



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN

COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

**EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA
CONTRA LA INFECCION POR ROTAVIRUS INDUCIDA POR VP6
DIRECCIONADO A DEC-205 CUANDO SE ADMINISTRA
PARENTERALMENTE O EN MUCOSA
TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA:

L.B.E. OMAR JABÍN VELÁZQUEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO, 2021

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 1 de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en el periodo enero 2019 – diciembre 2020. Cuernavaca, Morelos, México.

Miembros del comité tutorial:

Director: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Tutor Personal: Dra. Vera Lucia Petricevich

Dr. Iván Martínez Dunker Ramírez

Dr. José Luis Montiel Hernández

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Miembros de la comisión revisora de tesis y jurado de examen:

Presidente: Dr. Armando Herrera Arellano

Secretario: Dr. José Luis Montiel Hernández

1er Vocal: Dra. Vera Lucia Petricevich

2do Vocal: Dra. María Angélica Santana Calderón

3er Vocal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres.

Por ser los que me llevaron por el buen camino y los que me apoyaron en todo momento.

A mi Familia.

Siempre estuvieron apoyándome y siempre pude contar con ellos.

A mis Amigos.

Por darme consejos sobre cómo llevar la maestría.

Al equipo “Mancos de Verdansk”.

Por ser los que aguantaban mis enojos y frustraciones, aunque luego perdíamos porque estaban bien mancos.

A los integrantes del laboratorio 1 de la Facultad de Medicina.

Por apoyarme con los experimentos y las dudas que me surgían.

INDICE

Contenido

RESUMEN	6
1 INTRODUCCION.....	7
1.1 Rotavirus	7
1.1.2 NSP4.....	10
1.1.3 Diagnóstico y Tratamiento.....	12
1.2 El Sistema Inmune	13
1.2.1 Células B y T	13
1.2.2 Subpoblaciones de Linfocitos T.....	14
1.2.3 Procesamiento y presentación de antígeno a células T	16
1.2.4 Células dendríticas.	18
1.2.5 Subpoblaciones de células dendríticas.....	20
1.2.6 Receptor DEC-205 y direccionamiento de antígeno a células dendríticas.....	21
1.2.7 Sistema inmune de mucosa intestinal.....	25
1.2.8 Sistema inmune de mucosa nasal	26
1.2.9 Respuesta inmune contra rotavirus.	28
1.2.10 VP6 como antígeno modelo de vacunación.....	29
2 Planteamiento del Problema y Justificación.....	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
4 HIPOTESIS	34
5 MATERIAL Y METODOS	35
5.1 Diseño experimental	35
5.2 Producción y purificación del anticuerpo monoclonal NLDC	35
5.3 Entrecruzamiento del anticuerpo monoclonal NLDC con rVP6Ew. -.....	35
5.4 Western blot. -	36
5.5 Inmunización de ratones y reto con rotavirus murino EDIM. -.....	36
5.6 Detección de rotavirus en las heces. -.....	37
5.7 Detección de anticuerpos contra VP6 en suero por ELISA. -.....	38
5.8 Detección de IgA contra rotavirus en heces. -	39
5.9 Análisis estadístico.	39

6 RESULTADOS.....	40
6.1 Producción y purificación del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205.	40
6.2 Generación del conjugado anti-DEC205:VP6	42
6.3 Inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 entrecruzado con VP6 y comparación de la vía de administración.....	45
6.4 Detección de IgA contra rotavirus en heces.....	51
7 DISCUSIÓN.....	53
8 CONCLUSIÓN	57
9 REFERENCIAS	58

RESUMEN

El sistema inmune protege a los organismos de los distintos tipos de agentes patógenos o dañinos en la naturaleza. Esta protección conlleva la activación de células especializadas en el combate contra agentes patógenos y el reconocimiento de daño interno. La respuesta inmune intestinal difiere de la respuesta inmune sistémica debido principalmente al ambiente tolerogénico, por lo que para estudiar esta respuesta es necesario contar con un modelo experimental enfocado a este fin. Por otro lado, las vacunas que son administradas parenteralmente ofrecen una respuesta inmune a nivel de mucosas que es deficiente. Por lo que son necesarias nuevas estrategias capaces de activar eficazmente la respuesta inmune intestinal y a nivel de mucosas en general.

