 96 pocillos fondo redondo, los que fueron re-estimulados con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lisado de ST o 10 nM de SIINFEKL más 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-mouse CD28 preparado en medio RPMI suplementado. Se reservaron algunas células sin estimular como control negativo. Las células re-estimuladas que se utilizaron como control positivo, además se estimularon con anti-mouse CD3e a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y anti-mouse CD28 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células se dejaron incubando durante 2 horas a 37°C y 5% CO_2 . Transcurrido el tiempo, a cada pocillo se agregaron Brefeldina A 1X y Monensina 1X y se incubó durante 6 horas a 37°C y 5% CO_2 . Finalmente, las placas se guardaron a 4°C hasta la realización de la tinción de marcadores de superficie.

4.14.1.3 Tinción de marcadores de superficie, viabilidad y fijación

Las células re-estimuladas se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron con 50 μL sonda de viabilidad Live/Dead (Aqua fluorescent reactive dye, Invitrogen) 1/500 durante 30 min en hielo y oscuridad. Las células se lavaron con buffer FACS y luego se resuspendieron con 50 μL de Fc Block (Fc γ receptor Blocking antibody, supernatant from clone 2.4G2) durante 5 min en hielo y oscuridad. Transcurrido el tiempo se agregaron los anticuerpos para teñir los marcadores de superficie para células T CD8, anti-mouse TCR β -PerCP, anti-mouse CD8-PE, anti-mouse CD44-PECF594, anti-mouse CD62L-APC y anti-mouse LAMP-1-alexa488 y para células T CD4 anti-mouse TCR β -FITC y anti-mouse CD4-Cychrome. Las células se incubaron durante 2 horas a 4°C y protegidas de la luz, pasado el tiempo se lavaron con buffer FACS y se fijaron con 100 μL de PFA 4%. Luego de 10 min las células se lavaron con buffer FACS y se dejaron en 100 μL de este.

4.14.1.4 Permeabilización y tinción intracelular de citoquinas

Las células se permeabilizaron con 50 μ L de buffer eBiosciences Foxp3 Fixation/Permeabilization y se incubaron durante 30 min en hielo y protegidas de la luz, transcurrido este tiempo se lavaron con buffer de permeabilización 1X y se bloquearon con 50 μ L de suero normal de ratón al 5% preparado en buffer de permeabilización durante 15 minutos en hielo y protegidas de la luz. Luego se agregaron los anticuerpos para tinción de citoquinas intracelulares para células T CD8 anti-mouse IFN γ -alex700 y para células T CD4 anti-mouse IL-2-APC-Cy7, anti-mouse IL-4-BV421, anti-mouse IL-17a-PE, anti-mouse TNF- α -alex647 y anti-mouse IFN γ -alex700. Las células se incubaron durante 2 horas a 4°C y protegidas de la luz, pasado el tiempo se lavaron 2 veces con *buffer* de permeabilización 1 vez con *buffer* FACS y se dejaron en un volumen final de 300 μ L con *buffer* FACS.

4.14.2.1 Obtención de suero de ratones C57BL/6 infectados con ST

Las muestras de sangre de ratones C57BL/6 inmunizados, fueron obtenidas de forma retro-orbital a los días 14 y 21 post-inmunización. La extracción de sangre se realizó con pipeta Pasteur obteniéndose alrededor de 300-500 μ L, esta se colectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez formado el coágulo, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm para obtener los sueros. Estos se almacenaron a -20°C en tubos Eppendorf de 0,6 mL hasta su utilización.

4.14.2.2 Medición de IgG total anti-OVA mediante ELISA

La cuantificación de IgG de los sueros descritos en el punto anterior se realizó mediante ELISA. Para esto, placas de ELISA fueron activadas con 100 μ L de ovoalbúmina 10 μ g/mL por pocillo durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1 % por 2 horas a temperatura ambiente. Después fueron lavados cuatro veces con 200 μ L de PBS-Tween20 0,05 %. Posteriormente, se agregaron los sueros realizando diluciones seriadas comenzando en 1/50 hasta 1/1.024.000. Las placas se incubaron por 12 horas a 4 °C. Luego los pocillos fueron lavados cuatro veces con 200 μ L de PBS-Tween20 0,05 %.

Enseguida se agregó 100 µL/pocillo de anticuerpo conjugado a HRP 1/5000 en PBS-BSA 1 %, por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente los pocillos fueron lavados cuatro veces con 200 µL de PBS-Tween20 0,05%. Finalmente, para revelar, se agregó 100 µL del sustrato TMB (Tetrametilbenzidina) para la enzima HRP. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 2,5 minutos y se detuvo con 50 µL H₂SO₄ 0,2 M. El resultado colorimétrico fue leído en un lector para placas de ELISA a absorbancias de 450 nm y 540 nm.

4.14.2.3 Medición de IgG total anti-ST mediante ELISA

Placas de ELISA de 96 pocillos fueron activadas con 100 µL de lisado de ST 10 µg/mL por pocillo durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1 % por 2 horas a temperatura ambiente. Después fueron lavados cuatro veces con 200 µL de PBS-Tween 20 0,05 %. Posteriormente se agregaron los sueros realizando diluciones seriadas comenzando en 1/50 y se incubaron por 12 horas a 4 °C. Luego los pocillos fueron lavados cuatro veces con 200 µL de PBS-Tween20 0.05 %. Enseguida se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo anti-IgG total conjugado a HRP 1/20000 preparado en PBS-BSA 1 % y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Transcurrida la incubación los pocillos fueron lavados cuatro veces con 200 µL de PBS-Tween 20 0,05%. Finalmente se agregaron 100 µL del sustrato TMB (Tetrametilbenzidina) para la enzima HRP, para revelar el ensayo. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 2,5 minutos y se detuvo con 50 µL H₂SO₄ 0,2 M. El resultado del ensayo colorimétrico fue leído en lector de placas de ELISA a 450 nm y 540 nm de longitud de onda.

4.15 Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 7 para Windows Software (Graph Pad Software, Inc.). Se realizó un análisis ANOVA de una vía, empleando el test de Dunnett para comparar los grupos ST-OVA, ST-OVA-αGC y STova-AH10-7 contra el grupo control ST o ST-OVA según el ensayo. Para analizar los datos de los experimentos realizados por citometría de flujo se utilizó el programa FlowJo v10 (FlowJo, LLC) para Windows software.

V. RESULTADOS

5.1 Objetivo específico 1. Generar cepas de *Salmonella Typhimurium* con glicolípidos incorporados en la membrana celular (ST-OVA-GL), de modo de optimizar la entrega de estos para la activación eficiente de células iNKT.

5.1.1 Curva de crecimiento de ST y ST-OVA

Con el fin de estudiar la velocidad de crecimientos de las cepas bacterianas de ST que fueron utilizadas en la incorporación de ligandos glicolipídicos activadores de células iNKT, se realizaron estudios de cinética de crecimiento en medio LB a 37°C y agitación constante. Los datos presentados en la Figura 8 no muestran diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de ambas cepas. Ambas crecen de forma similar bajo las mismas condiciones de cultivo.

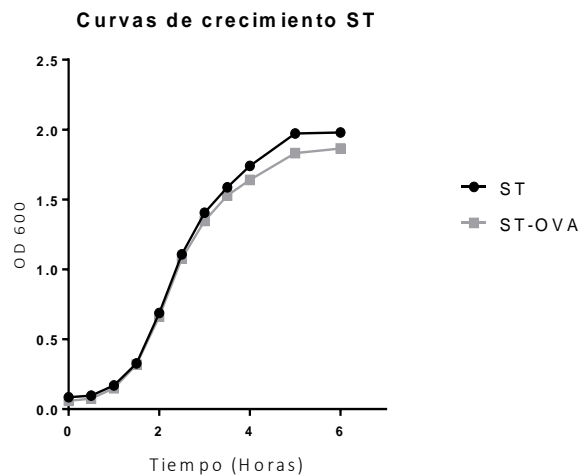


Figura 8. Curvas de crecimiento *Salmonella Typhimurium*. En la imagen se muestran las curvas de crecimiento correspondientes a ST (negro) y ST-OVA (gris) que se realizaron a partir de inóculos 1/100 en medio LB y crecidas a 37°C con agitación. El crecimiento bacteriano se determinó por absorbancia a OD₆₀₀ en intervalos de 30 minutos.

Conocer la cinética de crecimiento de ambas cepas nos permitió determinar el tiempo estimado de cultivo para llegar a fase exponencial (OD₆₀₀: 0,6-0,7), etapa que marca el punto final de la incorporación de ligandos glicolipídicos en la superficie celular de ST.

5.1.2 Incorporación de ligandos glicolipídicos de células iNKT a ST-OVA

Una vez determinada la cinética de crecimiento de ambas cepas de ST se procedió a realizar la incorporación de los glicolípidos α GC y AH10-7 a la cepa ST-OVA.

La incorporación de cada glicolípidos se realizó por separado y se obtuvieron 2 cepas de ST-OVA-GL: ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 las cuales se almacenaron en glicerol-LB 37 % a OD₆₀₀: 0,8.

5.1.3 Obtención de células dendríticas desde precursores de medula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO

Debido a que en esta tesis se estudió la activación de células iNKT *in vitro*, fue necesario realizar la presentación de ligandos activadores de células iNKT por medio de células presentadoras de antígenos profesionales (APC) como células dendríticas (DCs). Estas se obtuvieron desde precursores de medula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO. Para lograr la diferenciación de los precursores a DCs, estos se cultivaron en presencia de la citoquina GM-CSF, la que permitió su diferenciación.

Para evaluar el estado de diferenciación y maduración de las DCs presentes en los cultivos, se determinó la expresión de marcadores típicos de DCs como CD11c y MHC-II, así como el marcador de superficie CD86.

Para realizar los estudios de infección de células dendríticas se utilizaron células de 5 o 7 días de cultivo. El estado de maduración de las células dendríticas influye en el procesamiento de los antígenos a presentar, por este motivo para realizar la presentación de antígenos de naturaleza proteica como la proteína ovoalbúmina y el péptido SIINFEKL se utilizaron células dendríticas con un grado menor de maduración con sólo 5 días de cultivo (Figura 9).

La Figura 9 muestra los paneles correspondientes a las células dendríticas de 5 días de cultivo derivadas de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO para los marcadores MHC-II-FITC y CD11c-PE-Cy7. En el cuadrante superior derecho de cada panel se indica el porcentaje de

células dobles positivas para los marcadores mencionados, los que muestran frecuencias entre 24,8 y 26,2%.

Para realizar la presentación de ligandos glicolipídicos en este caso α GC y AH10-7 se utilizaron células dendríticas de 7 días de cultivo. La Figura 10 muestra los paneles correspondientes a las células dendríticas de 7 días de cultivo derivadas de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO para los marcadores MHC-II-FITC y CD11c-PE-Cy7. En el cuadrante superior derecho de cada panel se indica el porcentaje de células dobles positivas para los marcadores mencionados, los que muestran frecuencias entre 49,5 y 53,4%.

Al comparar los resultados en cuanto a la frecuencia de las células dobles positivas para los marcadores MHC-II-FITC y CD11c-PE-Cy7 de las DCs de 5 días de cultivo (Figura 9) con las DCs de 7 días de cultivo (Figura 10), se puede observar un mayor grado de expresión de los marcadores y poblaciones más definidas en las DCs de 7 días de cultivo.

Sin embargo, al comparar la expresión de los marcadores en las DCs con el mismo tiempo de cultivo 5 (Figura 9) o 7 (Figura 10) días, pero con distinto linaje (C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO) no se observan diferencias en el grado de expresión de los marcadores analizados.

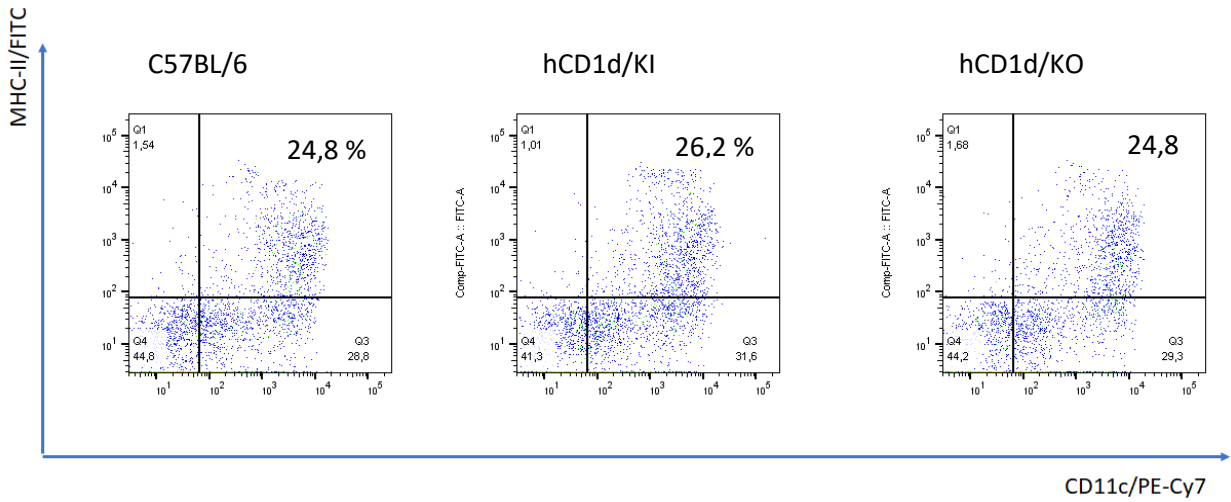


Figura 10. Citometría de flujo de células dendríticas de 5 días de cultivo. En la imagen se muestran los paneles correspondientes a las citometrías de flujo de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO cultivadas con GM-CSF y teñidas con los anticuerpos MHC-II-FITC y CD11c-PE-Cy7. En la esquina superior derecha se indica el porcentaje de las poblaciones dobles positivas.

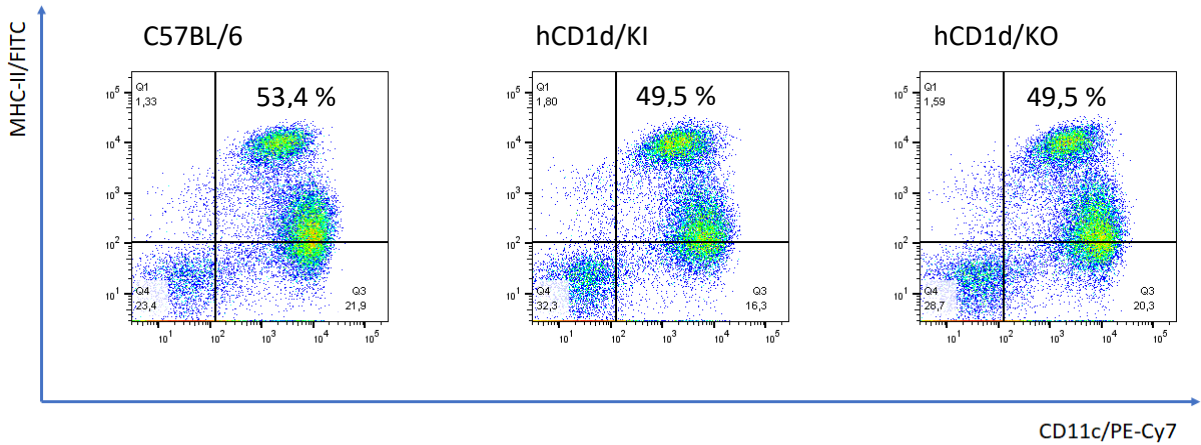


Figura 9. Citometría de flujo de células dendríticas de 7 días de cultivo. En la imagen se muestran los paneles correspondientes a las citometrías de flujo de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO cultivadas con GM-CSF y teñidas con los anticuerpos MHC-II-FITC y CD11c-PE-Cy7. En la esquina superior derecha se indica el porcentaje de las poblaciones dobles positivas.

Al analizar los niveles de expresión de la proteína de maduración CD86 en las células dendríticas de 5 (Figura 11) o 7 (Figura 12) días de cultivo se observa una clara diferencia en el nivel de maduración entre estas, mientras que los tres tipos de células dendríticas de 5 días de cultivo (Figura 11) se observa un nivel de expresión cercano al 20%, en las células dendríticas de 7 días de cultivo (Figura 12) este aumenta a frecuencias de 38-52%.

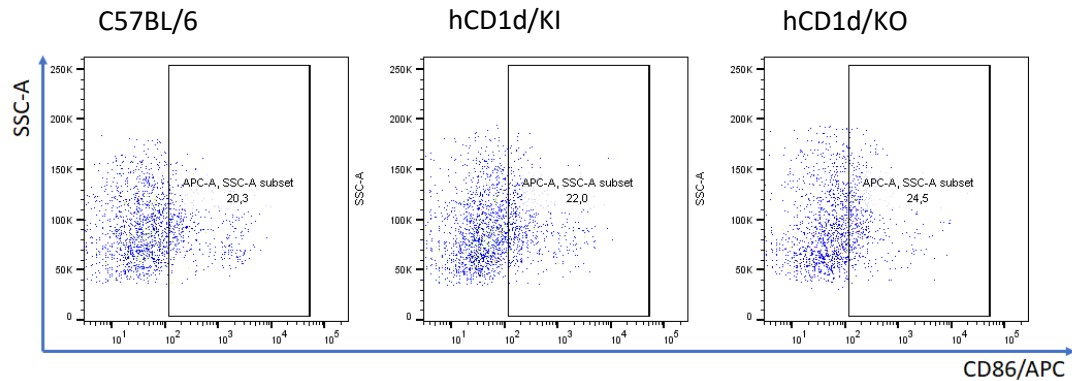


Figura 11. Expresión de CD86 en células dendríticas de 5 días de cultivo. En la imagen se muestran los paneles correspondientes a las citometrías de flujo de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO cultivadas con GM-CSF durante 5 días y teñidas con CD86-APC para estudiar su estado de maduración.

