

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

Caracterización del Timo como posible reservorio de  
*Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

**T E S I S**

**Que presenta**

Q. F. B. Carlos Samuel Galán Enríquez

**Para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS

**En la especialidad de**

Biomedicina Molecular

**Director de Tesis:**

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

México, D. F.

Agosto 2015

El autor de este trabajo está adscrito al Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y fue apoyado con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante la realización del mismo, con el número de CVU 557229 y con el número de becario 299876.

## Agradecimientos

Primero y más importante a mi familia. Mis padres por compartir sus experiencias conmigo, aconsejarme y apoyarme para alcanzar las metas que me propongo. Mi hermana por todas las alegrías y locuras que compartimos. Mi abuela por enseñarme disciplina, respeto y responsabilidad. A Sandy por impulsarme a tomar este camino, escucharme cuando parecía ser demasiado y compartir sueños juntos.

Segundo a todos los miembros del laboratorio. Al Dr. Vianney Ortiz por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y asesorarme en la realización de este trabajo. A Abraham García por ser un maestro para mí, por todas sus enseñanzas y todo su apoyo, no solo en el ámbito científico. A Benjamín Ortiz López por su apoyo con el manejo de animales de laboratorio y por compartir sus experiencias. A Nonantzin Beristain, Angélica Aponte y María González por asesorarme en el uso del citómetro y ayudarme a resolver mis dudas técnicas y teóricas. A Jessica Leyva por entrenarme para llevar a cabo este proyecto. A Luis Uriel López, Itaietzi Olivar y Antonio Díaz por apoyarme en la realización de este trabajo y ser buenos amigos. A Jesús Guzmán Campuzano por proporcionarme siempre material limpio y mantener el laboratorio aseado.

Tercero, a todos mis amigos (Incluidas personas de la primera y segunda sección). En especial a Omar Romero y Jonatan Benites por todas las alegrías, divagues, apoyo, peleas y muchas cosas que he aprendido con y gracias a ustedes. Y muchos otros más que por espacio no caben en esta sección.

Por último, y ¿Por qué no?, al espíritu galáctico.

# Tabla de contenido

Índice de figuras. ....	I
Abreviaturas. ....	II
Resumen .....	III
Abstract .....	IV
Introducción. ....	1
<i>Salmonella</i> . ....	1
Fisiopatología de <i>Salmonella</i> . ....	2
<i>Salmonella</i> y el estado portador. ....	3
El Timo como blanco de infección. ....	4
El Timo como blanco de infección de <i>Salmonella</i> . ....	5
Justificación. ....	7
Hipótesis. ....	8
Objetivos. ....	9
Objetivo general. ....	9
Objetivos particulares. ....	9
Materiales y métodos. ....	10
Ratones. ....	10
Cepas bacterianas e Infección. ....	10
Infección. ....	10
Tratamiento con antibiótico. ....	11
Obtención de esplenocitos y timocitos. ....	11
Recuperación de UFCs. ....	11
Citometría de flujo. ....	11
Evaluación de emigrantes tímicos recientes. ....	12
Análisis de imagen. ....	12
Análisis Estadístico .....	12
Resultados. ....	13

La bacteria residente en el timo post-tratamiento es capaz de diseminarse a otros órganos. ....	13
Las principales células infectadas en el timo corresponde a células no linfoides.....	14
La infección favorece la generación de Emigrantes Tímicos Recientes pero no afecta la velocidad con la que egresan a periferia. ....	15
Discusión. ....	17
Conclusiones. ....	19
Perspectivas. ....	20
Bibliografía.....	21

## Índice de figuras.

FIGURA 1. LA BACTERIA RESIDENTE EN EL TIMO ES CAPAZ DE REACTIVARSE UNA VEZ RETIRADA LA PRESIÓN DEL ANTIBIÓTICO.....	13
FIGURA 2. LAS PRINCIPALES CÉLULAS INFECTADAS EN EL TIMO SON NO LINFOIDES. ....	14
FIGURA 3. LAS CÉLULAS INFECTADAS EN EL TIMO SON FAGOCÍTICAS Y PRINCIPALMENTE CÉLULAS DENDRÍTICAS. ....	15
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA ELIMINACIÓN DE CADENA DEL TCR $\Delta$ Y LA FORMACIÓN DEL TREC [26]. ....	16
FIGURA 5. LA INFECCIÓN CON SALMONELLA INDUCE UN AUMENTO DE LOS ETR EN EL TIMO PERO NO EN EL BAZO.....	16

## Abreviaturas.

APC: Aloficocianina

Cy 5.5: Cianina 5.5.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

ETR: Emigrantes tímicos recientes.

GFP: Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).

LB: Luria-Bertani.

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Buffer Fosfato Salino (*Phosphate-Buffered Saline*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PE: Ficoeritrina.

TCR: Receptor de linfocitos T (*T-cell receptor*).

TCR $\alpha$ : Cadena  $\alpha$  del TCR.

