

Comunicación breve

Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella*.

Carolina del Carmen Murúa-López, María González-Orozco, Héctor Samuel López-Moreno

Laboratorio de Biomedicina Molecular, Doctorado en Biotecnología y Posgrado en Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, México

Introducción. La función inmunológica de las células dendríticas plasmacitoides durante las infecciones bacterianas, como la de *Salmonella* spp., es poco conocida. En ese contexto, se analizó su función efectora para presentar antígenos de *Salmonella* Typhimurium ante linfocitos T citotóxicos.

Objetivo. Analizar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella* evocada por las células dendríticas plasmacitoides.

Materiales y métodos. Se usaron células dendríticas plasmacitoides marcadas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína, pulsadas con el epítipo de *Salmonella* OmpC73 K^b-restringido o infectadas con *S. Typhimurium* como blanco en ensayos de citotoxicidad.

Resultados. La lisis específica tuvo significación estadística usando células dendríticas plasmacitoides positivas pulsadas con OmpC73 en todas las relaciones de células efectoras y blanco (E:B) ($p \leq 0,05$); en cuanto a las células dendríticas plasmacitoides positivas para *S. Typhimurium*, solo se observó significación estadística en la relación de 1:100 ($p \leq 0,05$) usando las células efectoras OmpC73.

Conclusión. Las células dendríticas plasmacitoides pueden evocar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos durante la infección con *S. Typhimurium*.

Palabras clave: células dendríticas; linfocitos T citotóxicos, *Salmonella*; citotoxicidad inmunológica, epítipos.

The plasmacytoid dendritic cells evoke *Salmonella*-specific CTL effector response.

Introduction: The immunological role of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in bacterial infections such as *Salmonella* has been poorly documented. Therefore, we analyzed the effector function of these cells by presenting cytotoxic T lymphocytes (CTL) with *Salmonella* Typhimurium antigens.

Objective: To analyze the *Salmonella*-specific CTL response evoked by pDCs.

Materials and methods: We used plasmacytoid dendritic cells stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and pulsed with OmpC73, *Salmonella* K^b-restricted epitopes or *S. Typhimurium* as targets for cytotoxicity assays.

Results: Specific lysis was shown to be statistically significant in pDC + OmpC73 for all effector:target ratios ($p \leq 0.05$). For pDC + *S. Typhimurium*, statistical significance was only observed at a 1:100 ratio ($p \leq 0.05$) using OmpC73.

Conclusion: Plasmacytoid dendritic cells evoke CTL response during *S. Typhimurium* infection.

Keywords: Dendritic cells; T-lymphocytes, cytotoxic; *Salmonella*; cytotoxicity, immunologic; epitopes.

Salmonella enterica serovar Typhi es una bacteria Gram negativa intracelular que afecta exclusivamente al ser humano con una enfermedad sistémica denominada fiebre tifoidea (1).

En ratones de la cepa C57BL/6, la infección con *S. Typhimurium* ocasiona un cuadro clínico muy similar al de la fiebre tifoidea del ser humano, por lo que se utilizan como el modelo estándar para el estudio de diferentes aspectos inmunitarios de esta enfermedad (2-5).

En estos ratones se identificó un epítipo restringido para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) múrido K^b, derivado de la proteína de la membrana externa OmpC (*Outer membrane porin C*) y denominado OmpC73 (correspondiente al péptido 73-TRVAFAGL), el cual es capaz de evocar la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos cuando es presentado por macrófagos (6).

Recibido: 09/02/18
Aceptado: 01/11/18
Publicado: 12/12/18

Citación:

Murúa-López C del C, González-Orozco M, López-Moreno HS. Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella*. Biomédica. 2019;39(Supl.2):172-81.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4349>

Correspondencia:

Héctor Samuel López-Moreno, Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Avenida Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 80010, Culiacán, Sinaloa, México
Teléfono: 01-52-667-7137860
hslmoreno@uas.edu.mx

Contribución de los autores:

Carolina del Carmen Murúa-López y María González-Orozco: desarrollo de las metodologías
Héctor Samuel López-Moreno: diseño, planeación y coordinación del estudio
Todos los autores participaron en el análisis de los resultados, así como en la escritura y revisión crítica del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (CB2008 #107050).