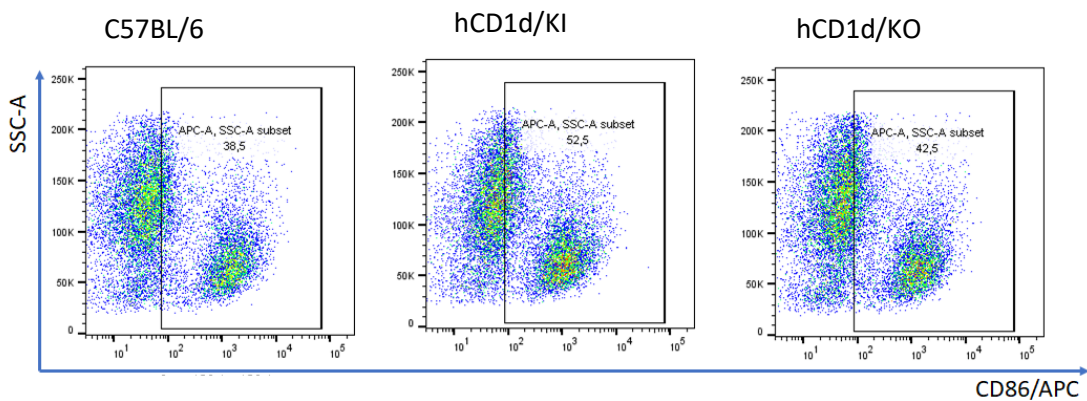


Figura 12. Expresión de CD86 en células dendríticas de 7 días de cultivo. En la imagen se muestran los paneles correspondientes a las citometrías de flujo de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO cultivadas con GM-CSF durante 7 días y teñidas con CD86-APC para estudiar su estado de maduración.

5.1.4 Fenotipo de los hibridomas de célula iNKT hCD1d-KI (K2C10)

Para realizar los ensayos de co-cultivos de DCs pulsadas con las cepas de ST descritas anteriormente, se utilizaron los hibridomas de células iNKT K2C10. Estos tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de IL-2 luego de su activación mediada por TCR. Antes de utilizar las hibridomas para los ensayos de co-cultivo se analizó su morfología, viabilidad y expresión de TCR por citometría de flujo con tinciones (TCR β -FITC y tetrámeros α GC-CD1d-APC).

Conocer los niveles de expresión del TCR de las hibridomas nos permitirá saber si las células se encuentran en condiciones óptimas para realizar los ensayos *in vitro* de activación. Luego de la presentación de los glicolípidos cargados en la molécula CD1d de las células dendríticas se produce el reconocimiento de los glicolípidos por el TCR de los hibridomas desencadenando la activación de este con la inmediata secreción de IL-2 al sobrenadante.

En la Figura 13, se puede observar la morfología de K2C10 en cuanto a tamaño y granulosidad, mostrándose una distribución típica de células de tipo linfocitario (Figura 13A), en el segundo panel (Figura 13B) se observa la eliminación de dupletes, el tercer panel (Figura 13C) muestra la viabilidad celular la que alcanza un 96,1% y finalmente en el cuarto panel (Figura 13D) se encuentran las células con marcaje doble positivo para TCR β -FITC y tetrámeros α GC-CD1d-APC alcanzando una población del 73,3%

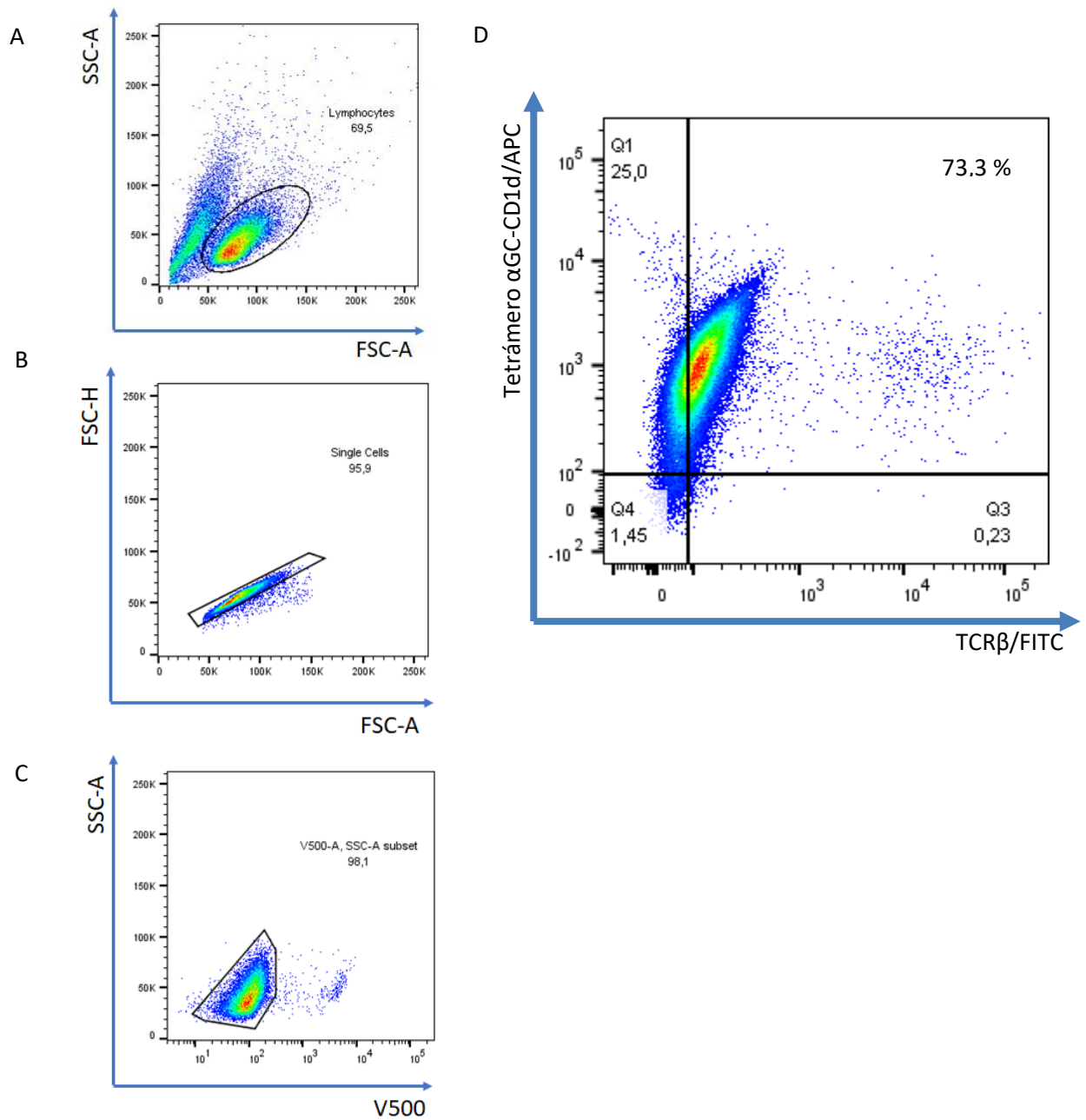


Figura 13. Citometría de flujo de los hibridomas K2C10. Estudio fenotípico de los hibridomas de células iNKT K2C10 por la técnica de citometría de flujo. En (A) selección de la población según su tamaño (SSC-A) y complejidad (FSC-A). En (B) eliminación de dupletes. En (C) selección de la población de células vivas. En (D) caracterización de la población de K2C10 para tetrámero- α GC-CD1d -APC v TCR β -FITC.

5.1.5 Activación de los hibridomas de célula iNKT hCD1d-KI (K2C10) por presentación antigénica de células dendríticas derivadas de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO infectadas con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7.

Luego de la obtención de las cepas ST-OVA-GL para α GC y AH10-7, se evaluó si la incorporación de los ligandos glicolípidos en la membrana celular bacteriana permitía activar los hibridomas de células iNKT K2C10 de forma dosis dependiente, luego de un ensayo funcional realizando la infección de células dendríticas de 7 días de cultivo.

Para esto se pulsaron 100.000 células dendríticas de 7 días de cultivo con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 a diferentes índices de multiplicidad de infección (0,1, 1, 10, 100) de modo de obtener células dendríticas presentadoras del complejo CD1d-glicolípido para las células dendríticas infectadas con las bacterias con incorporación de glicolípidos en sus membranas. Luego de 2 horas de infección las células dendríticas se incubaron con 50 μ g/mL de gentamicina durante 1 hora para eliminar todas las bacterias del cultivo que no fueron fagocitadas. En seguida se realizó un lavado con medio RPMI suplementado al 10% FBS para eliminar la gentamicina del medio y se realizó el co-cultivo con 100.000 hidridomas K2C10. Transcurridas 24 horas del co-cultivo, se analizó la activación de los linfocitos analizando la liberación de IL-2 al medio por ELISA.

En la Figura 14, se muestran los resultados de la activación de K2C10, luego de la presentación antigénica de ligandos por DCs de distinto linaje. El gráfico para la activación de K2C10 por medio de la presentación de ligandos por DCs de ratones C57BL/6 (Figura 14A), muestra que para MOI 0, 0,1, 1 y 10 la secreción de IL-2 fue semejante para todos los grupos y solo en la MOI 100 la cepa ST-OVA-AH10-7 genero una mayor secreción de IL-2 en comparación con la cepa control ST-OVA. El gráfico de la Figura 14D muestra los controles del ensayo donde se observa que K2C10 es capaz de responder a la activación de α GC y AH10-7 soluble y que esta es mediada a través de TCR ya que al ser estimulado con anti-CD3, se observó liberación de IL-2. Además, se incluyeron como control del ensayo los sobrenadantes de cultivo celular de DCs y K2C10 para controlar que no tuviesen una liberación basal de IL-2 durante la realización del co-cultivo.

El gráfico para la activación de K2C10 por medio de la presentación de ligandos por DCs de ratones hCD1d-KI (Figura 14B), muestra que para todos los MOI la secreción de IL-2 fue semejante por todos los grupos. El gráfico de la Figura 14E muestra los controles del ensayo donde se observa que K2C10 es capaz de responder a la activación de α GC y AH10-7 soluble y que esta es mediada a través de TCR al ser estimulado con anti-CD3, sin embargo, la secreción de IL-2 fue mucho menor en comparación con los controles de la Figura 14D. También se incluyeron como control del ensayo sobrenadantes del cultivo de DCs y sobrenadantes de cultivo de los hibridomas K2C10 por separado las cuales no mostraron producción de IL-2 por sí solas.

El gráfico para la activación de K2C10 por medio de la presentación de ligandos por DCs de ratones hCD1d-KO (Figura 14C), muestra que para todos los MOI la secreción de IL-2 fue semejante por todos los grupos, lo cual era esperable ya que estas DCs no expresan la molécula CD1d para la presentación de glicolípidos. El gráfico de la Figura 14F muestra los controles del ensayo, donde se observa que K2C10 es capaz de responder a la activación de su TCR al ser estimulado con anti-CD3. Sin embargo, la secreción de IL-2 no se observó en los controles con glicolípidos solubles, lo que demuestra que la presentación de glicolípidos es mediada por la molécula CD1d para la activación de K2C10.

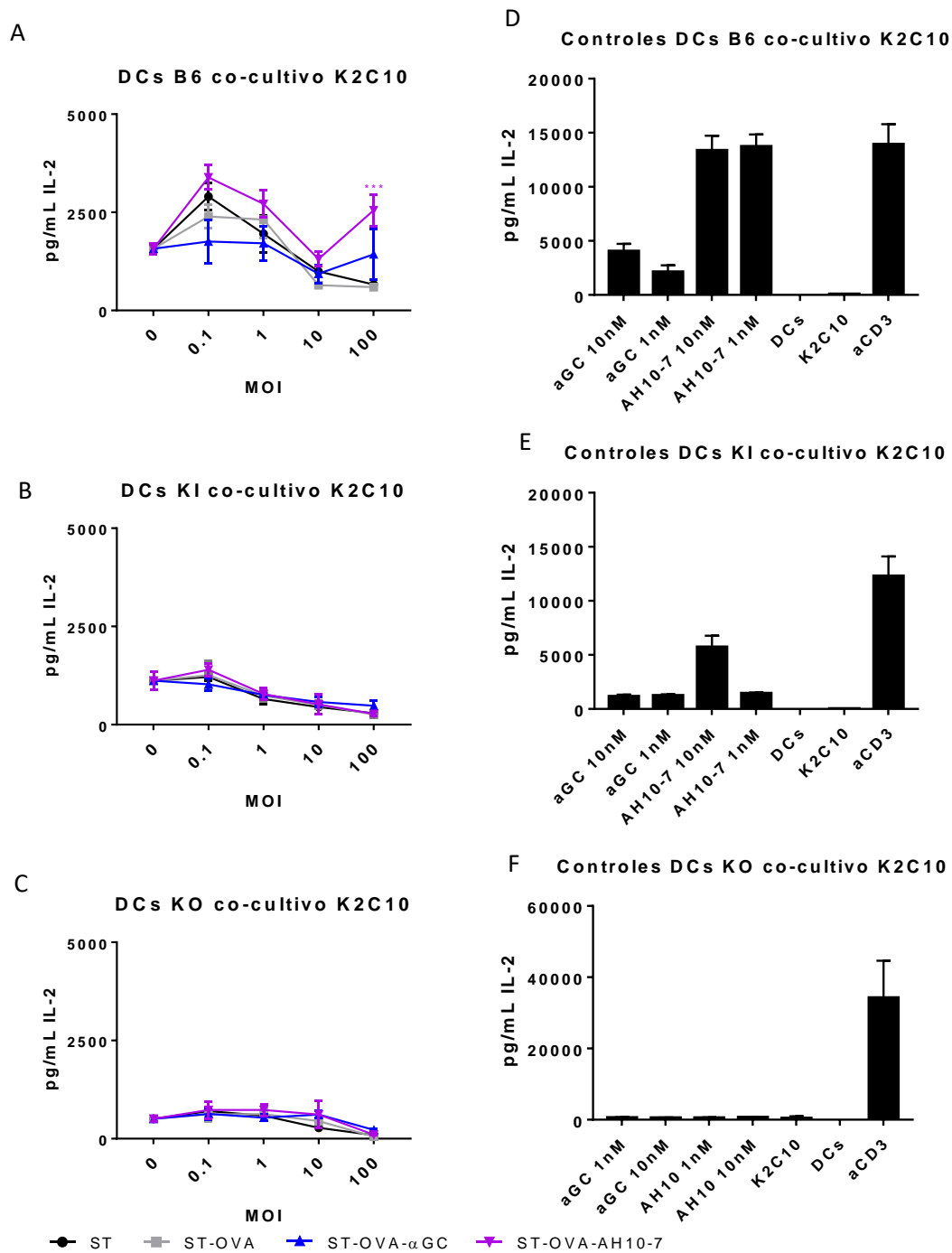


Figura 14. Ensayo de activación *in vitro* de los hibridomas K2C10. Se realizó la infección de 100.000 células dendríticas diferenciadas desde precusores de médula ósea de ratones C57BL-6, hCD1d-KI o hCD1d-KO a diferentes índices de multiplicidad de infección (MOI 0, 0,1, 1, 10, y 100) durante 2 horas en placas de 96 pocillos fondo redondo con medio RPMI, luego se incubaron durante una hora con gentamicina 50µg/mL, se realizó un lavado con medio RPMI y se procedió a co-cultivar las células dendríticas infectadas con 100.000 hibridomas K2C10. El co-cultivo se realizó durante 24 horas. Finalmente se tomó el sobrenadante de los co-cultivos y se cuantificó IL-2 por ELISA tipo sándwich. Los gráficos muestran la concentración en pg/mL de IL-2 para las curvas generadas por ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7. En (A) DCs de ratones C57BL-6, en (B) DCs de ratones hCD1d-KI, en (C) DCs de ratones hCD1d-KO. En (D) (E) (F) se muestran los controles para cada experimento. Para el análisis estadístico se comparó contra el grupo ST-OVA NS=no significativo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.0001.

5.1.6 Determinación de la expresión de ovoalbúmina de *Salmonella enterica* Serovar Thyphimurium 14028s Δ Spi-2:: kan/ pUC18-ova amp^r (ST-OVA) por western blot.

En el desarrollo del trabajo experimental se escogió como antígeno modelo para estudiar la respuesta antígeno-específica tanto de células B y células T la proteína ovoalbúmina. Por lo cual fue necesario determinar la expresión de OVA en la cepa *Salmonella enterica* Serovar Thyphimurium 14028s Δ Spi-2:: kan/ pUC18-ova amp^r (ST-OVA). También se consideró el análisis de la expresión de la proteína ovoalbúmina en las cepas de ST-OVA luego de la incorporación de los glicolípidos α GC y AH10-7 en la membrana externa.

En la Figura 15 se pueden observar a la izquierda el marcador de peso molecular (*Ladder*) con dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de 37 y 50 kD, a la derecha del *ladder* se observa una banda única y definida la que corresponde a la proteína ovoalbúmina del control positivo con un peso de 45kD. El carril con el símbolo (-) corresponde a un control negativo donde solo se cargó buffer de carga y se observa la ausencia de bandas. En el carril ST se observa la ausencia de la banda correspondiente a ovoalbúmina, mientras que para los carriles correspondiente a los grupos ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA- AH10-7 se observa la presencia de la banda para ovoalbúmina de 45kD, confirmando la presencia de esta en las cepas a las que se les realizó la incorporación de glicolípidos.