TCR $\delta$ : Cadena  $\delta$  del TCR.

UFCs: Unidades Formadoras de Colonia.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

## Resumen

El timo es un blanco de infección de *Salmonella Typhimurium*, se ha demostrado que la presencia de la bacteria, en este órgano, es capaz de inducir la maduración de los timocitos dobles positivos y de modificar el repertorio del receptor de linfocitos T; además se ha observado que un esquema de tratamiento con ciprofloxacino a largo plazo es capaz de eliminar a la bacteria presente en el bazo pero no así a la residente en el timo. En este trabajo se demostró que las principales células infectadas del timo son las células fagocíticas: células dendríticas, neutrófilos y macrófagos, siendo las células dendríticas las principalmente afectadas. Además se encontró que la infección aumenta los niveles de emigrantes tímicos recientes en el timo pero no así en el bazo, sugiriendo una mayor maduración de linfocitos T sin que se vea afectada la velocidad con la que egresan del timo. Por otra parte, se demostró que la bacteria residente en el timo es capaz de diseminarse una vez es retirada la presión del antibiótico, lo que nos permite proponer que la bacteria resistente en el timo es una población persistente y utiliza al timo como reservorio.

## Abstract

Thymus is a target organ of infection by *Salmonella* serovar Typhimurium. It has been shown that *Salmonella* induces double positive thymocytes maturation and modifies t cell receptor repertoire. Furthermore it has been shown that a long-term treatment with ciprofloxacin clears the bacteria from spleen but not from thymus. In this work we show that the cell population infected in thymus is phagocytic cells: dendritic cells, neutrophils and macrophages from which dendritic cells are the most affected. Also we found that the infection induces an increment of recent thymic emigrants on the thymus but not in the spleen. This suggests an increment on T cell maturation without affecting their rate of egress from thymus. Importantly we show that thymic resident bacteria spreads once antibiotic pressure is removed, this allows us to propose that antibiotic resistant bacteria is a persistent population and uses thymus as reservoir.

## Introducción.

### *Salmonella*.

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo, intracelular, de 0.7 a 1.5µm de diámetro y de 2 a 5µm de longitud, con la capacidad de infectar un amplio rango de animales [1, 2].

El género *Salmonella* está conformado por la especie *enterica* y la especie *bongori*. *Salmonella enterica* se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) [3]. La subespecie *enterica* infecta principalmente a animales de sangre caliente, mientras que las otras 5 subespecies se encuentran asociadas principalmente a animales de sangre fría como anfibios y reptiles [2, 4]. Con base a los antígenos de superficie O (antígeno somático) y H (antígeno flagelar) las bacterias del género *Salmonella* pueden clasificarse en serotipos o serovares. La OMS en el 2007 reportó la existencia de 2579 serovares, de los cuales 2557 pertenecen al género *enterica* y de estos, 1531 corresponden a la sub especie *enterica* [1-5]. Los serovares pertenecientes a esta subespecie, cobran mayor importancia al ser los que infectan principalmente al hombre.

Dentro de los serovares que se encuentran en la subespecie *enterica* se encuentran los serovares Typhoide, cuyo único hospedero es el ser humano y tienen la capacidad de generar una infección sistémica, mejor conocida como fiebre tifoidea. Los serovares Typhoide incluyen al serovar Typhi y al serovar Paratyphi [1, 6]. El resto de los serovares de la subespecie *enterica* se nombran serovares no Typhoide y se caracterizan por su capacidad de infectar tanto al hombre como a otros animales, en el humano son agentes causales de gastroenteritis auto limitante. Los serovares no Typhoides más representativos son el serovar Typhimurium y el serovar Enteritidis [6].

## Fisiopatología de *Salmonella*.

*Salmonella* se adquiere principalmente por la ingestión de agua y/o alimentos contaminados, sin embargo se ha asociado que algunos serovares, principalmente de subespecies no *entericas*, pueden ser adquiridos por la exposición a anfibios o reptiles. A nivel global se han estimado más de 21.5 millones de casos al año de fiebre tifoidea con 216000 muertes aproximadas registradas anualmente. Mientras que para fiebres paratifoideas se han calculado cerca de 5.5 millones de casos anuales en el mundo [7]. En el caso de gastroenteritis causado por otras *Salmonellas* se han estimado 93.8 millones de casos anuales, de los cuales aproximadamente 80 millones fueron resultado ingerir comida contaminada, con 155000 muertes anuales [8].

Según datos de la dirección general de epidemiología de México, hasta la semana 14 del año 2015 se presentaron 11174 casos de fiebre tifoidea, 3036 casos de fiebre paratifoidea y 16531 casos de otras salmonelosis.