Debido a esto, en el presente trabajo se comparó la respuesta inmune protectora contra rotavirus inducida con distintas concentraciones de VP6 direccionado a DEC-205, presente en las células dendríticas, cuando se administró parenteralmente o en mucosa. Para tal fin, se cultivó el hibridoma de rata NLDC-145 productor del anticuerpo monoclonal anti-DEC205. Este anticuerpo se conjugó químicamente con la proteína viral de rotavirus VP6, la cual conserva una homología de hasta un 90% entre las distintas cepas del patógeno. Con este conjugado se realizó la inmunización de ratones empleando dos rutas de administración. Se evaluaron dos dosis (130 ng y 400 ng) para la ruta parenteral (intraperitoneal; i.p.), y tres dosis (130 ng, 400 ng y 800 ng) para la vía de mucosa (intranasal; i.n.). Los análisis de protección contra la infección viral mostraron que la vacunación en mucosa fue más eficiente que la parenteral, obteniendo una protección de hasta un 69%. Interesantemente, contrario a la vacunación parenteral, la vacunación en mucosa no indujo anticuerpos séricos contra VP6. Ninguna de las vías de vacunación modificó los anticuerpos IgA intestinales anti-rotavirus. Estos resultados sugieren que tanto la vacunación parenteral como la de mucosa con VP6 direccionado a las células dendríticas, inducen una protección contra la infección por rotavirus dependiente de células T e independiente de anticuerpos. Asimismo, se confirma que las vacunas por la vía de las mucosas son más eficientes contra patógenos intestinales que las vacunas parenterales.

1 INTRODUCCION

La respuesta inmune celular implica la activación de células especializadas en el combate contra agentes patógenos y el reconocimiento de daño interno que podría conducir a la transformación celular y cáncer. Esta activación está mediada por interacciones moleculares entre los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) clase I y clase II y los receptores de linfocitos T y B, así como los receptores de células dendríticas, células NK y NKT, entre varios otros elementos.

La respuesta inmune intestinal comprende un reto extra debido a su mayor umbral de tolerancia inmunológica. En condiciones normales, los enterocitos secretan ácido retinoico y TGF- β , las cuales son señales que inducen tolerancia inmunológica hacia la microbiota y las proteínas de la dieta. La activación de linfocitos T y B en esta zona del organismo requiere de fuertes estímulos para que se pueda montar una respuesta eficaz. Empero, estudios previos han demostrado que se puede inducir una eficiente activación de estos linfocitos cuando se usan modelos donde se hace uso de las células dendríticas y su receptor DEC-205.

1.1 Rotavirus

Rotavirus pertenece a la familia de virus Reoviridae y constituye el agente causal de gastroenteritis aguda a nivel global, teniendo más repercusiones en países subdesarrollados debido a la carencia de cuidados médicos, terapias disponibles de hidratación y factores comórbidos (como desnutrición), entre otros. Aunque los motivos son desconocidos, se ha sugerido desde defectos en la cadena de frío, hasta diferencias en el estado nutricional de los individuos y diferencias en la microbiota intestinal. Inconvenientemente, las vacunas comerciales contra rotavirus están asociadas con un ligero riesgo de invaginación intestinal (Rha et al., 2014). Esta patología es una forma de obstrucción, en donde una porción del intestino se invagina dentro de otra y termina en

isquemia, edema y necrosis local del tejido (Yen et al., 2011). En el año 2013 (WHO, 2016), se estimó que rotavirus causó >200,000 muertes en niños menores de 5 años. Existen pocas vacunas contra rotavirus, de las cuales dos son usadas ampliamente en todo el mundo, RV5 RotaTeq (Merck, USA) y RV1 Rotarix (GlaxoSmithKline, Belgium) ambas fabricadas con virus atenuados (Angel et al., 2007).

El vocablo rotavirus se deriva del latín “*rota*” que significa rueda, posiblemente haciendo referencia a su estructura proteica (Figura 1). Es un virus de doble cadena de ARN cuya estructura está conformada por 3 cápsides concéntricas (VP2 capa interna, VP6 capa intermedia y VP7 y VP4 capa externa), las cuales rodean al genoma, compuesto de 11 segmentos. Estos segmentos codifican para 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7), implicadas en la conformación de la cápside viral, replicación y evasión de la respuesta inmune. Por otro lado, también se codifican 6 proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6), que intervienen en la replicación, en la morfogénesis del virus dentro de la célula huésped y también en la evasión de la respuesta inmune (Crawford et al., 2017).