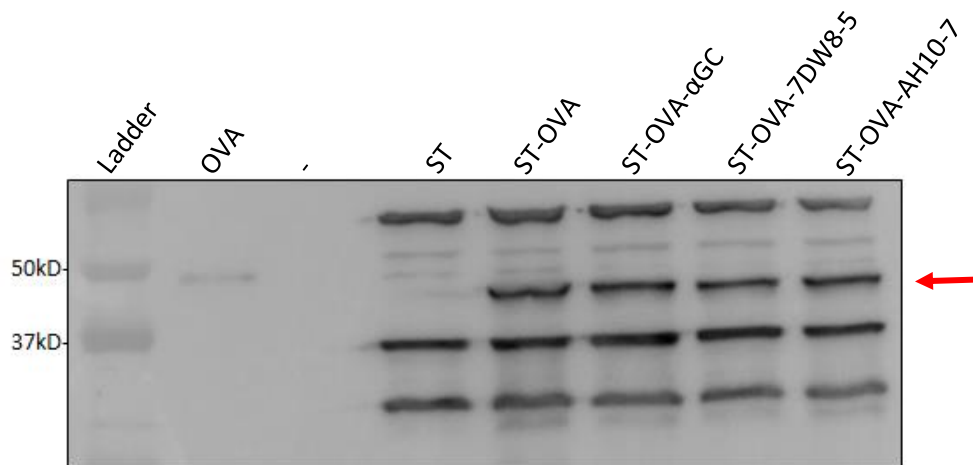


Figura 15. Caracterización de la expresión de OVA en ST. El análisis de western blot muestra la expresión de la proteína ovoalbúmina de las cepas ST-OVA, ST-OVA- α GC, ST-OVA-7DW8-5 y ST-OVA-AH10-7 luego de la incorporación de ligandos glicolípidicos a la membrana celular. Las muestras cargadas corresponden a 1×10^8 bacterias lisadas de ST-OVA, se incluye como control negativo la cepa sin expresión de ovoalbúmina ST, como control positivo la proteína purificada (OVA). Para realizar la detección de la proteína se ocupó el anticuerpo anti-SIINFEKL concentración 1:200.

5.1.7 Activación de linfocitos T CD8 de ratones OT- I por presentación antigénica de células dendríticas derivadas de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO infectadas con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7

Luego de la obtención de las cepas ST-OVA-GL para α GC y AH10-7, se evaluó si estas eran capaces de activar esplenocitos derivados de ratones OT-I. Para esto se pulsaron 100.000 células dendríticas de 5 días de cultivo provenientes de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 a diferentes índices de multiplicidad de infección (0,1, 1, 10 y 100). Luego de 2 horas de infección, las células se incubaron con 50 μ g/mL gentamicina para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas y finalmente se realizó el co-cultivo con 100.000 esplenocitos derivados de ratones OT-I, transcurridas 24 horas de cultivo, se analizó la activación de los esplenocitos por medición de IL-2 en el sobrenadante del cultivo por ELISA.

En la Figura 16, se muestran los resultados de la activación de esplenocitos derivados de ratones OT-I luego de la presentación antigénica de la proteína ovoalbúmina por DCs de distinto linaje. El gráfico para la activación de esplenocitos OT-I por medio de la presentación de péptidos por DCs de ratones C57BL/6 (Figura 16A), muestra que para MOI 0, 0,1, 1 y 10 la secreción de IL-2 fue similar por todos los grupos y sólo en la MOI 100 las cepas ST-OVA y ST-OVA- α GC generaron una mayor secreción de IL-2 en comparación con la cepa control ST. El gráfico de la Figura 16D muestra los controles del ensayo donde se observa que los esplenocitos OT-I son capaces de responder a la presentación del péptido SIINFEKL y a la proteína ovoalbúmina. Además, se incluyeron como control del ensayo los sobrenadantes de cultivo celular de DCs y esplenocitos OT-I para controlar que no tuviesen una liberación basal de IL-2 durante la realización del co-cultivo.

El gráfico para la activación de esplenocitos OT-I por medio de la presentación de péptidos por DCs de ratones hCD1d-KI (Figura 16B), muestra que para MOI 0, 0,1, 1 y 10 la secreción de IL-2 fue semejante por todos los grupos y sólo en la MOI 100 las cepas ST-OVA y ST-OVA- α GC generaron una mayor secreción de IL-2 en comparación con la cepa control ST. El gráfico de la Figura 16E muestra los controles del ensayo, donde se observa que los esplenocitos OT-

l son capaces de responder a la presentación del péptido SIINFEKL y a la proteína ovoalbúmina. El control con anti-CD3 muestra una baja secreción de IL-2, sin embargo, los esplenocitos fueron capaces de responder a la estimulación con ovoalbúmina y SIINFEKLL. Los controles para los cultivos de DCs y esplenocitos no mostraron producción de IL-2 por sí solas.

El gráfico para la activación de esplenocitos OT-I por medio de la presentación de péptidos por DCs de ratones hCD1d-KO (Figura 16C), muestra que para MOI 0, 0,1, 1, 10 y 100 la secreción de IL-2 fue similar por todos los grupos aunque en la MOI 100 las cepas ST-OVA y ST-OVA- α GC generaron una mayor secreción de IL-2 en comparación con la cepa control ST, esta no logro ser estadísticamente significativa. El gráfico de la Figura 16F muestra los controles del ensayo donde se observa que los esplenocitos OT-I son capaces de responder a la presentación del péptido SIINFEKL y a la proteína ovoalbúmina. Como control del ensayo los cultivos de DCs y esplenocitos no mostraron producción de IL-2 por sí solas. En este ensayo se esperaba que todas las DCs de distintos linajes fueran capaces de presentar los péptidos de derivados del procesamiento de la proteína ovoalbúmina ya que este se realiza vía MHC-I.

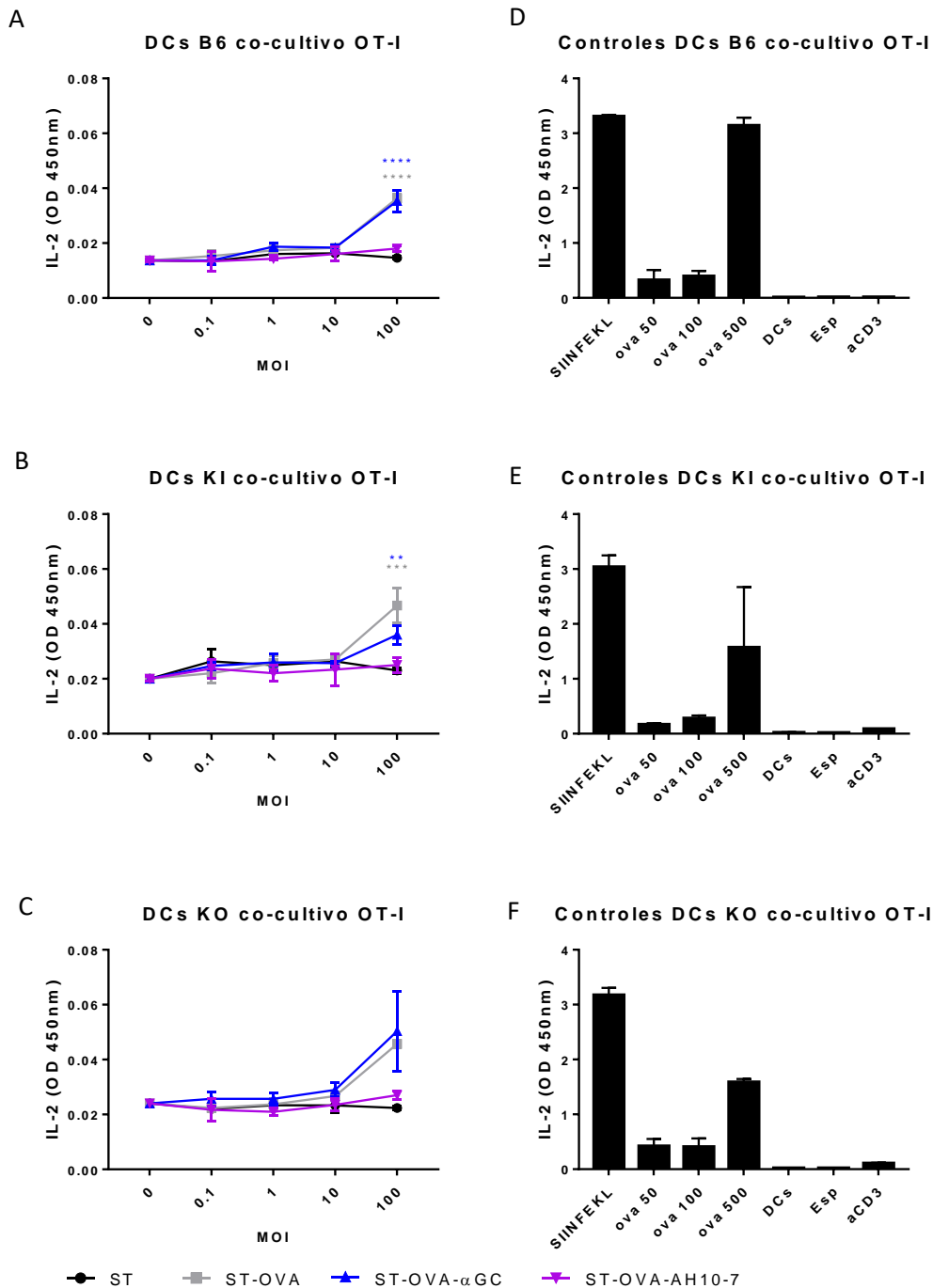


Figura 16. Ensayo de activación *in vitro* de esplenocitos derivados de ratones OT-I. Se realizó la infección de 100.000 células dendríticas diferenciadas desde precursores de médula ósea de ratones C57BL-6, hCD1d-KI o hCD1d-KO a diferentes índices de multiplicidad de infección (MOI 0, 0,1, 1, 10, y 100) durante 2 horas en placas de 96 pocillos fondo redondo con medio RPMI, luego se incubó durante una hora con gentamicina 50 μ g/mL, se realizó un lavado con medio RPMI y se procedió a co-cultivar las células dendríticas infectadas con 100.000 esplenocitos de ratón OT-I. El co-cultivo se realizó durante 24 horas. Finalmente se tomó el sobrenadante de los co-cultivos y se cuantificó IL-2 por ELISA tipo sándwich. Los gráficos muestran la absorbancia de IL-2 (OD 450nm) para las curvas generadas por ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7. En (A) DCs de ratones C57BL-6, en (B) DCs de ratones hCD1d-KI, en (C) DCs de ratones hCD1d-KO. En (D) (E) (F) se muestran los controles para cada experimento. Para el análisis estadístico se comparó contra el grupo ST, NS=no significativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

5.2 Objetivo específico 2. Determinar *in vivo* la expansión de células iNKT generada por las cepas ST-OVA-GL

5.2.1 Expansión de células iNKT *in vivo* por α GC soluble

Para estudiar la cinética de expansión de las células iNKT *in vivo*, se inocularon ratones hCD1d-KI con 200 μ L de α GC 20 μ M soluble para determinar el tiempo donde la expansión de células iNKT es máxima.

Se estudiaron tres tiempos distintos correspondientes a 24, 48 y 72 horas. Además, se incluyeron como control negativo un grupo sin inocular y un grupo inoculado con PBS. Cumplidas las horas determinadas para cada tratamiento, los ratones fueron eutanasiados, se extrajeron los bazo y se procesaron para la obtención de esplenocitos que se tiñeron con TCR β -FITC, B220-PerCP, NK1.1-PE y tetrámeros α GC-CD1d-APC para ser analizados por citometría de flujo.

En la Figura 17 se muestran paneles representativos de la distribución de células iNKTs luego de la selección de linfocitos, eliminación de dupletes, control de viabilidad y eliminación de células B, para seleccionar la población positiva para las tinciones con y tetrámero- α GC-CD1d-APC y TCR β -FITC. La elipse encierra la población correspondiente a células iNKT, las que se observan como positivas para la tinción tetrámero- α GC-CD1d-APC, las células restantes que no marcaron positivas corresponden a células T. Los resultados mostraron que a las 24 horas de administrar α GC soluble ocurre una disminución de la población de células iNKT en comparación con los controles *naive* y PBS, a las 48 horas las células vuelven a sus niveles basales, mientras que a las 72 horas se aprecia una expansión de la población alcanzando una frecuencia de un 5,35%

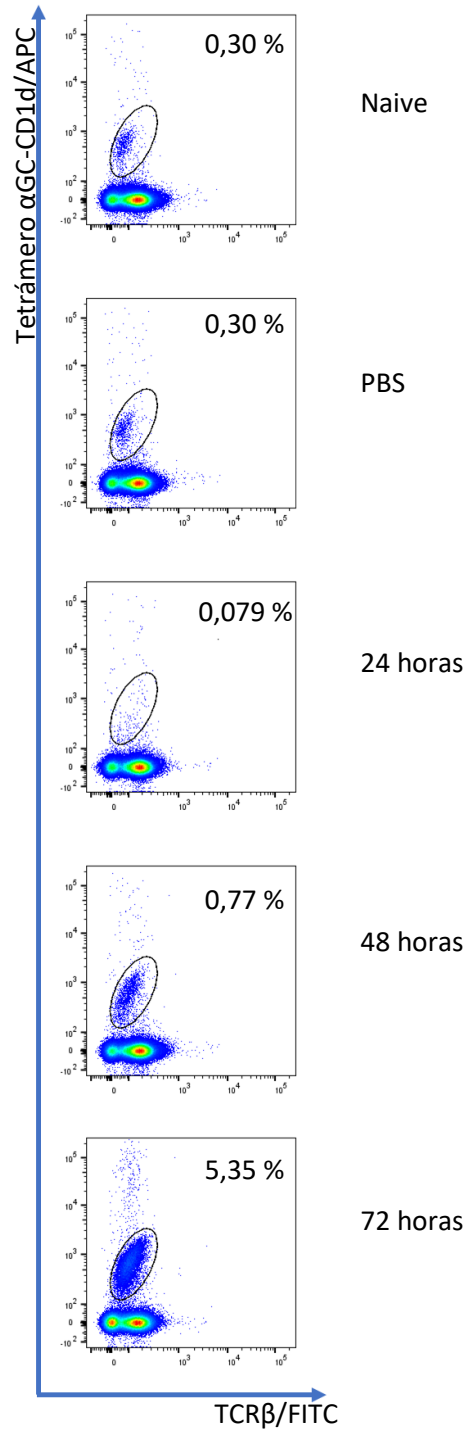


Figura 17. Expansión de células iNKT por administración de α GC soluble a ratones hCD1d-KI. Frecuencia de células iNKT teñidas con tetrámero- α GC-CD1d-APC y TCR β -FITC analizadas por citometría de flujo desde esplenocitos de ratones hCD1d-KI a las 24, 48 y 72 horas post-inmunización de 4 nmoles activos de α GC soluble (2 ratones por grupo). Como control se incluyó un grupo inmunizados con PBS y un grupo no tratado (*Naive*). Los dot plot son representativos y en la elipse se señala la población de células iNKT con sus respectivos porcentajes.

5.2.2 Expansión de células iNKT *in vivo* por α GC soluble y *Salmonella enterica* Serovar

Typhimurium 14028s Δ Spi-2:: kan/ pUC18-ova amp^r – α GC (ST-OVA- α GC)

Con la información obtenida en el resultado anterior se formuló un nuevo experimento *in vivo* para analizar si las incorporaciones de los glicolípidos a la membrana celular de las cepas ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 eran capaces de inducir la expansión de células iNKT. Como control positivo se administró α GC soluble y como control negativo se ocupó la cepa de ST-OVA sin incorporación de glicolípidos. Ratones C57BL/6 fueron inoculados con 1×10^5 UFC de ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7, transcurridas 72 horas se procedió eutanasiar a los ratones y extraer los bazos para la obtención de esplenocitos, los cuales fueron teñidos con TCR β -FITC, B220-PerCP, NK1.1-PE y tetrámeros α GC-CD1d-APC.

En la Figura 18 se encuentran los paneles representativos de la distribución de células iNKTs luego de la selección de linfocitos, eliminación de dupletes, control de viabilidad y eliminación de células B, para seleccionar la población positiva para la tinción con tetrámero- α GC-CD1d-APC y TCR β -FITC. La elipse encierra la población correspondiente a células iNKT, las que se observan como positivas para la tinción de tetrámero- α GC-CD1d-APC.

En la Figura 18 se puede observar que ninguna cepa de ST, fue capaz de producir la expansión de células iNKT, ya que las frecuencias de células positivas para la tinción con el tetrámero α GC-CD1d-APC, son similares al grupo control (*Naive*). Se puede observar que el control positivo de α GC soluble logro inducir la expansión de las células iNKT llegando a alcanzar una frecuencia del 22,4% (Figura18).

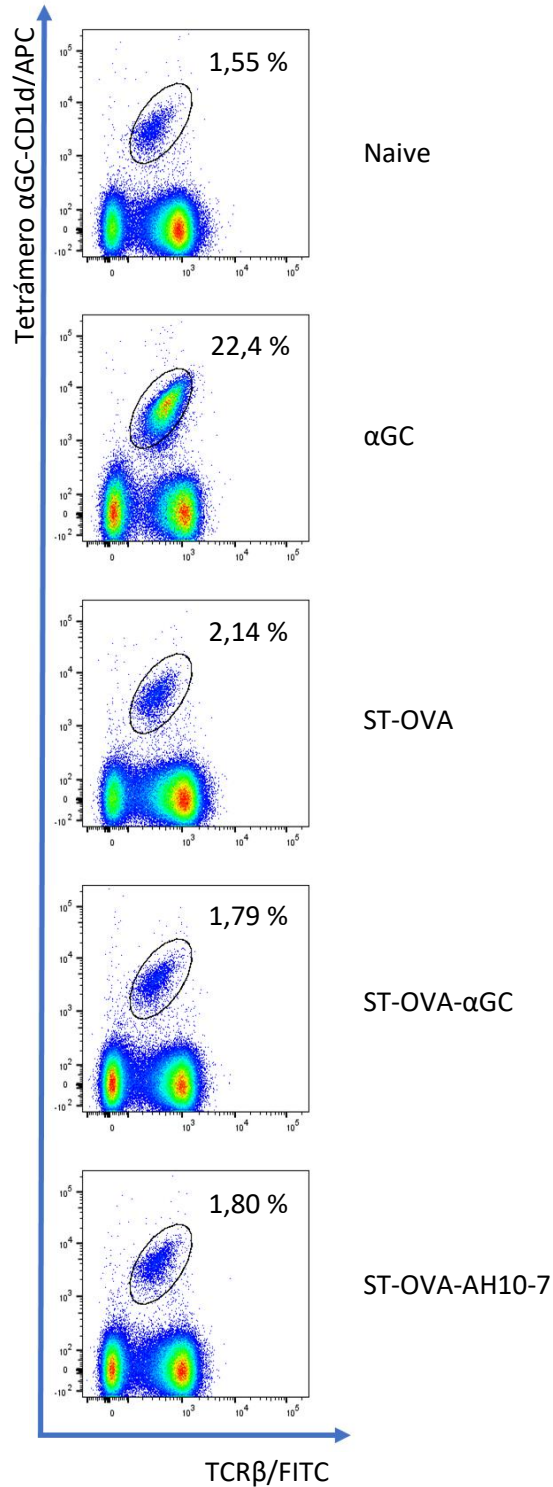


Figura 18. Citometría de flujo de esplenocitos de ratones C57BL/6 teñidos para observar células iNKT. Frecuencia de células iNKT teñidas con tetrámero-αGC-CD1d-APC y TCRβ-FITC analizadas por citometría de flujo desde esplenocitos de ratones C57BL/6, 72 horas post-inmunización de $1 \cdot 10^5$ UFC de cepas ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7 (2 ratones por grupo). Como control positivo se incluyó un grupo inmunizado con de 4 nmoles activos de αGC soluble y como control negativo un grupo no tratado (*Naive*). Los dot plot son representativos y en la elipse se señala la población de células iNKT con sus respectivos porcentajes.