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

La participación crítica de los linfocitos T citotóxicos en la infección por *Salmonella* spp. quedó demostrada al emplear ratones *knock-out* de la β -2 microglobulina, los cuales desarrollaron una sensibilidad exacerbada a las cepas atenuadas de *Salmonella* spp. comparados con los controles. Además, los ratones *knock-out* sobrevivientes de una infección primaria con una cepa virulenta de *Salmonella* spp. presentaron una disminución de la respuesta inmunológica (4).

En varios estudios ya se ha reportado la participación de los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas convencionales en la relación entre el huésped y *Salmonella* spp. (7-9). Sin embargo, aún no se ha reportado la participación de las células dendríticas plasmacitoides en la respuesta inmunológica evocada contra *Salmonella* spp., incluido el modelo de la fiebre tifoidea.

Las células dendríticas plasmacitoides tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de interferón de tipo I después de su activación como respuesta a los virus (10-12). Además, cambian su morfología y sobreexpresan el (CMH), así como moléculas estimuladoras de CD80 y CD86, permitiéndoles desarrollar la función efectora de la célula presentadora de antígeno tanto para los linfocitos T CD4⁺ como los T CD8⁺ (12,13).

En este contexto, se inició el estudio *in vitro* de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella* evocada por las células dendríticas plasmacitoides, para ser analizada posteriormente *in vivo* y contribuir a dilucidar los mecanismos inmunitarios protectores contra la fiebre tifoidea, enfermedad que sigue afectando a millones de personas en el mundo (1).

Materiales y métodos

Ratones

Se emplearon ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6, cuyo CMH es el haplotipo H-2^b. Los ratones se mantuvieron en cajas especiales con agua *ad libitum* y alimento estéril, siguiendo todos los protocolos aplicables a estudios con animales. Los procedimientos fueron avalados por el comité de ética local de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Purificación de las células dendríticas plasmacitoides

Las células dendríticas plasmacitoides se purificaron a partir de los bazos de los ratones empleando un estuche comercial de separación magnética (Miltenyi Biotec) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los esplenocitos se aislaron y se marcaron con anti-mPDCA-1TM (130-107-093, Miltenyi Biotec); se separaron mediante cromatografía de afinidad usando una columna LS (130-042-401, Miltenyi Biotec) y, por último, las células dendríticas plasmacitoides se recolectaron por selección positiva.

Para evaluar su pureza, se incubaron 5×10^5 células con anti-CD317-PE (BST, PDCA-1) durante 30 minutos antes del bloqueo del Fc γ R con 2.4G2 (Miltenyi Biotec). Las células dendríticas plasmacitoides se fijaron con *p*-formaldehído y se analizaron por citometría de flujo (FACS Canto IITM, BD). Los resultados se analizaron empleando el programa Cyflogic, versión 1.2.

Salmonella

Se reactivó *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) a partir de un vial de cultivo criopreservado, según la descripción previa (7): 100 µl de la bacteria se inocularon en 10 ml de medio Luria Bertani™ (Sigma) y se incubaron en agitación toda la noche a 37° C. Al día siguiente se transfirió una alícuota de 100 µl del cultivo en agitación toda la noche a 5 ml de medio Luria Bertani™ estéril, se incubó en agitación a 37° C y se hizo seguimiento de su crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm para homogenizar la multiplicidad de infección.

Las células dendríticas plasmacitoides purificadas, así como los macrófagos múridos de la línea celular IC-21, se infectaron con una multiplicidad de infección de 1:50 y se cultivaron durante 0,5 horas en medio Eagle modificado de Dulbecco™ (DMEM) (Sigma) complementado con 10 % de suero fetal bovino (Biowest, DMEM-10) sin gentamicina (Sigma).