Debido a que *Salmonella* serovar Typhi solo infecta humanos, para el estudio de las interacciones huésped – patógeno se ha utilizado como modelo experimental la infección de ratones de cepas susceptibles (ej. BALB/C y C57/BL6) con *Salmonella* serovar Typhimurium ya que la evolución de la enfermedad y la respuesta inflamatoria son similares a la fiebre tifoidea [5]. La susceptibilidad a la infección por *Salmonella* se debe a la deficiencia de alelos funcionales del gen *Nramp1* que codifica para un transportador de iones divalente expresado principalmente en macrófagos y células dendríticas[9, 10].

Una vez *Salmonella* es ingerida en alimentos contaminados, ésta llega al estómago, donde sobrevive al pH ácido y continua su trayecto hacia el intestino delgado donde logra llegar al epitelio intestinal [6]. El principal sitio por el que la bacteria entra al organismo es el ileon distal, a través de epitelio asociado a folículo que se encuentra sobre las placas de Peyer. Aquí la bacteria atraviesa la barrera epitelial por medio de transcitosis de células M, sin embargo existen otros

mecanismos por los cuales *Salmonella* puede atravesar la barrera epitelial como es la inducción de su macropinocitosis por células no fagocíticas (proceso conocido como *ruffling*) y a través de su captura por células dendríticas que extienden sus dendritas a través de las uniones estrechas de las células epiteliales hacia el lumen intestinal [6, 11]. Tras la entrada de la bacteria, esta puede ser transportada vía linfa o sanguínea por las células dendríticas o fagocitos CD18<sup>+</sup> a los ganglios linfáticos mesentéricos y posteriormente a otros órganos (Bazo, hígado, médula ósea y timo)[1, 12, 13].

### *Salmonella* y el estado portador.

Durante la infección sistémica generada por las *Salmonella* Typhoide en el hombre, la bacteria puede alcanzar la vesícula biliar a través del hígado y de esta manera generar colecistitis o una inflamación crónica.[10] Entre el 1 y el 6% de pacientes que padecieron fiebre tifoidea se convierten en portadores crónicos de *S. Typhi* siendo el principal órgano portador la vesícula biliar.[10, 14, 15] Los portadores son por lo general asintomáticos y puede excretar la bacteria en heces de manera intermitente.[10, 16]. Debido a que *S. Typhi* es una bacteria especie específica, los portadores crónicos representan un reservorio que permite a la bacteria diseminarse entre individuos.

Se ha observado una correlación entre el estado portador y la presencia de cálculos biliares, entre el 80 y el 90% de personas portadoras de *Salmonella* presentan colelitiasis. La capacidad de la bacteria de formar *biofilms* sobre los litos de colesterol se ha demostrado es el mecanismo mediante el cual establece la infección crónica en la vesícula biliar. La separación de la bacteria del *biofilm* le permite pasar al intestino y ser excretada en las heces [17]. Además de la formación de *biofilms* en la vesícula se ha descrito que las células epiteliales de este órgano pueden ser infectadas por *Salmonella* por lo que otro mecanismo

posible para la salida del patógeno de la vesícula biliar es a través de la extrusión de células epiteliales infectadas [18].

El Timo como blanco de infección.

El timo es uno de los órganos linfoides primarios, responsable de la maduración de los linfocitos T a partir de los precursores tímicos tempranos que se originan en la médula ósea. En condiciones normales los timocitos inmaduros o dobles negativos (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) se ubican en la corteza tímica, donde empiezan su maduración hacia timocitos dobles positivos (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) que han re-arreglado las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR. Una vez se expresa el TCR, los linfocitos que reconocen el MHC cargado con péptidos propios con alta afinidad son eliminados por apoptosis, proceso conocido como selección negativa, y aquellos linfocitos con TCR que reconocen al MHC con muy baja afinidad sufren muerte por negligencia. Solo aquellos linfocitos con un TCR que reconoce con mediana afinidad al MHC son seleccionados positivamente y migran hacia la médula tímica para continuar su maduración hacia linfocitos comprometidos con linaje CD4 o CD8 [19-23].

El timo se atrofia de manera natural por el envejecimiento, sin embargo infecciones agudas o crónicas causadas por virus (VIH), protozoarios (*T. cruzi*), hongos (*H. capsulatum*) y bacterias (*L. monocytogenes*) pueden llegar a causar también la atrofia de este órgano [23]. El mecanismo preciso responsable de la atrofia puede variar de acuerdo con el agente causal de la infección, dentro de los cuales se encuentra la atrofia causada directamente por el patógeno debido a un aumento de especies reactivas de oxígeno, aumento en los niveles de glucocorticoides, atrofia mediada por citocinas inflamatorias entre otros [19, 23].

## El Timo como blanco de infección de *Salmonella*.

La atrofia tímica se manifiesta principalmente como una disminución del número de células totales del timo y siendo mayormente afectados los timocitos doble positivos [23]. Se ha demostrado que la infección sistémica de *Salmonella* serovar Typhimurium en ratón provoca reducción del tamaño del timo debido a una disminución de todas las subpoblaciones de timocitos, en mayor proporción de la población doble positiva [22, 24]. Específicamente, en la atrofia causada por *Salmonella* de cepas virulentas, el mecanismo por el cual el número de células se ve disminuido es la apoptosis mediada por un aumento de glucocorticoides y de la citocina pro-inflamatoria IFN- $\gamma$  que llevan al daño mitocondrial de los timocitos dobles positivos y finalmente a la apoptosis [19].