5.3 Objetivo específico 3. Estudiar *in vivo* la magnitud de anticuerpos provenientes de células B antígeno-específicas para ovoalbúmina (OVA) y *Salmonella Typhimurium* (ST) en ratones C57BL/6 luego de su inmunización con ST-OVA-GL

5.3.1 Respuesta antígeno-específica de linfocitos B de ratones C57BL/6 infectados con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7

La realización del ensayo *in vivo* para determinar la presencia de anticuerpos anti-OVA y anti-ST se llevó a cabo según la planificación propuesta en la Figura 7, donde se analizaron los sueros de los días 14 y 21 post-inmunización de los 9 grupos experimentales.

La Figura 19 muestra la influencia de la incorporación de ligandos glicolípidicos a la membrana celular de ST y la producción diferencial de IgG anti-OVA.

La medición de los sueros del día 14 post-inmunización en la Figura 19A mostraron el mayor título de IgG en el grupo OVA-CFA, grupo correspondiente al control positivo del experimento. El grupo α GC-OVA mostró el segundo mayor título de anticuerpo, mientras que los grupos de ST, no presentó un aumento en el título de IgG total, ni en las cepas controles ni en las con incorporación de glicolípidos en su membrana externa. El grupo PBS, correspondiente al control negativo tampoco mostró presencia de anticuerpo. La medición de los sueros del día 21 post-inmunización (Figura 19B) mostró el mismo patrón de comportamiento en la producción de IgG total, pero alcanzando un mayor título de anticuerpo en los grupos OVA-CFA y α GC-OVA.

La presencia de ligandos de células iNKT en los grupos de ratones inoculados con ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 no generaron diferencias en la producción de IgG.

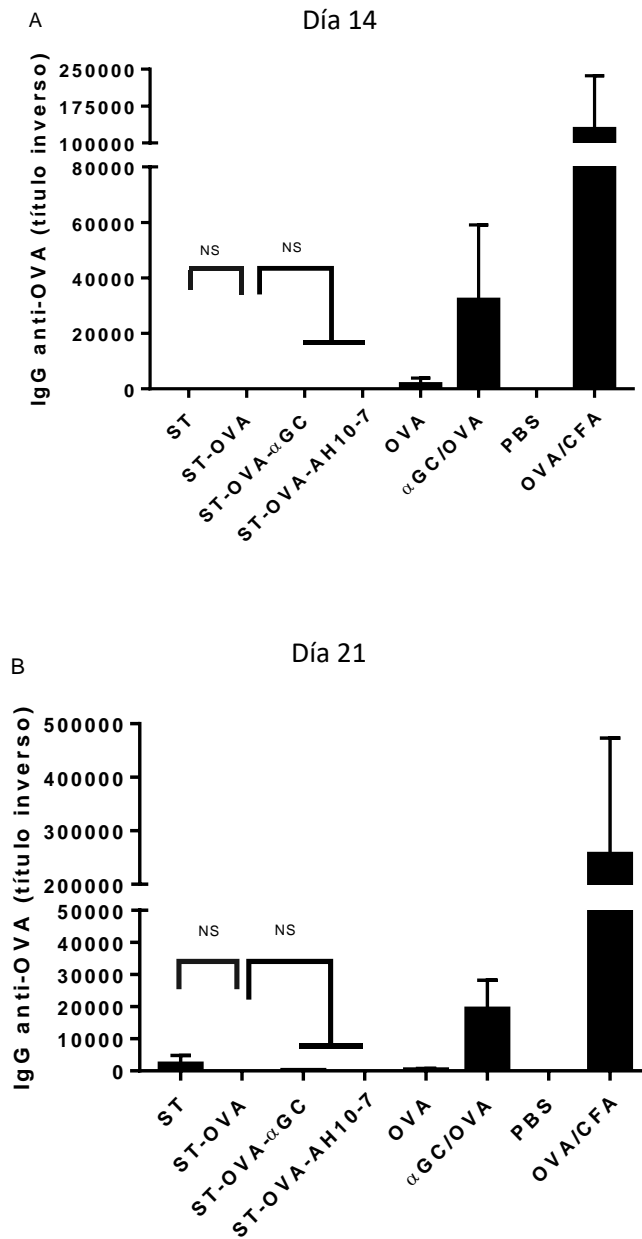


Figura 19. Detección de IgG anti-OVA en sueros. En (A) se indica el inverso del título de IgG anti-OVA analizado por ELISA de suero de ratones C57BL/6 luego de 14 días post-inmunización (4 ratones por grupo) con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7). Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina (OVA), α GC soluble más ovoalbúmina (α GC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). En (B) se indica el inverso del título de IgG anti-OVA analizado por ELISA de suero de ratones C57BL/6 luego de 21 días post-inmunización (4 ratones por grupo) con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7). Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina (OVA), α GC soluble más ovoalbúmina (α GC-OVA), se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). El título final para cada grupo se determinó en la dilución de suero donde la absorbancia alcanzada doblara a la absorbancia del grupo PBS. Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras plomas sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

La Figura 20 muestra la influencia de la incorporación de ligandos glicolipídicos a la membrana celular de ST y si esta era capaz de generar una producción diferencial de anticuerpo isotipo IgG anti-ST.

En la medición de los sueros del día 14 post-inmunización (Figura 20A) el grupo ST muestra el mayor título de IgG, seguido por una disminución en el título por los grupos ST-OVA y ST-OVA- α GC. El grupo correspondiente a ST-OVA-AH10-7 no mostró producción de anticuerpo IgG anti-ST. Sólo el aumento del título de IgG anti-ST del grupo ST fue estadísticamente significativo al compararse con el grupo ST-OVA. En los grupos ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 se observó una disminución del título de IgG anti-ST con respecto al grupo ST-OVA. En los grupos OVA, α GC-OVA, OVA-CFA y PBS no se observó producción de anticuerpo, resultado esperado, ya que estos grupos no cuentan con antígenos correspondientes a ST. La medición de los sueros del día 21 post-inmunización (Figura 20B) muestra el mayor título de IgG anti-ST para el grupo ST. Mientras que al comparar al grupo ST-OVA- α GC con el grupo control ST-OVA, se observó un aumento en el título de anticuerpo. Por el contrario, al comparar el grupo ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA, este mostró una disminución en el título de IgG anti-ST estadísticamente significativa. Con respecto a los grupos OVA, α GC-OVA, OVA-CFA y PBS no se observó producción de anticuerpo, manteniéndose lo observado en los sueros del día 14 post-inmunización.

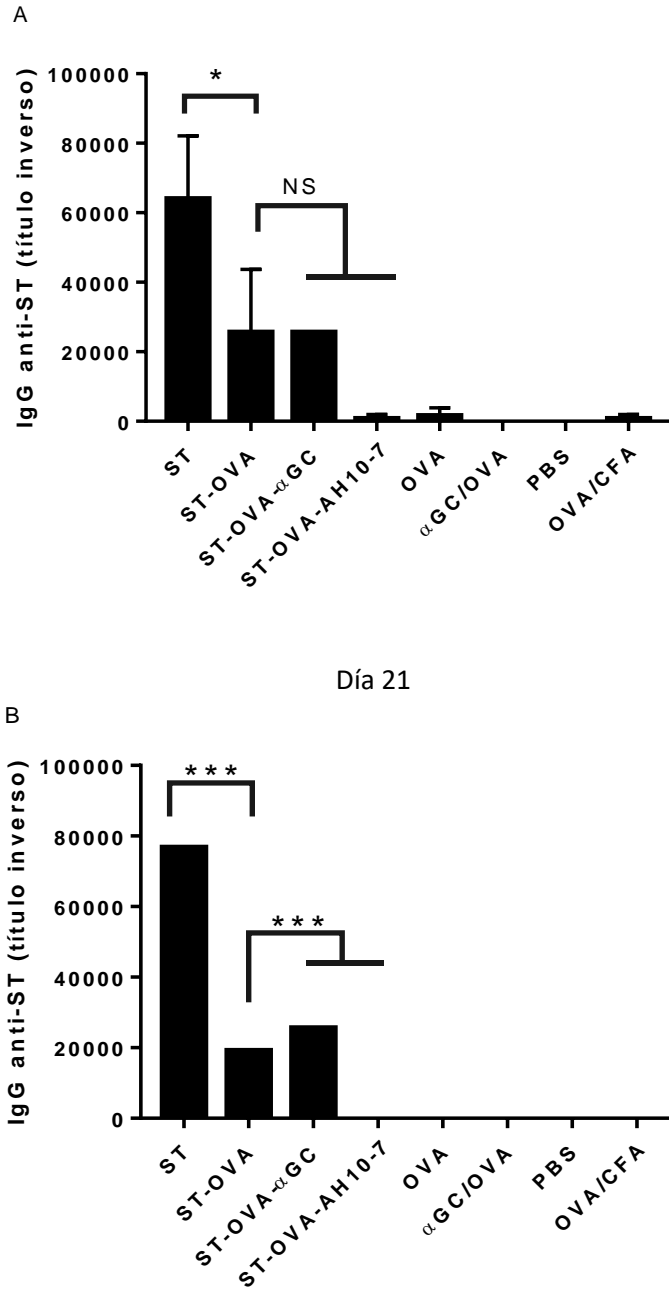


Figura 20. Detección de IgG anti-ST en sueros. En (A) se indica el inverso del título de IgG anti-ST analizado por ELISA de suero de ratones C57BL/6 luego de 14 días post-inmunización (4 ratones por grupo) con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7). Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 µg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). En (B) se indica el inverso del título de IgG anti-ST analizado por ELISA de suero de ratones C57BL/6 luego de 21 días post-inmunización (4 ratones por grupo) con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7). Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 µg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). El título final para cada grupo se determinó en la dilución de suero donde la absorbancia alcanzada doblara a la absorbancia del grupo PBS. Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

5.4 Objetivo específico 4. Estudiar *in vivo* la respuesta celular antígeno-específica de linfocitos T CD8 y CD4 para ovoalbúmina (OVA) y *Salmonella* Typhimurium (ST) en ratones C57BL/6 luego de su inmunización con ST-OVA-GL

5.4.1 Respuesta antígeno-específica de linfocitos T CD4 y CD8 de ratones C57BL/6 infectados con ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7

La realización del ensayo *in vivo* para estudiar la producción de múltiples citoquinas secretadas por células T CD4 y CD8, se llevó a cabo según la planificación propuesta en la Figura 7, donde se analizaron células T provenientes de bazo de ratones C57BL/6 después de 22 días post-inmunización.

La Figura 21 muestra la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de CD44, de las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. En los gráficos de la Figura 21, las re-estimulaciones con OVA (Figura 21A) y SIINFEKL (Figura 21B) no mostraron diferencias en la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de CD44. Sin embargo, para el gráfico correspondiente a la re-estimulación con ST (Figura 21C) se observó un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de CD44 en el grupo ST-OVA-AH10-7 con respecto al grupo ST-OVA.

La Figura 22 muestra la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de CD62L, de las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. En los gráficos de la Figura 22, las re-estimulaciones con OVA (Figura 22A) y SIINFEKL (Figura 22B) mostraron una disminución en la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de CD62L para el grupo ST-OV-AH10-7. Mientras que para el gráfico correspondiente a la re-estimulación con ST (Figura 22C) no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

La Figura 23 muestra la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de LAMP-1, de las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. En los gráficos de la Figura 23, de re-estimulación con OVA (Figura 23A) la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de LAMP-1 no mostró ninguna diferencia entre grupos. La frecuencia de células T CD8+ para la expresión de LAMP-1 en la re-estimulación con SIINFEKL (Figura 23B) mostró una disminución para el grupo ST, mientras que para los grupos ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 no se obtuvieron diferencias. Finalmente, la frecuencia de células T CD8+ para la expresión de LAMP-1 en la re-estimulación con ST (Figura 23C), el grupo ST-OVA-AH10-7 obtuvo la mayor frecuencia de células TCD8 para la expresión de LAMP-1 siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo ST-OVA.

La Figura 24 muestra la frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN γ para las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. En los gráficos de la Figura 22, las re-estimulaciones con OVA (Figura 24A) y ST (Figura 24C) mostraron diferencias en la frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN γ en el grupo ST con respecto al grupo ST-OVA. Mientras que para la re-estimulación con OVA (Figura 24B) se observa una disminución de la frecuencia celular con respecto al grupo ST-OVA, la re-estimulación con ST (Figura 24C) muestra un aumento de la frecuencia celular. Por último, el gráfico de la Figura 24 para la re-estimulación con SIINFEKL (Figura 24B) no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

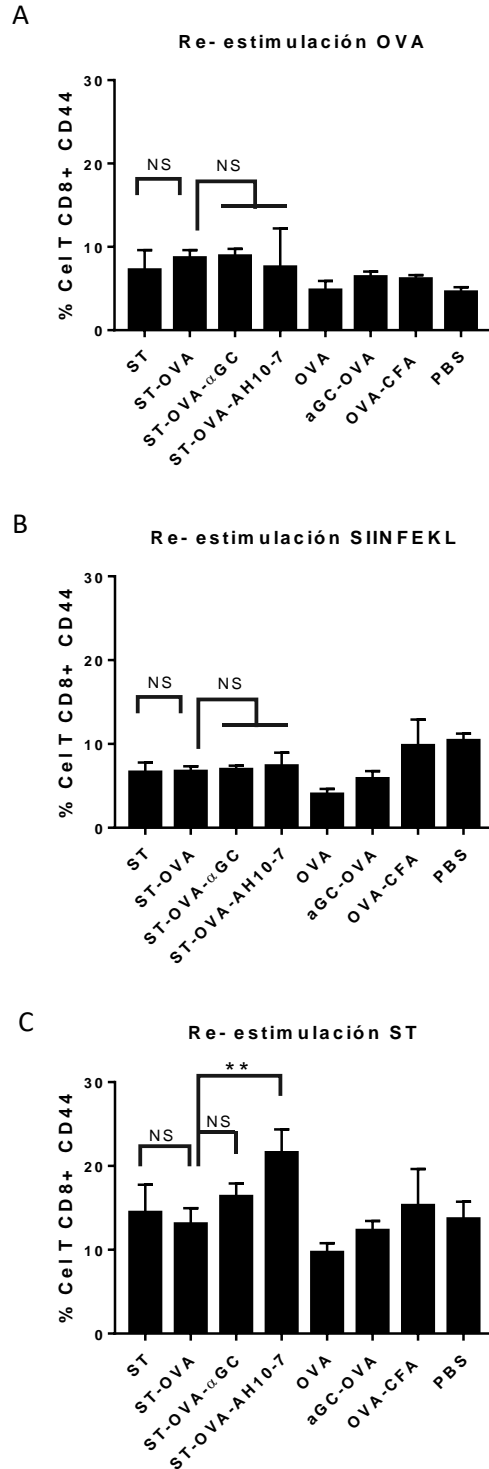


Figura 21. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de CD44. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de CD44 analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 µg/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 µg/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 µg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

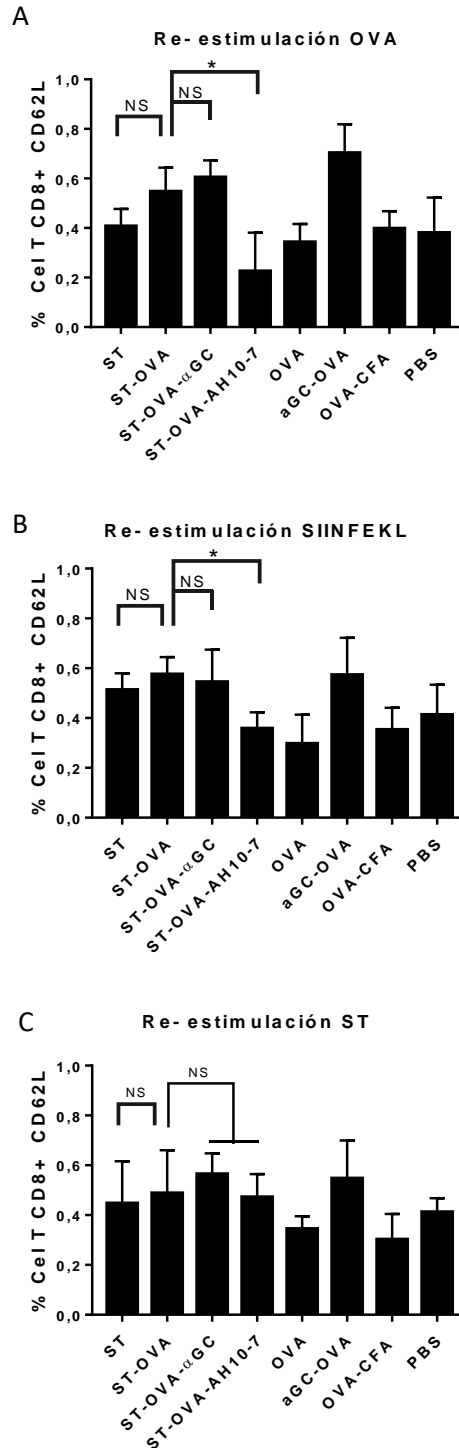
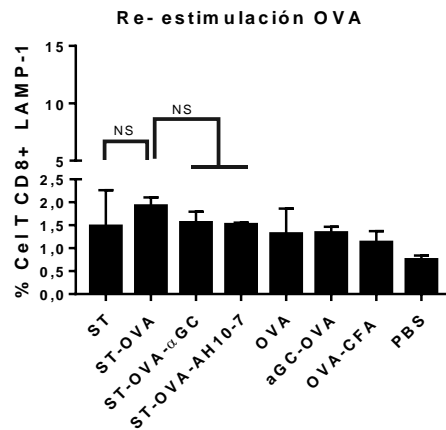
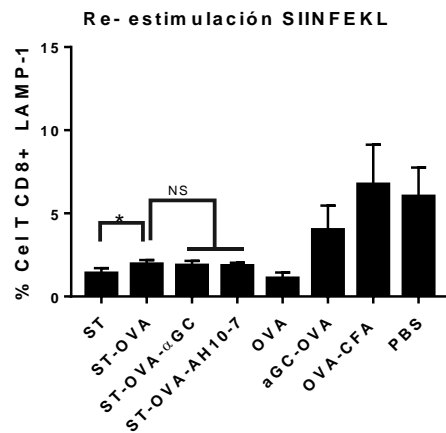


Figura 22. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de CD62L. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de CD62L analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 μ g/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 μ g/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina (OVA), α GC soluble más ovoalbúmina (α GC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005.