Después de la incubación, las células se centrifugaron a 250 g y se lavaron dos veces con DMEM-10 que contenía 100 µg/ml de gentamicina para inhibir el desarrollo extracelular de la bacteria; las interacciones celulares se suspendieron de nuevo en 1 ml de medio y se incubaron siguiendo una cinética de infección a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas en presencia o ausencia de 5 µg/ml del oligodesoxinucleótido mCpg TCCATGACGTTCTGACGTT (Sigma) para el caso de las células dendríticas plasmacitoides.

Al término de la cinética, las interacciones se fijaron con *p*-formaldehído y se tiñeron con colorante de Wright siguiendo los protocolos estándar para ser analizadas en un microscopio óptico a 100X (Leica DM750™). El rango de infección se determinó contando 10 campos de cada una de las interacciones teñidas.

Citotoxicidad

Los ratones se inmunizaron subcutáneamente en la base de la cola con 100 µg/ml de OmpC73 (TRVAFAGL) siguiendo el protocolo descrito por Díaz-Quiñonez, *et al.* (6).

Después de 30 días de iniciada la inmunización, se obtuvieron las células efectoras cultivando durante cinco días los esplenocitos del epítipo homólogo en 10 + 25 µg/ml de DMEM. Las células dendríticas plasmacitoides purificadas se marcaron con éster de succinimidil-carboxifluoresceína™ (CFSE) (Invitrogen) y se cultivaron con los esplenocitos en diferentes relaciones de células efectoras y blanco (E:B): 1:1, 10:1 y 100:1 (en adelante, denominadas solo como 1, 10 y 100), en presencia del epítipo OmpC73 o del octapéptido irrelevante T *scramble*, estos dos últimos utilizados como control negativo.

Además, las células dendríticas plasmacitoides blanco se infectaron previamente con *S. Typhimurium* 14028 durante 0,5 horas. Todos los cultivos se mantuvieron durante 5 horas a 37° C con 5 % de CO₂. Al final, se centrifugaron a 300g y las células se suspendieron de nuevo en *p*-formaldehído y se analizaron por citometría de flujo como se describió antes.

Análisis estadístico

La citotoxicidad se analizó usando la prueba t de Student. Se compararon las medias entre los grupos y un valor de p de 0,05 o menor se consideró

estadísticamente significativo. Todos los análisis se hicieron mediante el programa Stata™, versión 13.

Resultados

Para analizar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos específicos para *Salmonella* spp. evocada por las células dendríticas plasmacitoides, primero se purificaron hasta alcanzar un porcentaje de pureza del 90 % (figura 1A). Posteriormente, se usó una cinética de infección a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas (figura 1B), obteniéndose un porcentaje de infección que osciló entre el 86,7 y el 91,8 %, definido mediante conteo por microscopía óptica.

La bacteria se visualizó intracelularmente a las 2 horas de la infección y las mayores cargas de bacilos se apreciaron a las 4 y las 6 horas (figura 1B). A las 18 horas se observó una menor cantidad de bacilos, probablemente debido a su procesamiento.