En el caso de cepas atenuadas de *Salmonella* se ha demostrado que la atrofia del timo es reversible, recobrándose los niveles celulares de todas las poblaciones de timocitos, esto gracias al aumento de precursores tímicos tempranos reclutados y a su proliferación una vez han arribado al timo [22].

Aunque el fenómeno principal que conduce a la atrofia del timo es la muerte por apoptosis de los timocitos, también se ha demostrado que existe un arresto en la proliferación de todas las subpoblaciones de linfocitos. A pesar de la disminución de la población doble positiva, existe un incremento en las poblaciones simples positivas CD4 y CD8 debido a que la infección con *Salmonella* induce a los timocitos a pasar por la selección positiva y además sesga el uso de ciertos segmentos V (Variable) en la cadena  $\beta$  del TCR [13]. Queda por determinar si los linfocitos T que presentan en su TCR estos segmentos V $\beta$  confieren alguna ventaja en contra de *Salmonella* o pueden representar una posible fuente de clonas autorreactivas.

Ante la infección con *Salmonella* serovar Typhimurium de cepas virulentas (ATCC 14028), el tratamiento con antibiótico (ciprofloxacino) es capaz de revertir la atrofia del timo, normalizando los porcentajes de timocitos y revirtiendo el sesgo inducido

de ciertas regiones V $\beta$ . De manera interesante, el tratamiento con ciprofloxacino intraperitoneal de 50 $\mu$ g, seguido de un tratamiento a largo plazo (1mg/mL en el agua que bebían los animales) hasta los 30 días post infección es capaz de eliminar a la bacteria del bazo, pero no así del timo [13]. En base a estos resultados es posible que el timo pueda estar actuando como un reservorio de *Salmonella* y condicionando a un estado de portador.

## Justificación.

Dado que la Salmonella enterica serovar Typhi es el agente causal de la fiebre tifoidea y que el humano es el único reservorio conocido. Es de vital importancia el conocer los mecanismos que le permiten establecer persistencia dentro del organismo. Haciendo uso del modelo de infección sistémica de Salmonella Typhimurium en ratones es posible reproducir una enfermedad similar a la fiebre tifoidea, lo que permite hacer aproximaciones a lo que ocurre en los humanos.

Se ha podido determinar que la vesícula biliar actúa como órgano reservorio de Salmonella Typhi, sin embargo en pacientes colecistectomizados se ha observado que permanece el estado portador, por lo que deben existir otros órganos reservorios donde persiste la infección.

## Hipótesis.

El timo es un órgano reservorio de *Salmonella* serovar Typhimurium en ratones.

## Objetivos

### Objetivo general.

Determinar si el timo puede funcionar como órgano reservorio de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en ratones de la cepa C57BL/6.

### Objetivos particulares.

1. Determinar la capacidad de diseminación de *S. Typhimurium* residente en timo.
2. Determinar los blancos celulares de infección en el Timo.
3. Determinar el efecto de la infección con *S. Typhimurium* sobre el egreso de emigrante tímicos recientes.

## Materiales y métodos.

### Ratones.

Se utilizaron ratones de la cepa C57/Bl6 hembras de 6 a 8 semanas de edad obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional (CINVESTAV-IPN)..

### Cepas bacterianas e Infección.

Se utilizó la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028, la cual posee el plásmido pEM180 que expresa la proteína verde fluorescente (eGFP). Para la infección de los ratones, se creció a la bacteria en medio LB (Luria-Bertani) líquido (Sigma-Aldrich) suplementado con ampicilina (100µg/mL). Se cultivó la bacteria toda la noche a 37°C con agitación a 1200 rpm y al día siguiente se realizó una dilución 1:30 con medio LB fresco suplementado con ampicilina y el cultivo se continuó hasta una densidad óptica de 0.6 a 600nm. A partir del cultivo a densidad óptica 0.6 se realizaron las diluciones para las diferentes dosis de infección.

### Infección

Ratones de la cepa C57/Bl6 se infectaron vía intraperitoneal con 500 unidades formadoras de colonia (UFCs) en 0.1mL de PBS (Buffer de Fosfatos Salino).

## Tratamiento con antibiótico.

Los ratones infectados fueron tratados con 50µg de Ciprofloxacino (Ciproxina, Bayer.) vía intraperitoneal (IP) a los 5 días post infección (dpi) y se les mantuvo con Ciprofloxacino 1mg/mL en el agua para beber hasta el día 30 post infección.