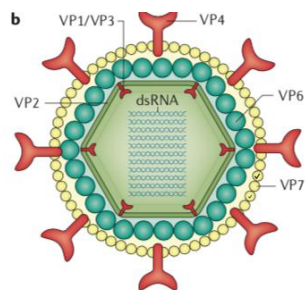


Figura 1.- Estructura del rotavirus. Tomada de Crawford, et al., 2017.

Rotavirus infecta y se replica en los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado. Se une a su célula hospedera mediante VP4 (a través de su dominio VP8) a sialoglicanos (como los gangliósidos GM1 y GD1a) y antígenos de grupos sanguíneos. Después de que el

dominio VP8 interactúa con el receptor de la célula, rotavirus ingresa a la célula en endosomas en donde los bajos niveles de calcio inducen que rotavirus pierda su capa externa y libere al citoplasma la partícula de doble capa, conformada por VP2 y VP6, la cual es transcripcionalmente activa. Una vez dentro del citoplasma se inicia la replicación, en donde VP1 actuará como la polimerasa viral dando paso a la síntesis de los ARN mensajeros que darán origen a las proteínas estructurales y a los templados de ARNdc de la progenie viral. El ensamblaje de las nuevas partículas virales ocurre en viroplasmos citoplasmáticos, seguido de la liberación de la progenie viral por medio de lisis celular o de transporte vesicular no clásico independiente del aparato de Golgi, infectando a su salida a los enterocitos adyacentes (figura 2) (Crawford et al., 2017).

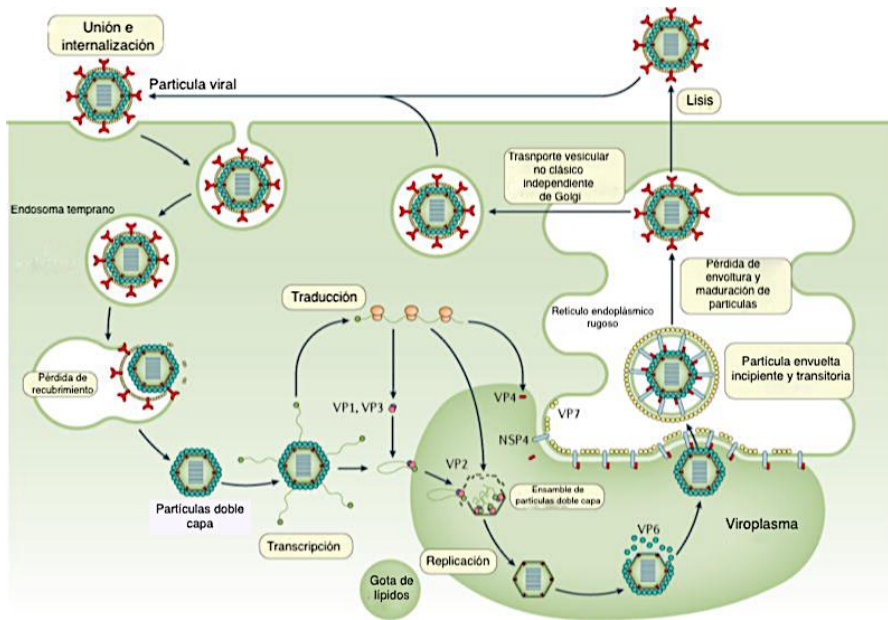


Figura 2.- Ciclo de replicación de rotavirus. El virus se internaliza por vías endocíticas en la célula al unirse a su receptor en la membrana por medio de la proteína VP4, los niveles bajos de calcio en el endosoma eliminan la capa externa, pierde su recubrimiento y se convierte en el citoplasma en una partícula de doble capa que es transcripcionalmente activa (DLP), el ARN replicado se empaqueta en nuevos DLPs al interior de viroplasmos de donde pasan al retículo endoplásmico rugoso, sitio donde adquieren a las proteínas

de la cápside externa, una vez maduras estarán listas para su salida de la célula mediante lisis (Crawford et al., 2017).

Se han identificado 10 diferentes tipos de rotavirus (A-J) tomando en cuenta sus secuencias y las diferencias antigénicas de VP6. Los rotavirus tipo A se han dividido, a su vez, en diferentes genotipos basándose en la secuencia de los segmentos de RNA 7 y 4 (los cuales codifican para las proteínas VP7 y VP4, respectivamente). Tomando esto en cuenta, se propuso el sistema de nomenclatura dual para los tipos A de rotavirus, donde son diferenciados los subtipos para la glicoproteína (G o VP7) y la proteasa (P o VP4). A la fecha se han identificado 32 G genotipos y 47 P genotipos, de los cuales los genotipos G[1] y G[6], y P[4], P[6] y P[8] tienen relevancia en el ser humano (Crawford, et al., 2017).