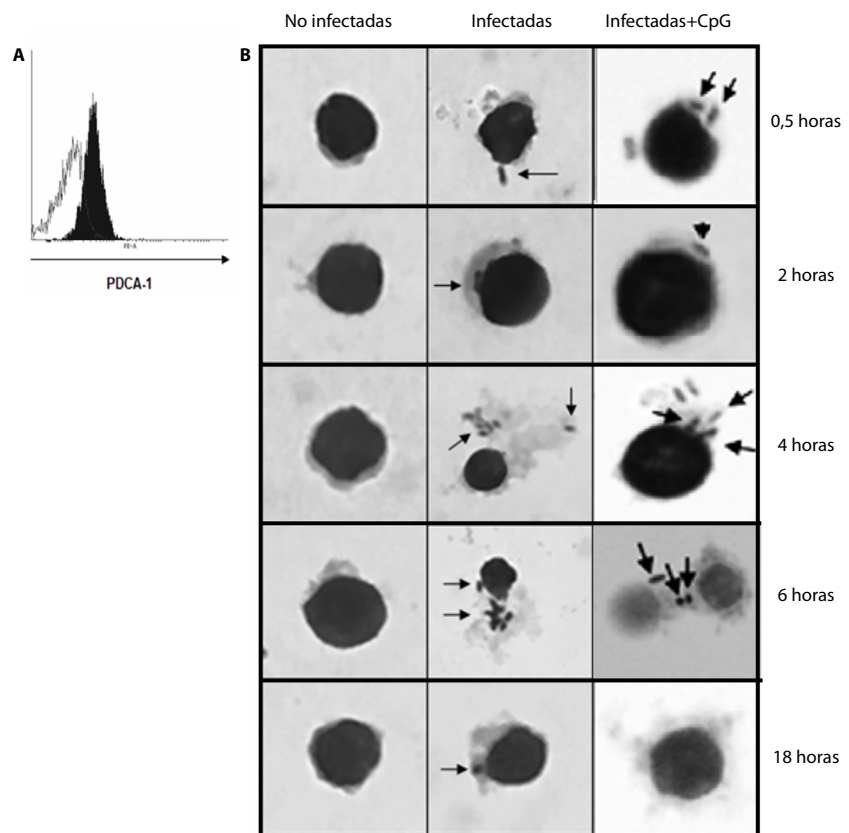


Figura 1. Células dendríticas plasmacitoides infectadas con *Salmonella* Typhimurium. **A.** Las células dendríticas plasmacitoides se purificaron mediante cromatografía de afinidad con anti-mPDCA-1 acoplados a esferas magnéticas y su pureza se evaluó por citometría de flujo. El histograma en blanco muestra la población sin marcar, y en negro, las células dendríticas plasmacitoides marcadas con el anticuerpo comercial anti-PDCA-1-PE, evidenciando una pureza del 90 %. **B.** Cinética de infección de células dendríticas plasmacitoides con *S. Typhimurium* con una multiplicidad de infección de 1:50; después de su infección estas fueron incubadas a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas y teñidas con tinción de Wright para su observación bajo el microscopio óptico con un objetivo de 100X. La columna de la izquierda muestra las células dendríticas plasmacitoides no infectadas y monitorizadas en los diferentes tiempos de incubación; las siguientes columnas muestran las células dendríticas plasmacitoides infectadas, o infectadas y estimuladas con CpG (5 µg/ml), con un rango de infección que osciló entre 86,7 y 91,8 %, definido mediante conteo celular por microscopía óptica. A partir de las 2 horas fue posible evidenciar los bacilos intracelulares con mayores cargas bacilares a las 4 y 6 horas de la infección (señalados con flechas). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Esta cinética también se utilizó con macrófagos de la línea IC-21 y se obtuvieron resultados similares en las primeras horas de infección de las células dendríticas plasmacitoides; no obstante, a las 18 horas ya no fue posible observar ningún bacilo intracelular, lo que evidencia una mayor eficiencia en el procesamiento de *Salmonella* spp. por parte de los macrófagos (figura suplementaria 1).

Al estimular las células dendríticas plasmacitoides con 5 µg/ml de CpG de múridos (TCCATGACGTTCCCTGACGTT) fue posible emular el comportamiento de los IC-21 (figura 1B).

En reportes previos se ha puesto de manifiesto la relevancia de los linfocitos T citotóxicos en la infección por *Salmonella* spp. (2-6). Sin embargo, la participación de las células dendríticas plasmacitoides como una estirpe celular implicada en la evocación de dicha respuesta no se había abordado.

En este contexto, se evaluó la capacidad de las células dendríticas plasmacitoides para evocar la respuesta citotóxica específica para *Salmonella* spp., para lo cual se generaron células efectoras obtenidas de la inmunización de ratones con el epítipo OmpC73 derivado de la porina de *Salmonella* y restringido para el CMH múrido de clase I K^b, que luego se estimularon de nuevo *in vitro* con el péptido homólogo (6).

Una vez obtenidas las células efectoras, se hicieron los ensayos de citotoxicidad empleando una adaptación no radiactiva del ensayo estándar de liberación de cromo mediante la marcación de las células dendríticas plasmacitoides con CFSE para determinar los porcentajes de lisis específica con base en la eliminación de las células dendríticas plasmacitoides así marcadas; luego se sometieron a pulsación con el epítipo OmpC73 o empleando los péptidos irrelevantes TA u OVA (controles negativos).