## Obtención de esplenocitos y timocitos.

Para obtener las células de timo y bazo se sacrificó a los ratones por dislocación cervical, los órganos se extrajeron y se disgregaron mecánicamente hasta obtener una suspensión celular en PBS. Se lisó a los eritrocitos con NH<sub>4</sub>Cl (150mM) (JT Baker) y se realizó el conteo celular con Azul de Tripano al 0.5% (BioWest) en el contador automático de BioRad TC10.

## Recuperación de UFCs.

Las UFCs se recuperaron del total de las células obtenidas de los órganos. La suspensión celular se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos y el botón se resuspendió en 2 mL de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 2% en PBS. Del lisado obtenido se sembraron 200 y 20uL en cajas de LB Agar (Sigma-Aldrich).

## Citometría de flujo.

Las células del timo de ratones infectados se trataron previo a la tinción con  $\gamma$ -globulinas (Beriglobina P, CSI Behring) 10µg/mL por cada 10<sup>6</sup> células. Para la tinción se utilizaron anticuerpos  $\alpha$ CD4-PE Alexa610 (Invitrogen),  $\alpha$ CD8-APC Cy5.5 (Biolegend),  $\alpha$ CD11b-PE Cy7,  $\alpha$ CD11c-APC,  $\alpha$ Gr1-Alexa 700 (BD Pharmingen),  $\alpha$ F4/80-Biotina (Serotech) y  $\alpha$ DEC205-APC (eBioscience). Una vez teñidas las

células, éstas se fijaron con paraformaldehído al 2% y se analizaron en el citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter) o BD LSRFortessa (BD Bioscience). Los datos obtenidos se analizaron con el software Flow Jo X (FlowJo, LLC.)

#### Evaluación de emigrantes tímicos recientes.

10<sup>6</sup> células de timo o de bazo se trataron con 100µg/mL de Proteínasa K (Promega), con el DNA obtenido se realizó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers que amplifican la región de señal de unión que se encuentra en el círculo de escisión de receptor del TCR (TREC). Los primers usados son: Sentido CCAAGCTGACGGCAGGTTT y Antisentido AGCATGGCAAGCAGCAGCACC.

#### Análisis de imagen.

Para obtener la densidad de píxeles las imágenes de electroforesis en gel de agarosa se analizaron utilizando el software Image J (NIH).

#### Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

## Resultados.

La bacteria residente en el timo post-tratamiento es capaz de diseminarse a otros órganos.

Dado que se ha observado que en ratones que recibieron tratamiento hasta 30 post infección se ha logrado recuperar bacteria viable en el timo [13], se buscó evaluar si una vez retirado el tratamiento, esta bacteria remanente en el timo era capaz de diseminarse nuevamente o permanecer solamente en el órgano. Para esto se infectó a ratones de la cepa C57/Bl6 y al día 5 post infección se inició el esquema de tratamiento con ciprofloxacino, como se describe en materiales y métodos. Una vez llegado el día 30 post infección se finalizó el tratamiento y se mantuvo a los ratones sin antibiótico. 5 días después de retirar el tratamiento se sacrificó a los ratones y se recuperaron UFCs de bazo y timo.

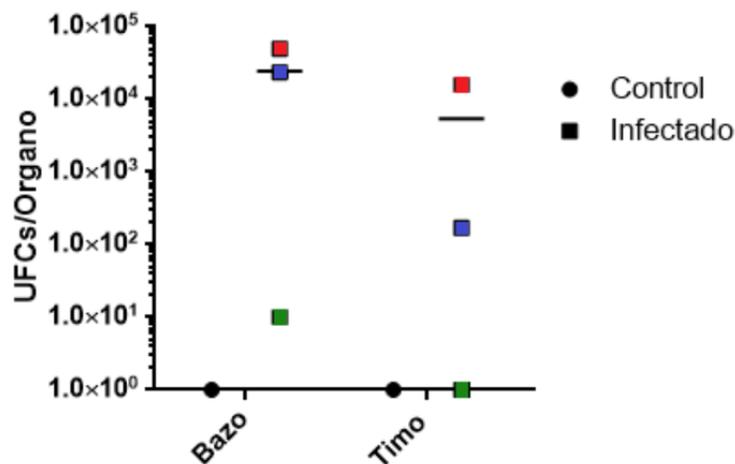


Figura 1. La bacteria residente en el timo es capaz de reactivarse una vez retirada la presión del antibiótico.

En la figura 1 se grafican tres experimentos, indicados por colores diferentes. donde se observan diferencias de hasta 3 logaritmos en el número de UFC

recuperadas de los ratones infectados, a pesar de que se trata de ratones singénicos, se observó que existe variabilidad en cuanto a la magnitud de la infección. Como se esperaba, logró recuperarse bacteria del timo, sin embargo se recuperó un mayor número de UFC en el bazo, lo cual demuestra que la bacteria que se encontraba en el timo fue capaz de diseminarse y colonizar otros órganos, en este caso el bazo.

Las principales células infectadas en el timo corresponde a células no linfoides.