A



B



C

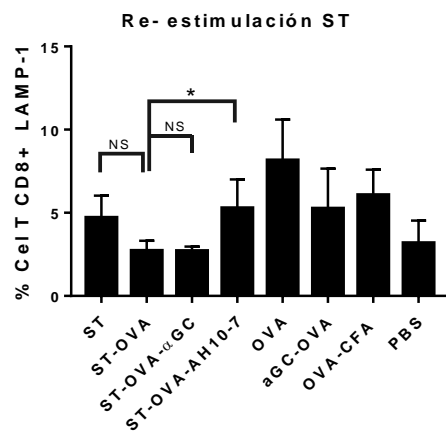


Figura 23. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de LAMP-1. Frecuencia de células T CD8+ con expresión de LAMP-1 analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 µg/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 µg/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 µg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

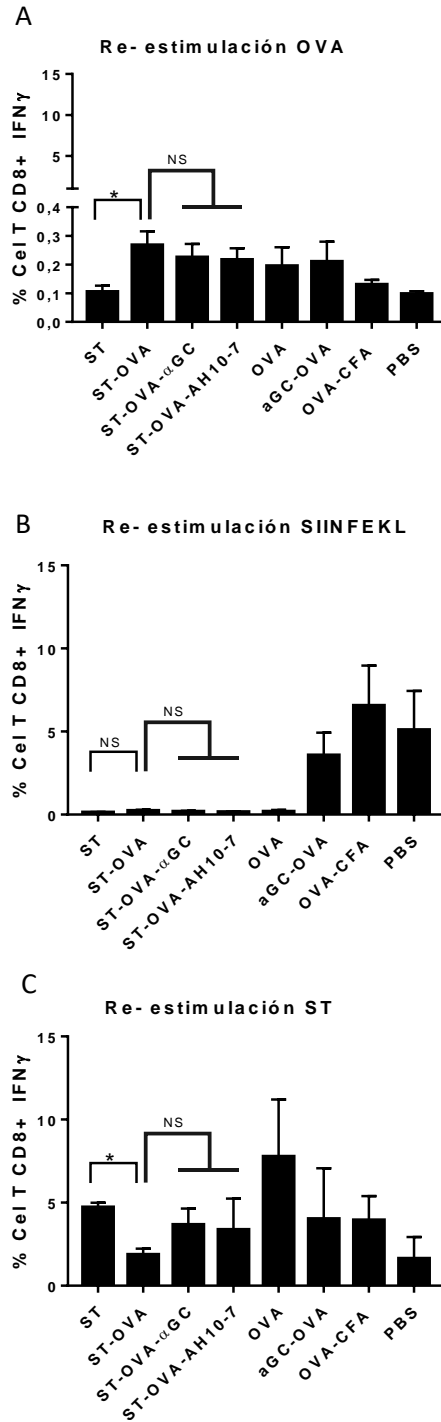


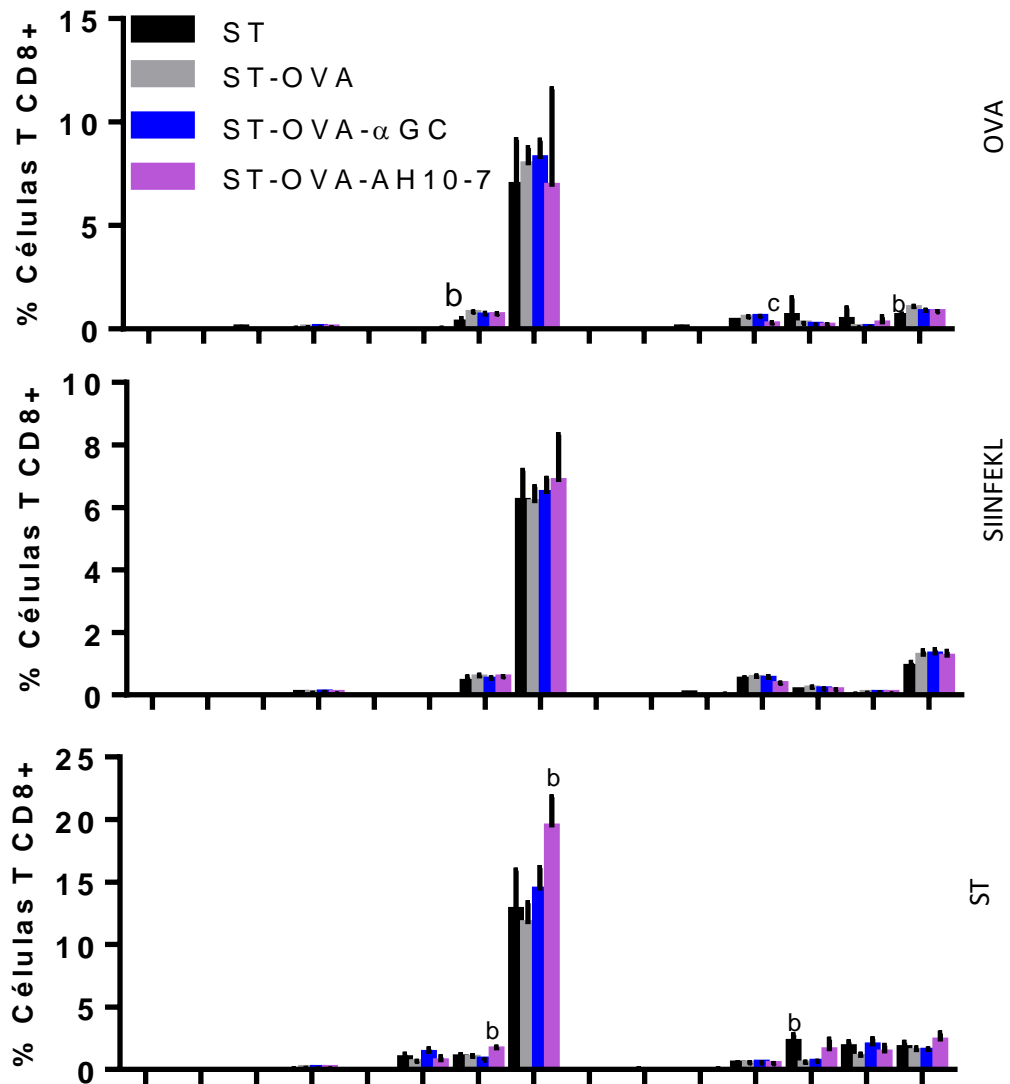
Figura 24. Frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN γ . Frecuencia de células T CD8+ productoras de IFN γ analizada por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 μ g/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 μ g/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina (OVA), α GC soluble más ovoalbúmina (α GC-OVA), como control positivo se utilizó el adyudante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005.

En la Figura 25 se muestran 3 gráficos que representan las frecuencias de células T CD8+ para marcadores de memoria y citotoxicidad, cada uno de los gráficos corresponde a esplenocitos de ratones C57BL/6, 22 días post-inmunización re-estimulados con OVA, SIINFELK o ST. La tabla bajo los gráficos detalla las columnas con las diferentes combinatorias para los marcadores CD44, CD62L, LAMP-1 e IFN γ para los grupos ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de frecuencia de células T CD8 de los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. Los valores de “*p value*” se señalan con las letras a, b y c sobre las barras de los gráficos y cada letra corresponde a un valor establecido. Para “a” el valor $p < 0,05$, para “b” el valor $p < 0,01$ y para “c” el valor $p < 0,005$.

La re-estimulación con OVA mostró una disminución de la frecuencia de células T CD8 positivas para la combinación CD44+LAMP-1+ en el grupo ST con respecto a ST-OVA. Para la frecuencia de células T CD8 positivas para CD62L+, el grupo ST-OVA-AH10-7 mostró una disminución con respecto al grupo ST-OVA. La frecuencia de células T CD8 positivas para LAMP-1+ el grupo ST presentó una disminución con respecto al grupo ST-OVA. Las demás combinaciones para los marcadores mencionados no mostraron tener diferencias estadísticamente significativas.

La re-estimulación con SIINFELK no presentó diferencias entre grupos para ninguna combinatoria de marcadores.

La re-estimulación con ST mostró un aumento de la frecuencia de células T CD8 positivas para las combinaciones CD44+ y CD44+LAMP-1+ en el grupo ST-OVA-AH10-7 con respecto a ST-OVA con un valor “b” igual a $p < 0,01$. Para la frecuencia de células T CD8 positivas para LAMP-1+IFN γ +, el grupo ST presentó un aumento en comparación con el grupo ST-OVA. Las demás combinaciones para los marcadores mencionados no mostraron tener diferencias estadísticamente significativas.



CD44	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CD62L	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
IFN γ	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
LAMP-1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+

Figura 25. Frecuencia de células T CD8+ para marcadores de memoria y citotoxicidad. Frecuencia de células T CD8+ para la combinatoria de los marcadores de superficie CD44, CD62L, LAMP-1 y productoras de IFN γ medida en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina, 10 nM de SIINFEKL o 10 μ g/mL de lisado de ST. Los marcadores fueron analizados por citometría de flujo multiparamétrica de la población de células T CD8+. Se graficaron todas las posibles combinaciones de los marcadores antes mencionados. Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación a ST-OVA. a $p < 0,05$, b $p < 0,01$.

estimulaciones, las que corresponden a la proteína ovoalbúmina, el péptido SIINFEKL y el lisado de bacteria ST.

La Figura 26 muestra la frecuencia de células T CD4+ productoras de TNF α para las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. El gráfico de la Figura 26, para la re-estimulación con OVA (Figura 26A) mostró que no hay diferencias entre los grupos ST y ST-OVA. Sin embargo, al comparar los grupos, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA estos muestran una disminución de la frecuencia celular estadísticamente significativa. Para la re-estimulaciones con SIINFEKL (Figura 26B) y ST (Figura 26C) no se observaron diferencias en la frecuencia celular de los grupos comparados.

La Figura 27 muestra la frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ para las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. El gráfico de la Figura 27, para las re-estimulaciones con OVA (Figura 27A) y SIINFEKL (Figura 27B), no mostró diferencias entre los grupos. Sin embargo, para el gráfico de re-estimulación con ST (Figura 27C) sólo el grupo ST-OVA- α GC presentó una frecuencia de células mayor que el grupo control ST-OVA.

La Figura 28 muestra la frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-2 para las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolípidicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. El gráfico de la Figura 28 muestra que la re-estimulación con OVA (Figura 28A) no presentó diferencias entre los grupos. Sin embargo, para los gráficos de re-estimulación con SIINFEKL (Figura 28B) y ST (Figura 28C) solo el grupo ST-OVA-AH10-7 presentó una frecuencia celular mayor que el grupo control ST-OVA.

La Figura 29 muestra la frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-4 para las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolipídicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. En el gráfico de la Figura 29, se observa que las re-estimulaciones con OVA (Figura 29A) y SIINFEKL (Figura 28B) no mostraron diferencias entre los grupos. Sin embargo, en el gráfico de re-estimulación con ST (Figura 28C) se ve que sólo el grupo ST-OVA-AH10-7 presentó una frecuencia celular mayor que el grupo control ST-OVA.

La Figura 30 muestra la frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-17 para las re-estimulaciones con OVA, SIINFEKL o ST. El análisis estadístico de todos los gráficos para analizar la contribución de la incorporación de los ligandos glicolipídicos sobre la superficie de ST se realizó comparando los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. En el gráfico de la Figura 30, se observa que las re-estimulaciones con OVA (Figura 30A) y SIINFEKL (Figura 30B) no mostraron diferencias entre los grupos. Sin embargo, la re-estimulación con ST (Figura 30C) sólo el grupo ST-OVA-AH10-7 presentó una frecuencia celular mayor que el grupo control ST-OVA.

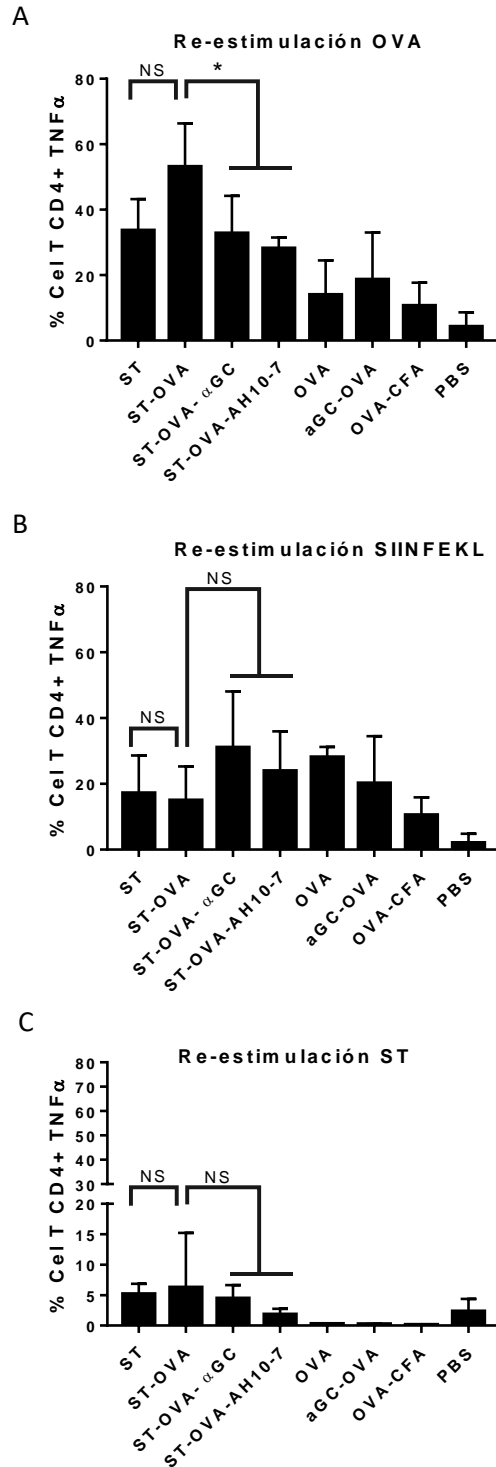


Figura 26. Frecuencia de células T CD4+ productoras de TNFα. Frecuencia de células T CD4+ productoras de TNFα analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 μg/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 μg/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

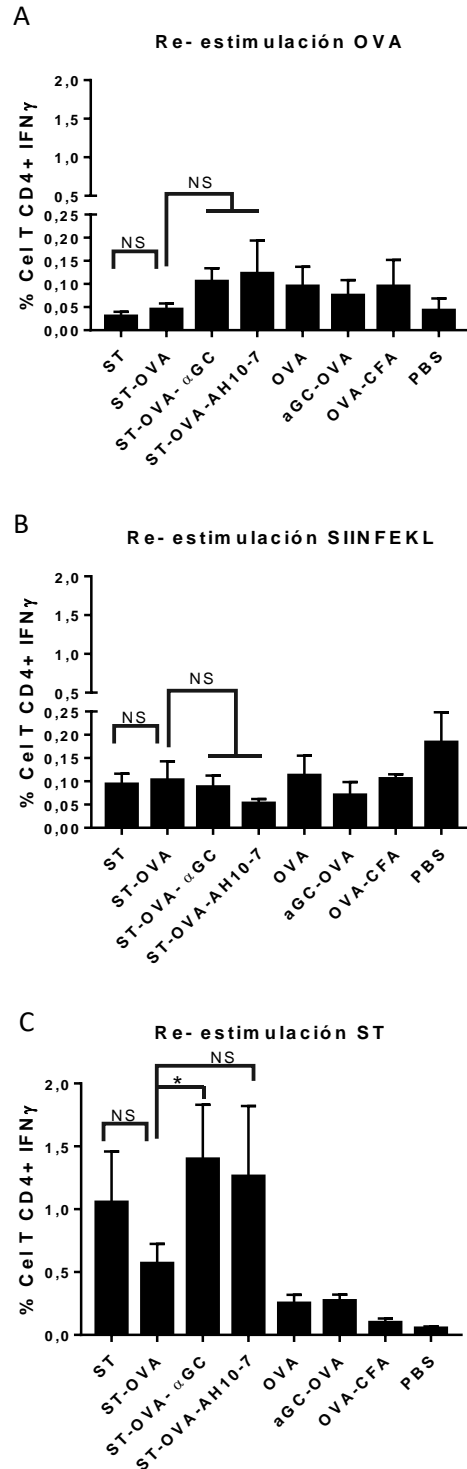
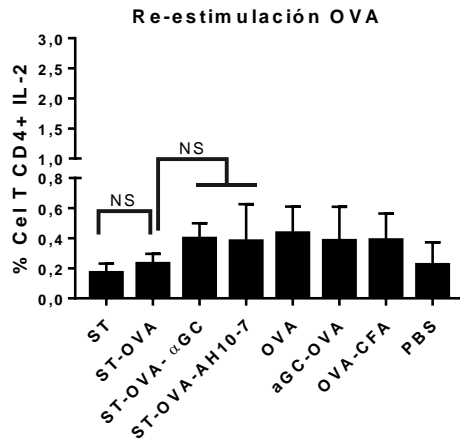
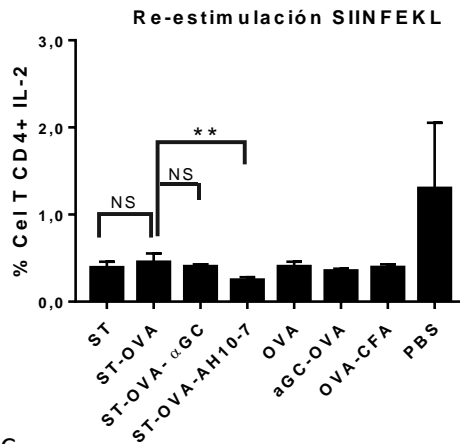


Figura 27. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ . Frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 μ g/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 μ g/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina (OVA), α GC soluble más ovoalbúmina (α GC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005.