Las interacciones se hicieron en diferentes relaciones de células efectoras y blanco (figura 2). Los resultados se normalizaron con base en la lisis obtenida del control negativo y se representaron como lisis específica en porcentajes. Sorprendentemente, el mayor porcentaje de degradación, de 86,48 %, se observó en la relación 10 con el epítipo OmpC73 ($p=0,0429$), en tanto que para las relaciones 1 y 100, los porcentajes fueron de 74,12 % ($p=0,0426$) y 59,17 % ($p=0,0247$), respectivamente (figura 2A).

Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad similares a los descritos arriba, pero infectando las células dendríticas plasmacitoides con *S. Typhimurium* 14028 y empleándolas como blanco. En esta ocasión, el mayor porcentaje de lisis, de 89,85 % ($p=0,036$), se obtuvo empleando la relación 1 de células efectoras y blanco, mientras que en las relaciones 10 y 100 los porcentajes fueron de 85,13 % ($p=0,0428$) y 54,61 % ($p=0,0273$), respectivamente, comparados con el control negativo.

Asimismo, los resultados obtenidos en las micrografías a las 18 horas de la infección (figura 1B) sugieren que las células dendríticas plasmacitoides fueron capaces de degradar la bacteria, potenciando su actividad como células presentadoras de antígeno y contribuyendo a evocar la activación de los linfocitos T CD4⁺ durante la infección con *Salmonella* en la fiebre tifoidea experimental.