Aunque ya se había determinado previamente que la bacteria era capaz de persistir en el timo aun cuando estaba presente el antibiótico [13]. Por esta razón se buscó determinar cuáles podrían ser las células que son infectadas por *Salmonella* en el timo. Se evaluó por citometría de flujo la población celular infectada, denotada como GFP<sup>+</sup>. Se observó que la población infectada correspondía a la población no linfoide (analizada por tamaño y complejidad) y que dentro de esta población las principales células infectadas corresponden a células dendríticas, seguido de neutrófilos y finalmente macrófagos.

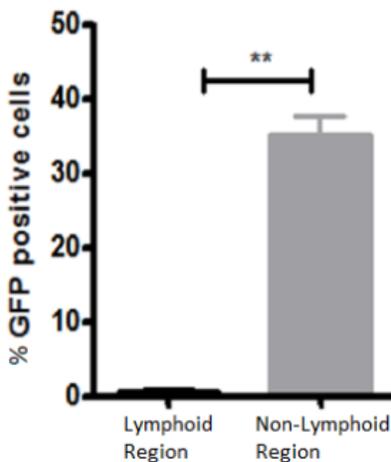


Figura 2. Las principales células infectadas en el timo son no linfoides.

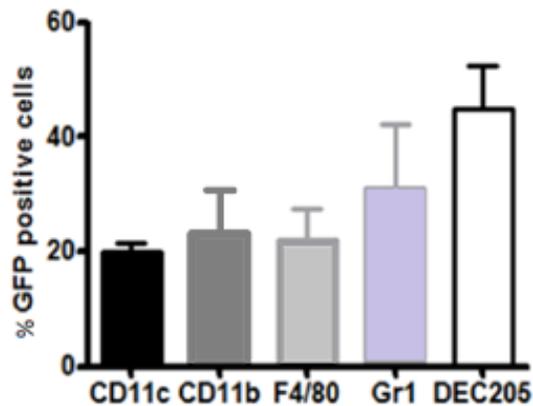


Figura 3. Las células infectadas en el timo son fagocíticas y principalmente células dendríticas.

La infección favorece la generación de Emigrantes Tímicos Recientes pero no afecta la velocidad con la que egresan a periferia.

Considerando que durante la infección con *Salmonella Typhimurium* se favorece la selección positiva y la maduración de los timocitos dobles positivos hacia su estadio más diferenciado de simples positivos CD4 o CD8, se planteó el determinar si estas nuevas clonas estaban saliendo del timo, por lo tanto se evaluó la presencia de Emigrantes Tímicos Recientes en este órgano y en el bazo.

Los emigrantes tímicos recientes (ETR) son la población de linfocitos T que han completado el desarrollo intratímico recientemente y están listos para egresar. Estas células contienen un segmento de DNA circular extracromosómico producto del rearreglo de la cadena  $\alpha$  del TCR. El número de emigrantes tímicos recientes puede ser estimado mediante PCR usando cebadores específicos que reconocen el círculo de escisión en el que se elimina el gen de la cadena  $\delta$  del TCR [25].

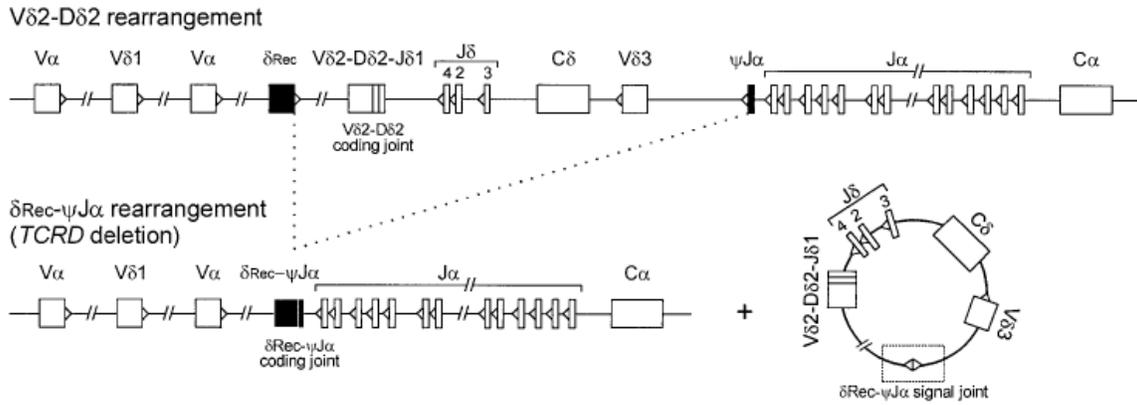


Figura 4. Esquema de la eliminación de cadena del TCRδ y la formación del TREC [26].