A



B



C

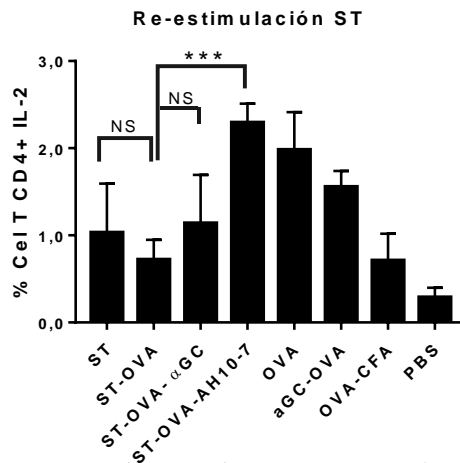


Figura 28. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-2. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-2 analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 µg/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 µg/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 µg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

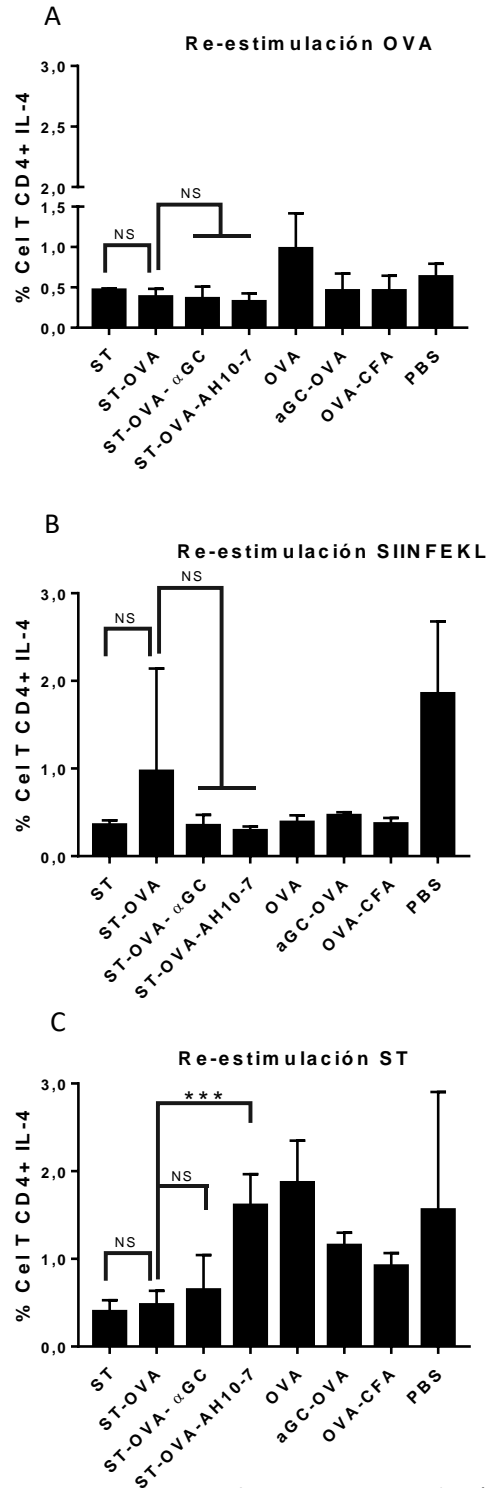


Figura 29. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-4. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IL-4 analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA-αGC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 µg/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 µg/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 µg/mL de ovoalbúmina (OVA), αGC soluble más ovoalbúmina (αGC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

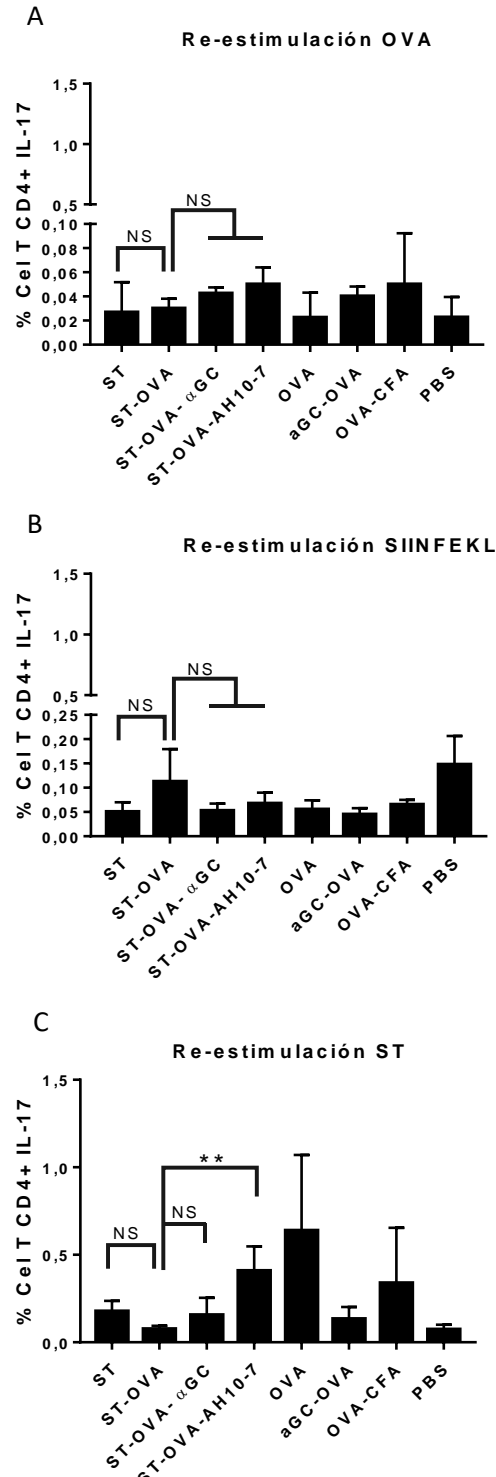


Figura 30. Frecuencia de células T CD4+ productoras de TNF α . Frecuencia de células T CD4+ productoras de TNF α analizadas por citometría de flujo en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con (A) 50 μ g/mL de ovoalbúmina, (B) 10 nM de SIINFEKL o (C) 10 μ g/mL de lisado de ST. Como controles se incluyeron grupos inmunizados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina (OVA), α GC soluble más ovoalbúmina (α GC-OVA), como control positivo se utilizó el adyuvante CFA en conjunto con el antígeno ovoalbúmina (OVA-CFA) y como control negativo se inmunizó con PBS (PBS). Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. NS=no significativo. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,005.

Las Figuras 31, 32 y 33 muestran gráficos que representan las frecuencias de células T CD4+ para estudiar la multifuncionalidad en la producción y secreción de las citoquinas IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 e IL-17 de las células T CD4 antígeno-específicas. Los resultados provienen de esplenocitos de ratones C57BL/6, 22 días post-inmunización re-estimulados con OVA, SIINFEKL o ST los que fueron teñidos para seleccionar la población de linfocitos T CD4, luego de la selección de la población se estudiaron las distintas subpoblaciones para la detección de distintas combinaciones de citoquinas por tinción intracelular las que fueron analizadas por citometría de flujo multiparamétrica. La tabla bajo los gráficos detalla las diferentes combinatorias para las citoquinas antes mencionadas para los grupos ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de frecuencia de células T CD4 de los grupos ST, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con el grupo ST-OVA. Los valores de “*p value*” se señalan con las letras a, b, c y d sobre las barras de los gráficos y cada letra corresponde a un valor establecido. Para “a” el valor $p < 0,05$, para “b” el valor $p < 0,01$, para “c” el valor $p < 0,005$ y para “d” $p < 0,0001$.

El gráfico de la Figura 31 muestra los resultados para los esplenocitos re-estimulados con OVA y se observa una disminución en la frecuencia de células T CD4+ para la combinatoria de IL-4+TNF α + de los grupos ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 con respecto al grupo ST-OVA. El resto de las combinatorias no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

El gráfico de la Figura 32 muestra los resultados para los esplenocitos re-estimulados con el péptido SIINFEKL. Al realizar el análisis estadístico para cada una de las combinatorias de citoquinas, no se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia de células T CD4+ para ningún grupo.

El gráfico de la Figura 33 muestra los resultados para los esplenocitos re-estimulados con el lisado de ST y se observa un aumento en la frecuencia de células T CD4+ para las combinatorias de IFN γ +, IL-2+IL-17+, IL-2+, IL-4+IL-17+, IL-4+TNF α +, IL-4+ e IL-17 en el grupo ST-OVA-AH10-7 respecto al grupo ST-OVA, siendo estadísticamente significativa en todas las combinatorias mencionadas.

OVA

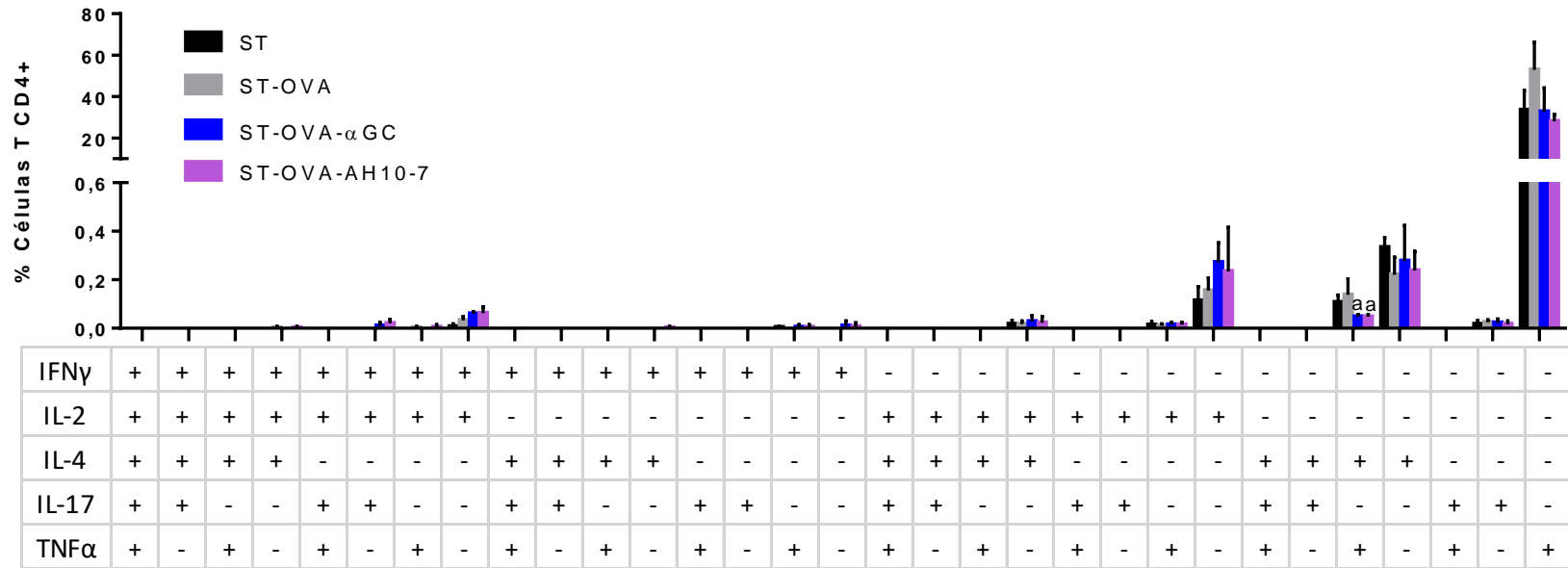


Figura 31. Multifuncionalidad de células T CD4 re-estimuladas con ovoalbúmina. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ , IL-2, IL-4, IL-17 o TNF α medida en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con 50 μ g/mL de ovoalbúmina. Se realizó tinción intracelular de esplenocitos para marcar cada una de las citoquinas antes mencionadas y se analizó por citometría de flujo multiparamétrica la población de células T CD4+. Se graficaron todas las posibles combinaciones de las citoquinas antes mencionados. Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0001$.

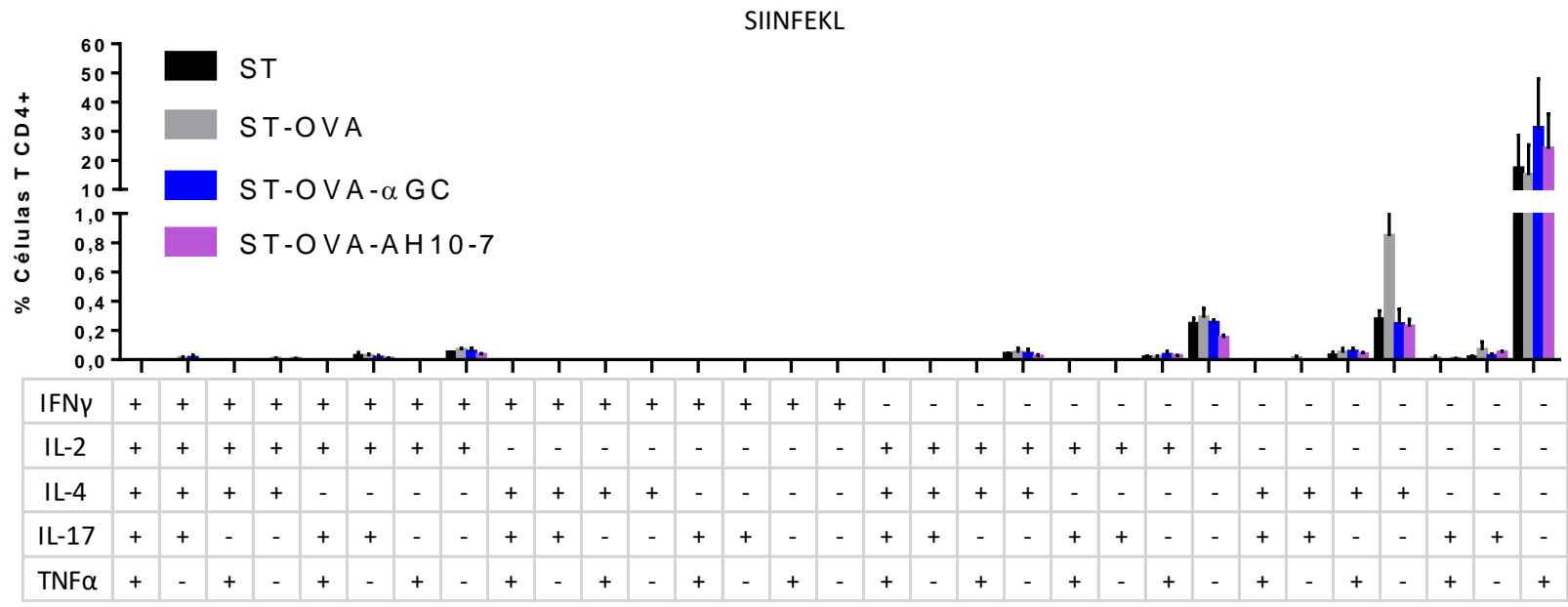


Figura 32. Multifuncionalidad de células T CD4 re-estimuladas con SIINFEKL. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ , IL-2, IL-4, IL-17 o TNF α medida en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimulados con 10nM de SIINFEKL. Se realizó tinción intracelular de esplenocitos para marcar cada una de las citoquinas antes mencionadas y se analizó por citometría de flujo multiparamétrica la población de células T CD4+. Se graficaron todas las posibles combinaciones de las citoquinas antes mencionados. Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. a p<0.05, b p<0.01, c p<0.005, d p<0.0001.