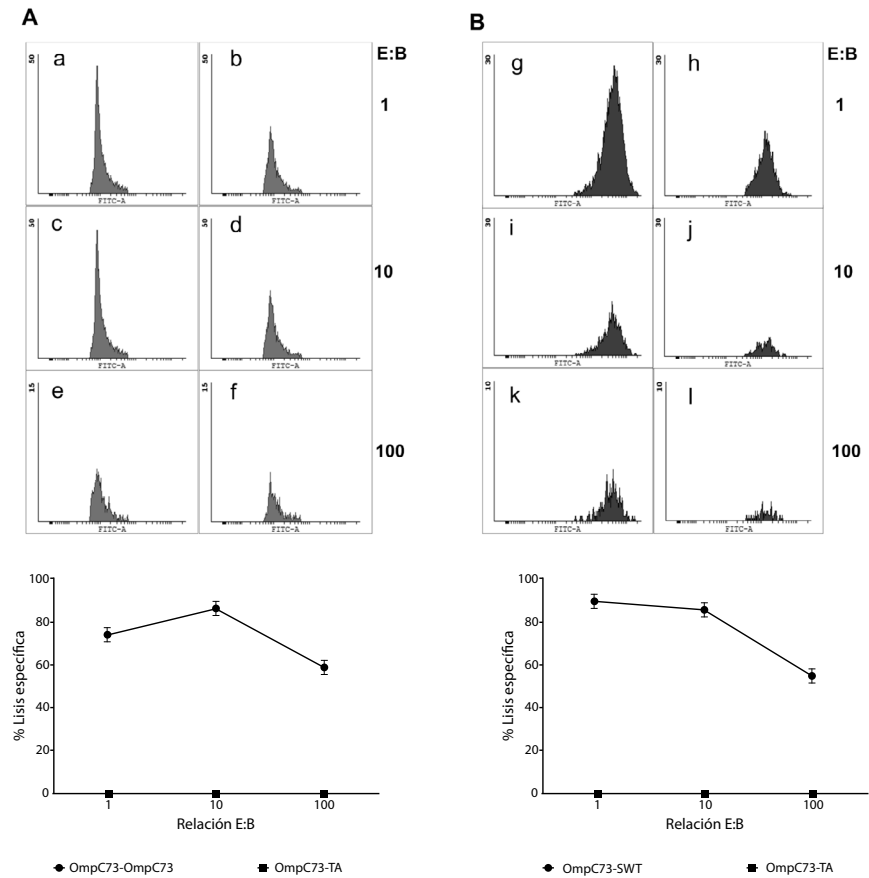


Figura 2. Las células dendríticas plasmacitoides evocan la respuesta inmunológica citotóxica contra epítomos de *Salmonella* spp. **A.** En el panel superior se muestran los histogramas representativos de la citotoxicidad en diferentes relaciones de células efectoras y blanco: 1, 10 y 100. Las células dendríticas plasmacitoides marcadas con CFSE fueron pulsadas con el péptido irrelevante TA (*scramble*) (en a, c y e), o con el epítomo OmpC73, (en b, d y f) y empleadas como blanco. En todos los casos las células citotóxicas efectoras provenían de ratones inmunizados con OmpC73 y estimulados nuevamente *in vitro* con ese epítomo. En el panel A inferior se muestran los porcentajes de lisis específica obtenidos en las diferentes relaciones de células efectoras y blanco (1, 10 y 100). Los resultados fueron normalizados empleando los valores de lisis obtenidos con los controles negativos. En **B**, los experimentos son similares a lo mostrado en **A**, empleando células efectoras provenientes de ratones inmunizados con OmpC73, con la particularidad de que las células dendríticas plasmacitoides blanco fueron marcadas con CFSE e infectadas con *S. Typhimurium*. En g, i y k, las células dendríticas plasmacitoides blanco no fueron infectadas y, en h, j y l, fueron infectadas con *Salmonella* spp. En el panel **B** inferior, se muestran los porcentajes de lisis específica obtenidos en las diferentes relaciones células efectoras y blanco (1, 10 y 100). Los resultados se normalizaron empleando los valores de lisis obtenidos con los controles negativos.

Discusión

Las células dendríticas se dividen en dos linajes principales: las convencionales y las plasmacitoides. En la infección por *Salmonella* se ha reportado la participación de las convencionales, los macrófagos y los linfocitos B (7-9,14,15), pero no así la de las plasmacitoides. Durante la cinética de infección, la bacteria se visualizó intracelularmente en las células dendríticas plasmacitoides purificadas desde las primeras horas. Por el contrario, a las 18 horas de la infección, la cantidad de bacilos observados fue menor, probablemente debido a su procesamiento. Sin embargo, al ser estimuladas con CpG de muridos, se evidenció una mayor eficiencia en el procesamiento de *Salmonella* spp.

Un fenómeno similar se observó durante la infección de las células dendríticas plasmacitoides con la bacteria *Borrelia burgdorferi* (16). En otro estudio, la participación de las células dendríticas plasmacitoides durante la infección pulmonar causada por *Legionella pneumophila* en ratones quedó de manifiesto al eliminar selectivamente dichas células, lo que produjo una mayor carga bacteriana (17).

Las células dendríticas plasmacitoides pueden considerarse como células presentadoras de antígeno debido a la expresión de las moléculas del CMH de clases I y II. Se ha evidenciado que las células dendríticas plasmacitoides pueden incorporar antígenos mediante el receptor Fcγ (CD16/CD32) y activar una respuesta específica de antígeno de linfocitos T citotóxicos y cooperadores (Th). Una respuesta de Th conlleva la producción de IL-4 (subconjunto Th2), mientras que una respuesta de linfocitos T citotóxicos conduce a la producción de IL-10 e IFN-γ (subconjunto Tc1) (18).

Además, se ha descrito que las células dendríticas plasmacitoides tienen la capacidad de estimular una alorrespuesta de linfocitos T CD8⁺ en pacientes con trasplante de riñón que han sufrido infección por citomegalovirus, promoviendo el rechazo del órgano mediante la señalización de los receptores de tipo *toll* (*toll-like receptors*, TLR) endosómicos, TLR7 y TLR9 (19).

Se ha señalado que la vía de señalización TLR9-MyD88 es indispensable para una respuesta específica a los linfocitos T citotóxicos de antígenos virales (20); en estudios recientes se ha establecido que el TLR9 es indispensable para la respuesta contra la invasión de *S. Typhimurium* en un modelo murino, debido a que regula de manera negativa la vía de NF-κB-NLRP3-IL-1β en las células epiteliales del intestino infectadas con la bacteria (21).