Evaluado de manera cualitativa, se encontró que a los 5 días post infección existe un incremento de los ETR en el timo, lo que apoya la observación de que la infección por *Salmonella* induce la maduración de los timocitos dobles positivos [13]. Sin embargo al evaluar el nivel de ETR en el bazo, no se encontró ninguna diferencia entre control y ratones infectados. Lo que sugiere que, si bien, ante la infección existe un aumento de la generación de linfocitos T maduros en el timo, estos salen a periferia en la misma magnitud que en condiciones normales.

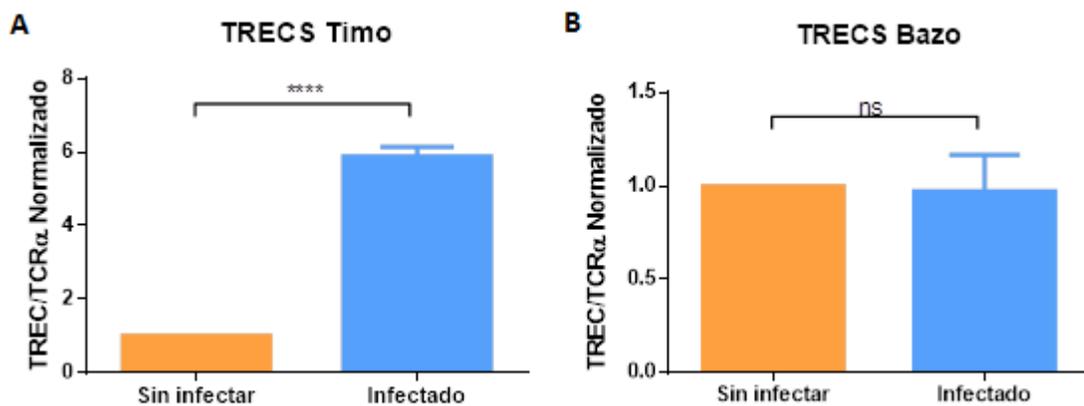


Figura 5. La infección con *Salmonella* induce un aumento de los ETR en el timo pero no en el bazo.

## Discusión.

*La Salmonella* es capaz de diseminarse a múltiples órganos una vez establece la enfermedad sistémica como es el bazo, el hígado y la vesícula biliar [6]. Nuestro grupo demostró que tanto la médula ósea y el timo son blancos de infección de salmonella [12]. Aun cuando se determinó al timo como blanco, permanecía desconocido si los timocitos, siendo la población mayoritaria en el timo, eran las principales células infectadas o la bacteria se encontraba infectando otra población. En este caso se demostró que los timocitos no son las células infectadas, sino que las células fagocíticas son las que contienen principalmente a la bacteria, y dentro de este grupo, son las células dendríticas la principal población celular afectada. Dado que se evaluó a las células dendríticas con el marcador DEC205 y CD11c se esperaba encontrar porcentajes de infección similares entre ambas poblaciones, sin embargo se observa un aumento en el porcentaje de células DEC205<sup>+</sup> con respecto a las CD11c<sup>+</sup>, lo que sugiere que además de las dendríticas otra población DEC205<sup>+</sup> puede estar albergando también a la bacteria, la principal población candidata es la población de células epiteliales. Aun con estos datos permanece desconocido si la bacteria es capaz de infectar a las células epiteliales y si además puede infectar de manera selectiva a las células epiteliales corticales o a las células epiteliales medulares. Sin embargo dado que la *Salmonella* es capaz de inducir su propia entrada en células epiteliales intestinas, es probable que pueda ingresar a las células epiteliales tímicas de la misma manera. Dado que las células encargadas de la selección positiva son las células epiteliales, el hecho de que este grupo celular este infectado permite plantear que se presenten antígenos de *Salmonella* como propios, lo cual favorecería la eliminación de clonas de linfocitos T reactivas contra el patógeno por selección negativa. Otra posibilidad es que la bacteria, modifique de alguna manera los péptidos que son presentados en el timo y permita la selección positiva de clonas autorreactivas.

En cuanto a la habilidad de la bacteria para mantenerse en el timo durante el tratamiento, y su capacidad de diseminación una vez que la presión del antibiótico desapareció, es posible que la bacteria capaz de mantenerse en el órgano pueda hacerlo gracias a que se encuentra de manera intracelular. También puede deberse a la existencia de una población bacteriana metabólicamente inactiva, pero que es viable, conocida como persistente [27].

Los niveles de ETR observados en timo, apoyan la idea de un aumento de la selección positiva en el timo ante la infección [13]. Ya que se genera una mayor cantidad de linfocitos T maduros simple positivos CD4 o CD8. Sin embargo, a pesar de este aumento en la maduración de los timocitos, y dado que no se observó un aumento en los niveles de ETR en periferia (bazo), es posible que el egreso de estas nuevas clonas a la periferia sea de la misma magnitud que la de un ratón normal. Lo cual sugiere un mecanismo de regulación mediante el cual se mantienen los niveles de ETR en periferia a pesar del aumento en la maduración de los timocitos en el timo.