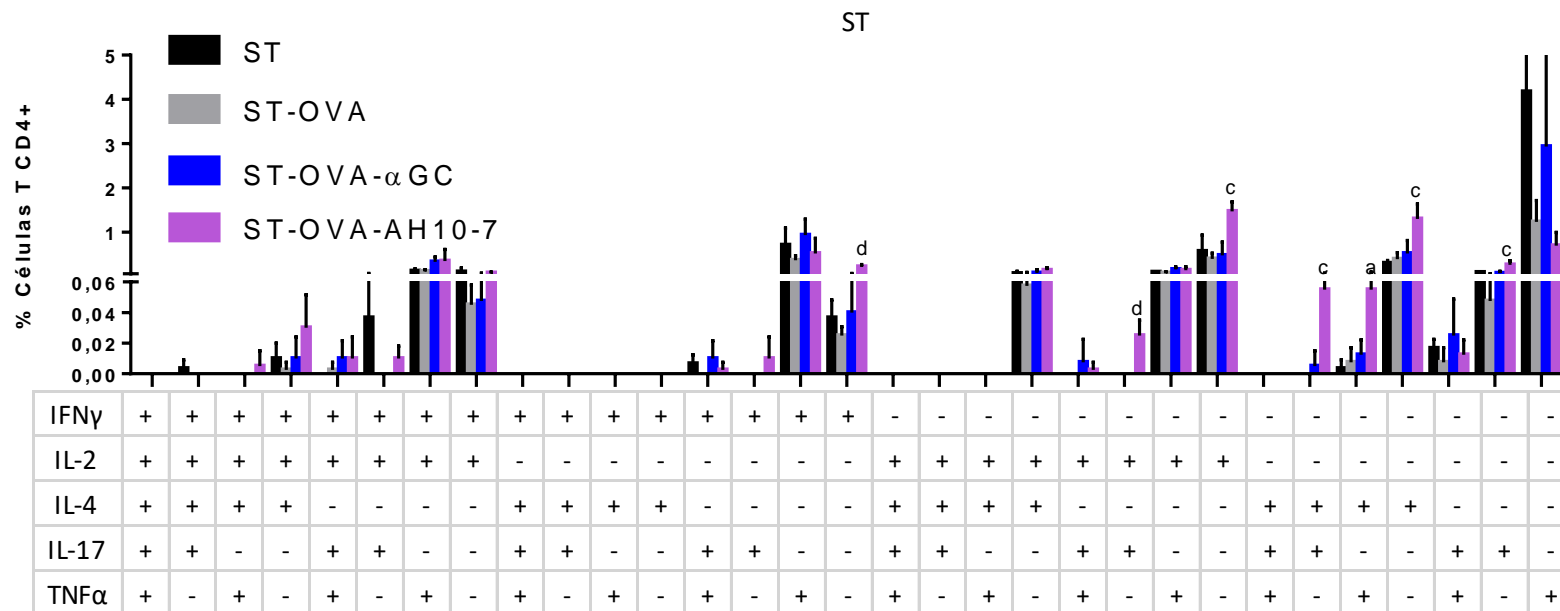


Figura 33. Multifuncionalidad de células T CD4 re-estimadas con ST. Frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN γ , IL-2, IL-4, IL-17 o TNF α medida en esplenocitos de ratones C57BL/6 (3 semanas post-inmunización y 4 ratones por grupo) inmunizados con cepas de ST (ST, ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7) y re-estimados con 10 μ g/mL de lisado de ST. Se realizó tinción intracelular de esplenocitos para marcar cada una de las citoquinas antes mencionadas y se analizó por citometría de flujo multiparamétrica la población de células T CD4+. Se graficaron todas las posibles combinaciones de las citoquinas antes mencionados. Los datos graficados corresponden al promedio de cada grupo representado por columnas y las barras negras sobre cada columna representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó comparando los distintos grupos en relación al grupo ST-OVA. a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.005$, d $p < 0.0001$.

VI. DISCUSIÓN

El desarrollo de este trabajo de investigación se enfocó en evaluar la incorporación de ligandos de células iNKT a la membrana celular externa de la bacteria *Salmonella* Typhimurium y su influencia en la respuesta antígeno-específica por parte de células T y B contra el antígeno modelo OVA. Para esto, se generaron dos cepas de ST-OVA con ligandos estimuladores de células iNKT en la membrana externa, los que se diferenciaban en sus características estructurales y funcionales.

Debido a que la incorporación de los glicolípidos a la membrana o pared celular se realizó mediante las interacciones hidrofóbicas entre ambos, es importante destacar las diferencias estructurales entre las bacterias gram-positivas utilizadas previamente y *Salmonella* Typhimurium.

Las bacterias gram-positivas se caracterizan por tener una pared celular gruesa, compuesta principalmente por peptidoglicano, además de ácidos teicóicos y lipoteicóicos (Shockman *et al.* 1983). En trabajos previos se utilizaron bacterianas Gram-positivas intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* a las que se les realizaron modificaciones externas en la membrana celular y modificaciones a nivel génico para la expresión de antígenos. *Listeria monocytogenes* se caracteriza por presentar moléculas como mureína, peptidoglicano, ácido meso-diaminopimélico, ácido teicóico y ácido lipoteicóico en su pared celular (Silhavy *et al.* 2010), mientras que *Mycobacterium tuberculosis* se caracteriza por moléculas como ácidos micólicos y micolatos, generando una pared rica en lípidos, en consecuencia, una superficie altamente hidrófoba (Hotter *et al.* 2011).

Por otro lado, la estructura celular de las bacterias Gram-negativas se caracteriza por poseer dos membranas, una externa y otra interna, separadas por un espacio periplasmático que contiene peptidoglicano, el cual es mucho más delgado que en las gram-positivas. La membrana externa posee principalmente lipopolisacárido (LPS) y fosfolípidos mientras que

la membrana interna es rica en fosfolípidos y corresponde a la membrana plasmática. (Dong *et al.* 2017).

A pesar de estas diferencias, la interacción de los glicolípidos se genera con la membrana celular externa, por lo que ambos sistemas son similares en cuanto al mecanismo de incorporación.

En este trabajo se realizó por primera vez la incorporación de los glicolípidos α GC y AH10-7 a una bacteria de tipo gram-negativo. Históricamente, se han incorporado ligandos glicolípidicos a la superficie celular de bacterias Gram-positivas mediante la interacción de ácidos micólicos y otras moléculas de lípidos extremadamente hidrófobas presentes en la membrana bacteriana lo que permite que lípidos exógenos puedan incorporarse a estas estructuras sin afectar la viabilidad de las bacterias (Venkataswamy *et al.* 2009). A pesar de que el perfil de lípidos varía entre ambos grupos bacterianos, la interacción entre moléculas altamente hidrófobas en la membrana celular de ST y glicolípidos activadores de células iNKT permitió la incorporación de α GC y AH10-7 a la cepa ST-OVA.

Para comprobar que la incorporación de estos glicolípidos a la membrana celular externa de ST-OVA fue exitosa, se infectaron células dendríticas provenientes de ratones C57BL/6, hCD1d-KI y hCD1d-KO con las cuatro cepas de ST utilizadas en todos los ensayos. Luego las células dendríticas fueron co-cultivadas con los hibridomas de células iNKT K2C10. Los resultados en el caso del co-cultivo de células dendríticas de ratones C57BL/6 mostraron que a índices de multiplicidad de 10 y 100 se generó un aumento en la secreción de IL-2 mayor que las cepas de ST sin incorporación de glicolípidos, resultando en la activación de los hibridomas K2C10 (Figura 14A). Si bien a índices de multiplicidad menores se observaron niveles mayores de secreción de IL-2 por las cuatro cepas de ST con y sin incorporación de glicolípidos (Figura 14A), esto podría deberse a la presentación del glicolípido endógeno iG3b generado por las células dendríticas infectadas con ST, proceso conocido como activación indirecta de células iNKT. Es posible que este efecto se superpusiera a la activación directa mediado por glicolípidos exógenos (Holzapfel *et al.* 2014). Aunque esta podría ser una

explicación para entender los niveles de secreción de IL-2 para los índices de multiplicidad de infección más bajos, el estudio de este fenómeno no fue estudiado.

Los co-cultivos de células dendríticas provenientes de ratones hCD1d-KO (células dendríticas sin expresión de CD1d) con los hibridomas K2C10 (Figura 14C) mostraron una liberación basal y sostenida de IL-2 a pesar de aumentar el índice de multiplicidad de infección. Debido a que la presentación de glicolípidos es mediada vía CD1d para el posterior reconocimiento y activación del hibridoma, la ausencia de CD1d no permite la presentación de glicolípidos. Este resultado se repite para el co-cultivo realizado con las células dendríticas provenientes de ratones hCD1d-KI (Figura 14B), sin embargo, se esperaba obtener una liberación de IL-2 dosis dependiente para las curvas generadas por las cepas ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 debido a la interacción de la molécula CD1d humana de las células dendríticas con el TCR del hibridoma. Los controles de este ensayo con los glicolípidos solubles α GC y AH10-7 muestran un nivel menor de activación de los hibridomas en cuanto a la liberación de IL-2, comparados con los controles del co-cultivo de las células dendríticas C57BL/6. Es posible que esta diferencia se deba a las distintas interacciones del CD1d humano o murino durante la presentación de los glicolípidos y el reconocimiento por el TCR del hibridoma, provocando distintos niveles de activación.

Si bien la incorporación de los glicolípidos α GC y AH10-7 a la membrana celular de ST se pudo estudiar por ensayos funcionales, queda por estudiar este proceso en cuanto a la cantidad de glicolípidos que incorpora cada bacteria, la distribución y la estabilidad en el tiempo. Otro punto importante para futuros estudios es la influencia de las estructuras de los glicolípidos en la estabilidad de la membrana externa de ST. También es posible realizar modificaciones a la membrana externa de ST para aumentar la afinidad con glicolípidos que presenten estructuras que favorezcan aumentar la hidrofobicidad generando uniones más estables entre lípidos.

Para estudiar la respuesta antígeno-específica, se expresó ovoalbúmina en las cepas de ST. Una vez comprobada la expresión mediante western blot en las cepas ST-OVA, ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 se procedió a realizar ensayos funcionales *in vitro* de activación de

esplenocitos derivadas de ratones OT-I. Las células T CD8 de estos esplenocitos reconocen el complejo pMHC H-2Kb/OVA257-264 ya que poseen TCRs específicos para péptidos derivados de la proteína ovoalbúmina por lo que estos no son capaces de reconocer glicolípidos. Este ensayo permitió estudiar la influencia de la expresión de la proteína ovoalbúmina de las cepas ST-OVA en la activación de esplenocitos derivados de ratones OT-I.

En la Figura 16 se observan los gráficos correspondientes a los co-cultivos de las células dendríticas derivadas de ratones C57BL/6 (Figura 16A) hCD1d-KI (Figura 16B) y hCD1d-KO (Figura 16C) infectadas con las cuatro cepas de ST y co-cultivadas con esplenocitos derivados de ratones OT-I. Los resultados muestran una liberación de IL-2 por parte de los esplenocitos activados por las células dendríticas que procesaron y presentaron péptidos en el MHC-I de las cepas ST-OVA y ST-OVA- α GC para el índice de multiplicidad 100 (Figura 16A-C). Sin embargo, la cepa ST-OVA-AH10-7 no logró provocar la activación de los esplenocitos OT-I y generó una curva similar a la cepa sin glicolípido y que no expresa OVA. Al analizar la expresión de la proteína ovoalbúmina de la cepa ST-OVA-AH10-7 por western blot se aprecia la presencia de esta al mismo nivel que las cepas ST-OVA y ST-OVA- α GC, las cuales generaron la activación de los esplenocitos OT-I. Probablemente la presencia del glicolípido AH10-7 sobre la membrana de ST interfiere con el procesamiento o la presentación de péptidos por algún mecanismo aun no conocido.

Con estos resultados, se procedió a diseñar los experimentos *in vivo* para comprobar la hipótesis de este trabajo. El primer experimento *in vivo* se realizó para obtener información de la cinética de expansión de las células iNKT una vez realizada una estimulación con α GC soluble. Estudios previos han reportado que el punto máximo de expansión de células iNKT en ensayos *in vivo* por administración de α GC soluble ocurre a las 72 horas. Los resultados de este ensayo (Figura 17) coincidieron con las 72 horas después de realizar una inyección intraperitoneal a ratones hCD1d-KI, donde se obtuvo la mayor expansión celular. Con la información obtenida de este experimento se procedió a infectar ratones con las cepas de ST y así estudiar la expansión de células iNKT luego de la inmunización de ratones C57BL/6. Los resultados (Figura 18) mostraron que sólo el control positivo de α GC soluble provocó la expansión de las células iNKT, mientras que todas las cepas de ST mantuvieron el nivel basal

de células iNKT al igual que el control negativo (*Naive*). Se esperaba que las cepas ST-OVA- α GC y ST-OVA-AH10-7 generaran un aumento en la expansión celular con respecto al grupo control (*Naive*). Es posible que la cantidad de bacterias inoculadas o que la eficiencia de incorporación de glicolípidos a la membrana celular de las bacterias no fue la suficiente para provocar la expansión de las células iNKT a un nivel detectable en ensayos *in vivo*. Es importante destacar que, a la fecha de este trabajo, es primera vez que se realiza la expansión de células iNKT mediante la incorporación de glicolípidos en una bacteria Gram-negativa. Es posible que la combinación de los componentes celulares propios de ST, como el LPS, en conjunto con los glicolípidos, influyan en el proceso de expansión de las células iNKT por algún mecanismo desconocido.

Se ha descrito que las respuestas de las células B y T contribuyen a la protección en modelos de ratón por infección de ST (Brown *et al.* 1989, Nauciel 1990). Las células B pueden conferir la primera línea de protección contra la invasión de la mucosa y la diseminación sistémica (Coward *et al.* 2014). Se realizaron ensayos *in vivo* para estudiar la influencia de la activación de las células iNKT sobre la respuesta humoral. Para evaluar la respuesta antígeno-específica, se midió el título de anticuerpos IgG anti-OVA. Los niveles medidos a los días 14 y 21 post-inmunización, mostraron que sólo los controles α GC-OVA y el control positivo OVA-CFA fueron capaces de generar altos títulos de anticuerpo (Figura 19). Posiblemente la expresión de OVA por las cepas ST-OVA y ST-OVA-GL no fue suficiente para generar una producción de anticuerpos detectables por ELISA.

Con respecto a la respuesta humoral en la medición de IgG anti-ST, sólo se obtuvo título de anticuerpo para los grupos de ST, ST-OVA y ST-OVA- α GC, siendo el grupo ST el que obtuvo el mayor título en las mediciones de los días 14 y 21 post-inmunización (Figura 20A-B). Sin embargo, al analizar el gráfico B de la Figura 20, el correspondiente a los sueros del día 21 post-inmunización para el análisis de IgG anti-ST, se observó un aumento en el título de anticuerpo para el grupo ST-OVA- α GC con respecto al grupo ST-OVA, y por el contrario para el grupo ST-OVA-AH10-7 se observó una disminución en el título de IgG anti-ST, este resultado indica la contribución de los glicolípidos en cuanto a la producción diferencial de anticuerpos por las células B, ya que ambos provocaron un efecto

contrario. Por lo tanto se puede apreciar la contribución de la activación de las células iNKT en la actividad de las células B. Se ha descrito que existe una colaboración entre células iNKT y células B de forma directa o indirecta. Ambas colaboraciones pueden inducir no sólo el aumento en el título de anticuerpos, sino también promover el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad del anticuerpo (Bai *et al.* 2013, Lang 2018). Para el resultado del grupo ST-OVA-AH10-7, es posible que la combinación de los componentes celulares propios de ST como el LPS en conjunto con el glicolípido AH10-7 influyan en la respuesta humoral mediante un mecanismo que inhiba la producción de IgG anti-ST. Este resultado abre las puertas a futuros estudios sobre la influencia de la estructura de los glicolípidos en la respuesta inmune anti patógenos.

En los últimos años ha crecido el interés en aprovechar la actividad inmunomoduladora de las células iNKT para mejorar las respuestas de las células T en contra de patógenos. La estimulación de las células iNKT con glicolípidos da como resultado la producción de una amplia gama de citoquinas que incluyen IFN γ e IL-4. Esta cascada de citoquinas contribuye a mejorar la respuesta inmune contra agentes infecciosos. En el desarrollo de esta investigación se propuso estudiar la influencia de los glicolípidos α GC y AH10-7 sobre la superficie de la bacteria ST y estudiar la contribución de la activación de las células iNKT en la respuesta T antígeno-específica contra la proteína OVA y ST. Se ha reportado que las células T son necesarias para la eliminación eficaz de ST. En particular, las células T CD4+ juegan un papel protector importante en modelos de ratón infectados con ST, mientras que las células T CD8+ no han mostrado ser esenciales para la inmunidad adquirida contra este patógeno (Lee *et al.* 2012). Los resultados de los análisis realizados por citometría de flujo a células T CD8 específicas para OVA no mostraron diferencias que hicieran notar la contribución de la incorporación de ligandos activadores de células iNKT a la membrana de ST con respecto a los marcadores analizados (Figuras 21 -24), lo que coincide con lo descrito previamente en cuanto al aporte de la respuesta T CD8 en modelos de ratones infectados con ST (Lee *et al.* 2012).

Por otro lado, la secreción temprana de IFN γ por la activación de las células iNKT es importante en el desarrollo de las infecciones debido a que esta afecta la magnitud de la

respuesta T CD4 en la extensión y durabilidad de la memoria (Lee *et al.* 2012). Los resultados de la multifuncionalidad de las células T CD4 con respecto a la producción de citoquinas mostraron tener una mayor diferencia entre los grupos de ST-OVA con o sin incorporación de glicolípidos (Figuras 26-30). Las mayores diferencias se obtuvieron al re-estimular las células con lisado de ST. Notoriamente, se obtuvieron mayores niveles de citoquinas IL-2 (Figura 28), IL-4 (Figura 29) e IL-17 (Figura 30) en células T CD4+ productoras en el grupo correspondiente a ST-OVA-AH10-7 siendo todas estadísticamente significativas.

Estos resultados muestran que hay una mayor contribución de la respuesta celular en cuanto a las células T CD4 cuando se ocupó el glicolípido AH10-7 en la membrana celular de ST para activar las células iNKT.