Entre los mecanismos propuestos para la presentación de antígenos exógenos en el contexto del CMH-I, se ha sugerido que las proteínas exógenas degradadas en endosomas son secretadas al medio extracelular, donde se unen a moléculas del CMH-I vacías, o bien que, mediante la activación de TLR9, las células dendríticas plasmacitoides incrementan su capacidad fagocítica de procesar antígenos derivados de células muertas infectadas (20), por lo que los péptidos de agentes patógenos intracelulares, como el OmpC73 de *Salmonella* spp., se presentan en el contexto del CMH-I y con ello logran evocar una respuesta de los linfocitos T citotóxicos.

Los porcentajes obtenidos en este estudio fueron superiores a los observados por Díaz-Quiñonez, *et al.*, debido probablemente a la diferencia de estirpes celulares empleadas como células blanco en los ensayos, así como a las variantes metodológicas en cada caso, aunque la estrategia para generar las células efectoras *in vivo* e *in vitro*, así como los epítomos empleados, fueron iguales.

Es interesante observar que los porcentajes de degradación obtenidos durante la infección de las células dendríticas plasmacitoides con *Salmonella* spp. fueron superiores a los obtenidos con aquellas pulsadas con el epítomo, resultados que se explicarían por la mayor y más eficiente activación de las células dendríticas plasmacitoides infectadas, lo que posiblemente incrementó la expresión de otras moléculas estimuladoras y la secreción de citocinas, las cuales pudieron haber incrementado la respuesta efectora de los linfocitos T citotóxicos (18).

Los datos obtenidos en este estudio evidencian la participación de las células dendríticas plasmacitoides para evocar la respuesta de los linfocitos T citotóxicos durante la infección con *S. Typhimurium*, lo que sugiere su posible participación en la fiebre tifoidea, contribuyendo a eliminar células infectadas y permitiendo el control de la infección. Sin embargo, es necesario desarrollar estudios más detallados para confirmar estos datos también en células humanas o en un modelo murino de fiebre tifoidea *in vivo* y profundizar en la participación de las células dendríticas plasmacitoides en la respuesta inmunológica celular evocada en una enfermedad que afecta a millones de personas cada año (1).

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de la Red Temática de Biotecnología Biomédica de PRODEP-UAS-CINVESTAV, por el apoyo técnico brindado.

Referencias

1. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:901-37. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
2. Wijburg OL, van Rooijen N, Strugnell RA. Induction of CD8⁺ T lymphocytes by *Salmonella* Typhimurium is independent of *Salmonella* pathogenicity island 1-mediated host cell death. *J Immunol.* 2002;169:3275-83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3275>
3. Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravorty D. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes Infect.* 2010;12:809-818. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.010>
4. Mitrücker HW, Kaufmann S. Immune response to infection with *Salmonella* Typhimurium in mice. *J Leukoc Biol.* 2000;67:457-63. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.457>
5. Hughes EA, Galán JE. Immune response to *Salmonella*: Location, location, location? *Immunity.* 2002;16:325-8. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00293-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00293-5)
6. Díaz-Quirón A, Martín-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Two *Salmonella* OmpC K^b-restricted epitopes for CD8⁺-T-cell recognition. *Infect Immun.* 2004;72:3059-62. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.3059-3062.2004>
7. Rosales-Reyes R, Alpuche-Aranda C, Ramírez-Aguilar ML, Castro-Eguiluz AD, Ortiz-Navarrete V. Survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infect Immun.* 2005;73:3937-44. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3937-3944.2005>
8. Martín-Orozco N, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via secretory pathway as a consequence of interferon-γ activation. *Immunol.* 2001;103:41-8. <https://doi.org/10.1046/j.0019-2805.2001.01226.x>
9. Castro-Eguiluz D, Pelayo R, Rosales-García V, Rosales-Reyes R, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V. B cell precursors are targets for *Salmonella* infection. *Microb Pathog.* 2009;47:52-6. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.04.005>
10. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cyt Growth Factor Rev.* 2008;19:3-19. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.006>
11. Reizis B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr Opin Immunol.* 2010;22:206-11. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.005>
12. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* 2008;29:352-61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.002>
13. Takagi H, Fukaya T, Eizumi K, Sato Y, Sato K, Shibasaki A, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity *in vivo*. *Immunity.* 2011;35:958-71. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.014>
14. Bueno SM, González PA, Carreño LJ, Tobar JA, Mora GC, Pereda CJ, *et al.* The capacity of *Salmonella* to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunol.* 2008;124:522-33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02805.x>