## Conclusiones.

- La bacteria residente en el timo que resiste al antibiótico, una vez que desaparece la presión es capaz de reactivarse y por lo tanto puede establecer nuevamente la infección sistémica. Por lo tanto el timo estaría actuando como un reservorio de *Salmonella*.
- Las principales células que contienen *Salmonella* en el timo, son células de estirpe no linfoide y de características fagocíticas, siendo la principal población afectada las células dendríticas.
- Los ETR aumentan aproximadamente 6 veces en el Timo, sin embargo estos no se ven afectados en el bazo. Por lo tanto hay una generación de linfocitos T maduros elevada sin embargo su egreso a periferia no se ve afectado. Es probable que exista un mecanismo que mantenga un equilibrio en los niveles de ETR en periferia.

## Perspectivas.

- Permanece por ser determinado si las células epiteliales tímicas son infectadas por *Salmonella* y si existe una infección preferenciada hacia células epiteliales de la corteza o de la médula tímica.
- El aumento de la maduración de linfocitos T, así como el sesgo del repertorio V $\beta$  [13]. Sugieren la aparición en periferia de clonas incompetentes para reconocer antígenos de *Salmonella* o clonas autorreactivas capaces de despertar una autoinmunidad. Por lo tanto se necesita aclarar la actividad que puedan tener estas nuevas clonas de linfocitos T.

## Bibliografía.

1. Fàbrega, A. and J. Vila, *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013. **26**(2): p. 308-341.
2. Bäumler, A. and F.C. Fang, *Host Specificity of Bacterial Pathogens*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. **3**(12).
3. Grimont, P. and F.X. Weill, *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, P. Intitute., Editor. 2007, World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella: Paris, France.
4. Brenner, F.W., et al., *Salmonella Nomenclature*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000. **38**(7): p. 2465-2467.
5. de Jong, H.K., et al., *Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(10): p. e1002933.
6. Haraga, A., M.B. Ohlson, and S.I. Miller, *Salmonellae interplay with host cells*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(1): p. 53-66.
7. Crump, J.A., S.P. Luby, and E.D. Mintz, *The global burden of typhoid fever*. *Bull World Health Organ*, 2004. **82**(5): p. 346-53.
8. Majowicz, S.E., et al., *The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis*. *Clin Infect Dis*, 2010. **50**(6): p. 882-9.
9. Monack, D.M., *Helicobacter and salmonella persistent infection strategies*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(12): p. a010348.
10. Gonzalez-Escobedo, G., K.M. La Perle, and J.S. Gunn, *Histopathological analysis of Salmonella chronic carriage in the mouse hepatopancreatobiliary system*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e84058.
11. Tam, M.A., et al., *Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more*. *Immunol Rev*, 2008. **225**: p. 140-62.
12. Castro-Eguiluz, D., et al., *B cell precursors are targets for Salmonella infection*. *Microb Pathog*, 2009. **47**(1): p. 52-6.
13. Leyva-Rangel, J.P., et al., *Bacterial clearance reverses a skewed T-cell repertoire induced by Salmonella infection*. *Immunity, Inflammation and Disease.*, 2015.
14. Levine, M.M., R.E. Black, and C. Lanata, *Precise estimation of the numbers of chronic carriers of Salmonella typhi in Santiago, Chile, an endemic area*. *J Infect Dis*, 1982. **146**(6): p. 724-6.
15. Monack, D.M., A. Mueller, and S. Falkow, *Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system*. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(9): p. 747-65.
16. Merselis, J.G., Jr., et al., *Quantitative Bacteriology of the Typhoid Carrier State*. *Am J Trop Med Hyg*, 1964. **13**: p. 425-9.
17. Crawford, R.W., et al., *Gallstones play a significant role in Salmonella spp. gallbladder colonization and carriage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4353-8.
18. Knodler, L.A., et al., *Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(41): p. 17733-8.
19. Deobagkar-Lele, M., et al., *Interferon-gamma- and glucocorticoid-mediated pathways synergize to enhance death of CD4(+) CD8(+) thymocytes during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection*. *Immunology*, 2013. **138**(4): p. 307-21.

20. Dzhagalov, I. and H. Phee, *How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(5): p. 663-82.
21. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
22. Ross, E.A., et al., *Thymic function is maintained during Salmonella-induced atrophy and recovery*. J Immunol, 2012. **189**(9): p. 4266-74.
23. Savino, W., *The thymus is a common target organ in infectious diseases*. PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e62.
24. Patil, V., et al., *Peptidase N encoded by Salmonella enterica serovar Typhimurium modulates systemic infection in mice*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **51**(2): p. 431-42.
25. Broers, A.E., et al., *Quantification of newly developed T cells in mice by real-time quantitative PCR of T-cell receptor rearrangement excision circles*. Exp Hematol, 2002. **30**(7): p. 745-50.
26. Hazenberg, M.D., et al., *T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation*. J Mol Med (Berl), 2001. **79**(11): p. 631-40.
27. Helaine, S., et al., *Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3746-51.