En este trabajo se logró realizar la incorporación de ligandos activadores de células iNKT a una bacteria Gram-negativo, hecho no reportado antes en la literatura. Con respecto a los ensayos *in vivo* para analizar la respuesta antígeno-específica de células B, los resultados fueron interesantes al encontrarse que la respuesta humoral provocada por el glicolípido AH10-7 sobre la membrana de ST no generara un título de IgG anti-ST cuantificable mediante ELISA. Este resultado plantea la posibilidad de que la combinación de ST-OVA-AH10-7 provoque, mediante un mecanismo alternativo, la inhibición de la respuesta humoral anti-ST. Cabe destacar que, al analizar la respuesta celular, el porcentaje de células TCD4+ específicas para ST presentaron mayores frecuencias para el grupo de ratones inmunizados con la cepa ST-OVA-AH10-7, dando cuenta de la influencia de la activación de las células iNKT sobre la respuesta T CD4 para la frecuencia de células productoras de IL-2, IL-4 e IL-17.

Estos resultados nos hablan de la complejidad del sistema inmune y de la modulación que genero la incorporación del glicolípido AH10-7 sobre la membrana de la bacteria ST sobre la respuesta humoral y celular antígeno-específica contra ST siendo capaz de inhibir la generación de IgG anti-ST y aumentando la frecuencia de células T CD4 productoras de citoquinas regulatorias.

A futuro, nuevas investigaciones con distintos glicolípidos y bacterias podrían permitir el estudio de nuevos mecanismos de transactivación del sistema inmune mediado por células

iNKT. Estos resultados podrían aplicarse a diversas áreas, desde la ciencia básica y el estudio del sistema inmune, hasta la generación de nuevos sistemas contra patógenos u otras enfermedades que involucren el sistema inmune.

VII. CONCLUSIÓN

La incorporación de ligandos activadores de células iNKT de naturaleza glicolípida como α GC y AH10-7 son capaces de ser incorporados a la membrana celular de la bacteria gram-negativo *Salmonella Typhimurium* (ST) y son capaces de provocar la activación de los hibridomas de células iNKT K2C10 en ensayos *in vitro*.

La incorporación de los glicolípidos a la cepa ST-OVA no afectó la expresión de la proteína ovoalbúmina.

La respuesta B antígeno-específica contra ST mostró influencia de los ligandos activadores de células iNKT en la respuesta humoral anti-IgG al día 21.

La respuesta T CD8 antígeno-específica contra OVA y ST no mostró influencia de los ligandos activadores de células iNKT en la expresión de los marcadores de superficie para memoria y citotoxicidad de las células T CD8 ni en la producción de IFN γ .

La respuesta multifuncional de las células T CD4 antígeno-específica en la producción de citoquinas mostró que la incorporación del glicolípido AH10-7 sobre la membrana celular de ST-OVA generó el aumento en la frecuencia de las células T CD4 productoras de IL-2, IL4 e IL-17 en comparación con la cepa control ST-OVA.

VII. REFERENCIAS

- Amprey, J., Im, J., Turco, S., Murray, H., Illarionov, P., Besra, G., Porcelli, S. y Späth, G. (2004). "A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan." J Exp Med **200**(7): 895-904.
- Arai, T., Hiromatsu, K., Nishimura, H., Kimura, Y., Kobayashi, N., Ishida, H., Nimura, Y. y Yoshikai, Y. (1995). "Effects of in vivo administration of anti-IL-10 monoclonal antibody on the host defence mechanism against murine *Salmonella* infection." Immunology **85**(3): 381-388.
- Arase, H., Arase, N. y Saito, T. (1996). "Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking." J Exp Med **183**(5): 2391-2396.
- Arora, P., Venkataswamy, M., Baena, A., Bricard, G., Li, Q., Veerapen, N., Ndonge, R., Park, J. J., Lee, J. H., Seo, K. C., Howell, A. R., Chang, Y. T., Illarionov, P. A., Besra, G. S., Chung, S. K. y Porcelli, S. A. (2011). "A rapid fluorescence-based assay for classification of iNKT cell activating glycolipids." J Am Chem Soc **133**(14): 5198-5201.
- Bai, L., Deng, S., Reboulet, R., Mathew, R., Teyton, L., Savage, P. B. y Bendelac, A. (2013). "Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides." P Nalt Acad Sci USA **110**(40): 16097-16102.
- Bendelac, A., Savage, P. y Teyton, L. (2007). "The biology of NKT cells." Annu Rev Immunol **25**: 297-336.
- Blanchette, J., Jaramillo, M. y Olivier, M. (2003). "Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation." Immunology **108**(4): 513-522.
- Brennan, P., Tatituri, R., Brigl, M., Kim, E., Tuli, A., Sanderson, J., Gadola, S., Hsu, F., Besra, G. y Brenner, M. (2011). "Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals." Nat Immunol **12**(12): 1202-1211.
- Bricard, G. y Porcelli, S. (2007). "Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity." Cell Mol Life Sci **64**(14): 1824-1840.
- Brigl, M., Bry, L., Kent, S., Gumperz, J. y Brenner, M. (2003). "Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection." Nat Immunol **4**(12): 1230-1237.
- Brown, A. y Hormaeche, C. (1989). "The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA." Microb Pathog **6**(6): 445-454.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S., Beavis, A., Koezuka, Y. y Bendelac, A. (1999). "Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells." J Immunol **163**(9): 4647-4650.

Carreño, L., Kharkwal, S. y Porcelli, S. (2014). "Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants." Immunotherapy **6**(3): 309-320.

Coquet, J., Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F., Pitt, L., McKenzie, B., Berzins, S., Smyth, M. y Godfrey, D. (2008). "Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population." P Nalt Acad Sci USA **105**(32): 11287-11292.

Coward, Chris, Restif, Olivier, Dybowski, Richard, Grant, Andrew J., Maskell, Duncan J. y Mastroeni, Pietro (2014). "The Effects of Vaccination and Immunity on Bacterial Infection Dynamics In Vivo." PLOS Pathogens **10**(9): e1004359.

Darmoise, A., Teneberg, S., Bouzonville, L., Brady, R., Beck, M., Kaufmann, S. y Winau, F. (2010). "Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells." Immunity **33**(2): 216-228.

Dong, H., Tang, X., Zhang, Z. y Dong, C. (2017). "Structural insight into lipopolysaccharide transport from the Gram-negative bacterial inner membrane to the outer membrane." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1862**(11): 1461-1467.

Everest, P., Allen, J., Papakonstantinou, A., Mastroeni, P., Roberts, M. y Dougan, G. (1997). "Salmonella typhimurium infections in mice deficient in interleukin-4 production: role of IL-4 in infection-associated pathology." J Immunol **159**(4): 1820-1827.

Exley, M. A., Bigley, N. J., Cheng, O., Shaulov, A., Tahir, S. M., Carter, Q. L., Garcia, J., Wang, C., Patten, K., Stills, H. F., Alt, F. W., Snapper, S. B. y Balk, S. P. (2003). "Innate immune response to encephalomyocarditis virus infection mediated by CD1d." Immunology **110**(4): 519-526.

Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S. y Schaible, U. (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." P Nalt Acad Sci USA **101**(29): 10685-10690.

Galli, G., Pittoni, P., Tonti, E., Malzone, C., Uematsu, Y., Tortoli, M., Maione, D., Volpini, G., Finco, O., Nuti, S., Tavarini, S., Dellabona, P., Rappuoli, R., Casorati, G. y Abrignani, S. (2007). "Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory." P Nalt Acad Sci USA **104**(10): 3984-3989.

Gapin, L., Matsuda, J., Surh, C. y Kronenberg, M. (2001). "NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d." Nat Immunol **2**(10): 971-978.

Godfrey, D., Hammond, K., Poulton, L., Smyth, M. y Baxter, A. (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." Immunol Today **21**(11): 573-583.

Godfrey, D., Stankovic, S. y Baxter, A. (2010). "Raising the NKT cell family." Nat Immunol **11**: 197.

- Goto, M., Murakawa, M., Kadoshima-Yamaoka, K., Tanaka, Y., Nagahira, K., Fukuda, Y. y Nishimura, T. (2009). "Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22." Cell Immunol **254**(2): 81-84.
- Gulig, P., Doyle, T., Clare-Salzler, M., Maiese, R. y Matsui, H. (1997). "Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- Salmonella typhimurium is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha." Infect Immun **65**(12): 5191-5197.
- Gumperz, J., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S., Cardell, S., Brenner, M. y Behar, S. (2000). "Murine CD1d-Restricted T Cell Recognition of Cellular Lipids." Immunity **12**(2): 211-221.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. y Miller, S. I. (2008). "Salmonellae interplay with host cells." Nat Rev Microbiol **6**(1): 53-66.
- Hogquist, K., Jameson, S., Heath, W., Howard, J., Bevan, M. y Carbone, F. (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." Cell **76**(1): 17-27.
- Holzappel, Keli L., Tyznik, Aaron J., Kronenberg, Mitchell y Hogquist, Kristin A. (2014). "Antigen-dependent versus -independent activation of invariant NKT cells during infection." J Immunol (Baltimore, Md. : 1950) **192**(12): 5490-5498.
- Hotter, G. y Collins, D. (2011). "Mycobacterium bovis lipids: virulence and vaccines." Vet Microbiol **151**(1-2): 91-98.
- Im, J., Arora, P., Bricard, G., Molano, A., Venkataswamy, M., Baine, I., Jerud, E., Goldberg, M., Baena, A., Yu, K., Ndongye, R., Howell, A., Yuan, W., Cresswell, P., Chang, Y., Illarionov, P., Besra, G. y Porcelli, S. (2009). "Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation." Immunity **30**(6): 888-898.
- Im, J., Yu, K., Illarionov, P., LeClair, K., Storey, J., Kennedy, M., Besra, G. y Porcelli, S. (2004). "Direct measurement of antigen binding properties of CD1 proteins using fluorescent lipid probes." J Biol Chem **279**(1): 299-310.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. y Taniguchi, M. (1997). "CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V α 14 NKT Cells by Glycosylceramides." Science **278**(5343): 1626-1629.
- Kinjo, Y., Kitano, N. y Kronenberg, M. (2013). "The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity." J Infect Chemother **19**(4): 560-570.
- Kitamura, H., Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Iwakabe, K., Nakui, M., Yahata, T., Meng, H., Koda, T., Nishimura, S., Kawano, T., Taniguchi, M. y Nishimura, T. (2000). "alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells." Cell Immunol **199**(1): 37-42.
- Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H. y Koezuka, Y. (1995). "KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities." Oncol Res **7**(10-11): 529-534.

Lang, G., Devera, T. y Lang, M. (2008). "Requirement for CD1d expression by B cells to stimulate NKT cell-enhanced antibody production." Blood **111**(4): 2158-2162.

Lang, M. (2018). "The Influence of Invariant Natural Killer T Cells on Humoral Immunity to T-Dependent and -Independent Antigens." Front Immunol **9**: 305.

Lee, S., Dunmire, S. y McSorley, S. (2012). "MHC class-I-restricted CD8 T cells play a protective role during primary Salmonella infection." Immunol Lett **148**(2): 138-143.

Li, X., Fujio, M., Imamura, M., Wu, D., Vasan, S., Wong, C., Ho, D. y Tsuji, M. (2010). "Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant." P Nalt Acad Sci USA **107**(29): 13010-13015.

Mäkelä, P. y Hoemaeche, C. (1997). Host response to intracellular pathogens. Austin, TX, S.H.E Kaufman.

Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B. y Hormaeche, C. (1992). "Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- Salmonella vaccines." Microb Pathog **13**(6): 477-491.

Mattner, J., DeBord, K., Ismail, N., Goff, R., Cantu, C., Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., Hoebe, K., Schneewind, O., Walker, D., Beutler, B., Teyton, L., Savage, P. y Bendelac, A. (2005). "Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections." Nature **434**(7032): 525-529.

Mayer, L. (1991). "Generation of T Cell Hybridomas." Curr Opin Immunol **00**(1): 7.21.21-27.21.29.

Mittrücker, H. y Kaufmann, S. (2000). "Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice." J Leukocyte Biol **67**(4): 457-463.

Mittrucker, H., Raupach, B., Kohler, A. y Kaufmann, S. (2000). "Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection." J Immunol **164**(4): 1648-1652.

Miyamoto, K., Miyake, S. y Yamamura, T. (2001). "A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells." Nature **413**(6855): 531-534.

Nauciel, C. (1990). "Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to Salmonella typhimurium infection." J Immunol **145**(4): 1265-1269.

Nauciel, C. y Espinasse-Maes, F. (1992). "Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection." Infect Immun **60**(2): 450-454.

Osman, Y., Kawamura, T., Naito, T., Takeda, K., Van Kaer, L., Okumura, K. y Abo, T. (2000). "Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide." Eur J Immunol **30**(7): 1919-1928.

- Padte, N., Li, X., Tsuji, M. y Vasan, S. (2011). "Clinical development of a novel CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant." Clin Immunol (Orlando, Fla.) **140**(2): 142-151.
- Paget, C., Mallevaey, T., Speak, A., Torres, D., Fontaine, J., Sheehan, K., Capron, M., Ryffel, B., Faveeuw, C., Leite de Moraes, M., Platt, F. y Trottein, F. (2007). "Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids." Immunity **27**(4): 597-609.
- Parker, D. (1993). "T cell-dependent B cell activation." Annu Rev Immunol **11**: 331-360.
- Pie, S., Truffa-Bachi, P., Pla, M. y Nauciel, C. (1997). "Th1 response in Salmonella typhimurium-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance." Infect Immun **65**(11): 4509-4514.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A. y Finlay, B. (1997). "Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo." J Exp Med **186**(4): 569-580.
- Robertson, F., Berzofsky, J. y Terabe, M. (2014). "NKT cell networks in the regulation of tumor immunity." Fron Immunol **5**: 543-543.
- Rydstrom, A. y Wick, M. (2007). "Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral Salmonella infection." J Immunol **178**(9): 5789-5801.
- Schmieg, J., Yang, G., Franck, R. y Tsuji, M. (2003). "Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide." J Exp Med **198**(11): 1631-1641.
- Shockman, G. y Barrett, J. (1983). "Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria." Annu Rev Microbiol **37**: 501-527.
- Sidobre, S., Naidenko, O., Sim, B., Gascoigne, N., Garcia, K. y Kronenberg, M. (2002). "The V α 14 NKT Cell TCR Exhibits High-Affinity Binding to a Glycolipid/CD1d Complex." J Immunol **169**(3): 1340-1348.
- Silhavy, T., Kahne, D. y Walker, S. (2010). "The bacterial cell envelope." CSH Perspect Biol **2**(5): a000414.
- Simoni, Y., Diana, J., Ghazarian, L., Beaudoin, L. y Lehuen, A. (2013). "Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality?" Clin Dev Immunol **171**(1): 8-19.
- Singh, M., Quispe-Tintaya, W., Chandra, D., Jahangir, A., Venkataswamy, M., Ng, T., Sharma-Kharkwal, S., Carreno, L., Porcelli, S. y Gravekamp, C. (2014). "Direct incorporation of the NKT-cell activator alpha-galactosylceramide into a recombinant Listeria monocytogenes improves breast cancer vaccine efficacy." Br J Cancer **111**(10): 1945-1954.

- Sonoda, K. H., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P. y Stein-Streilein, J. (1999). "CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site." J Exp Med **190**(9): 1215-1226.
- Sullivan, B. y Kronenberg, M. (2005). "Activation or anergy: NKT cells are stunned by alpha-galactosylceramide." J Clin Invest **115**(9): 2328-2329.
- Tobar, J., Carreño, L., Bueno, S., González, P., Mora, J., Quezada, S. y Kalergis, A. (2006). "Virulent &Salmonella enterica&/em> Serovar Typhimurium Evades Adaptive Immunity by Preventing Dendritic Cells from Activating T Cells." Infection and Immunity **74**(11): 6438.
- Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol **13**: 251-276.
- Uchiya, K., Barbieri, M. A., Funato, K., Shah, A. H., Stahl, P. D. y Groisman, E. A. (1999). "A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking." Embo j **18**(14): 3924-3933.
- Uldrich, A., Crowe, N., Kyparissoudis, K., Pellicci, D., Zhan, Y., Lew, A., Bouillet, P., Strasser, A., Smyth, M. y Godfrey, D. (2005). "NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge." J Immunol (Baltimore, Md. : 1950) **175**(5): 3092-3101.
- Van Kaer, L. (2007). "NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions." Curr Opin Immunol **19**(3): 354-364.
- Vassiloyanakopoulos, A. , Okamoto, S. y Fierer, J. (1998). "The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to Salmonella dublin infections in genetically susceptible and resistant mice." P Nalt Acad Sci USA **95**(13): 7676-7681.
- Venkataswamy, M., Baena, A., Goldberg, M., Bricard, G., Im, J., Chan, J., Reddington, F., Besra, G., Jacobs, W. y Porcelli, S. (2009). "Incorporation of NKT cell-activating glycolipids enhances immunogenicity and vaccine efficacy of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin." J Immunol (Baltimore, Md. : 1950) **183**(3): 1644-1656.
- Venkataswamy, M. y Porcelli, S. (2010). "Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells." Semin Immunol **22**(2): 68-78.
- Wen, X., Rao, P., Carreno, L., Kim, S., Lawrenczyk, A., Porcelli, S. A., Cresswell, P. y Yuan, W. (2013). "Human CD1d knock-in mouse model demonstrates potent antitumor potential of human CD1d-restricted invariant natural killer T cells." P Nalt Acad Sci USA **110**(8): 2963-2968.

Yu, K., Im, J., Molano, A., Dutronc, Y., Illarionov, P., Forestier, C., Fujiwara, N., Arias, I., Miyake, S., Yamamura, T., Chang, Y., Besra, G. y Porcelli, S. (2005). "Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides." P Nalt Acad Sci USA **102**(9): 3383-3388.

Yuan, W., Qi, X., Tsang, P., Kang, S., Illarionov, P., Besra, G., Gumperz, J. y Cresswell, P. (2007). "Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules." P Nalt Acad Sci USA **104**(13): 5551-5556.

Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R., Levery, S., Savage, P., Teyton, L. y Bendelac, A. (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." Science **306**(5702): 1786-1789.