15. Tobar JA, Carreño LJ, Bueno SM, González PA, Mora JE, Quezada SA, *et al.* Virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infect Immun.* 2006;74:6438-48. <https://doi.org/10.1128/IAI.00063-06>
16. Petzke M, Brooks A, Krupna M, Mordue D, Schwartz I. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J Immunol.* 2009;183:5279-92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901390>
17. Ang DK, Oates CV, Schuelein R, Kelly M, Sansom FM, Bourges D, *et al.* Cutting edge: Pulmonary *Legionella pneumophila* is controlled by plasmacytoid dendritic cells but not type I IFN. *J Immunol.* 2010;184:5429-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000128>
18. Björck P, Beilhack A, Herman EI, Negrin RS, Engleman EG. Plasmacytoid dendritic cells take up opsonized antigen leading to CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation *in vivo*. *J Immunol.* 2008;181:3811-7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3811>
19. Reich B, Viehmann SF, Kurts C. Plasmacytoid dendritic cells: Important players in human kidney allograft rejection. *Kidney Int.* 2018;93:301-3. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.10.025>
20. Rogers GL, Shirley JL, Zolotukhin I, Kumar SR, Sheman A, Perrin GQ, *et al.* Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* 2017;129:3184-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-751040>
21. Li Y, Liu M, Zuo Z, Liu J, Yu X, Guan Y, *et al.* TLR9 regulates the NF-κB-NLRP3-IL-1β pathway negatively in *Salmonella*-induced NKG2D-mediated intestinal inflammation. *J Immunol.* 2017;199:761-73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601416>

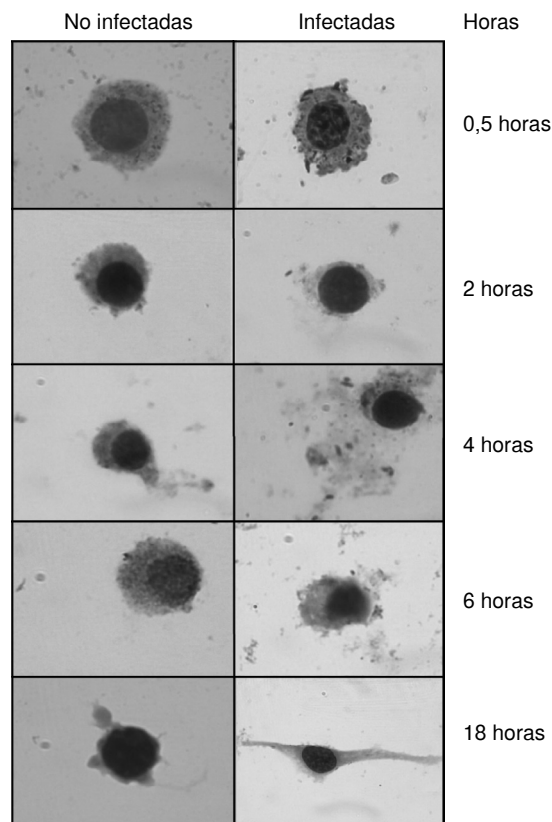


Figura suplementaria 1. Infección de la línea celular IC-21 por *Salmonella* Typhimurium. Los macrófagos fueron infectados con *S. Typhimurium* con una multiplicidad de infección de 1:50. En la primera columna se observan macrófagos no infectados y, en la siguiente, se aprecian las células infectadas a las 0,5, 2, 4, 6 y 18 horas. Las células fueron teñidas con tinción de Wright y observadas en el microscopio óptico con un objetivo de 100X. Las flechas negras señalan los bacilos observados en cada una de las micrografías. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.