El virus es expulsado en grandes cantidades en las heces durante episodios de diarrea asociada a rotavirus. Este patógeno se transmite principalmente por la vía fecal-oral, y se necesita una cantidad pequeña de viriones para infectar huéspedes susceptibles. La transmisión por medio de fómites contaminados también juega un papel importante especialmente en lugares públicos (Estes et al., 2013).

Los episodios de diarrea ocasionados por la infección por rotavirus, a diferencia de los causados por gastroenteritis, son no sanguinolentos y con una corta duración asociada a una respuesta inflamatoria limitada. La diarrea inducida por rotavirus se considera no inflamatoria y tiene dos mecanismos propuestos: diarrea osmótica por malabsorción, o diarrea secretora debido a los efectos de NSP4 y la activación del sistema nervioso entérico (ENS) (Ball et al., 1996).

1.1.2 NSP4

Cuando la proteína viral NSP4 es secretada de células infectadas, este se une a células epiteliales intestinales y señala a través de la fosfolipasa C, aumentando los niveles de calcio

citoplasmático. Esto provoca una activación de los canales de cloro dependientes de calcio. La activación de estos canales causa la secreción de iones cloro hacia el lumen intestinal creándose un gradiente osmótico que promueve el transporte de agua hacia el lumen (Figura 3) (Crawford et al., 2017).

En ratones recién nacidos, la diarrea puede ser prevenida utilizando inhibidores de canales de cloro activados por calcio. Estos resultados confirman el papel de NSP4 en el desarrollo de diarrea secretora (Crawford et al., 2017).

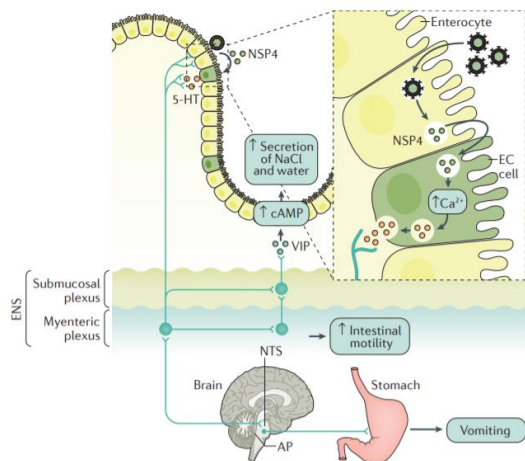


Figura 3.- Modelo esquemático de inducción de diarrea y vómito por rotavirus.. La proteína NSP4 de rotavirus se libera de los enterocitos infectados y estimula células enterocromafines las cuales liberan 5-hidroxitriptamina (5-HT), un neurotransmisor que regula la motilidad gastrointestinal e induce náuseas y vómitos. La liberación de 5-HT puede inducir diarrea debido a la activación de los receptores 5-HT en los nervios aferentes primarios intrínsecos que componen el plexo mientérico. La activación de los nervios del plexo mientérico aumenta la motilidad intestinal y activa los nervios que componen el plexo submucoso, regulando la liberación de péptido intestinal vasoactivo (VIP) de las terminaciones nerviosas adyacentes a las células de la cripta. Estos eventos, a su vez, provocan diarrea al aumentar los niveles de cAMP celular, lo que

resulta en la secreción de cloruro de sodio (NaCl) y agua en la luz intestinal. Tomada de Crawford et al., 2017.

1.1.3 Diagnóstico y Tratamiento

Aunque la enfermedad por rotavirus es clínicamente indistinguible de otras enfermedades diarreicas, existen varios factores que pueden sugerir que la infección fue ocasionada por rotavirus. Entre estos factores, se encuentra el hecho de que la infección por rotavirus es menos severa que otras enfermedades diarreicas causadas por otros agentes patógenos. De igual manera, su relación con la estación del año en algunas regiones del mundo permitiría sugerir que rotavirus es el agente patógeno, por ejemplo, en ciudades no ecuatorianas, la infección por rotavirus es el diagnóstico más probable si el infante presenta diarrea en invierno (Crawford et al., 2017).

Los antígenos de rotavirus pueden ser detectados por medio de ensayos de ELISA o por medio de técnicas inmunocromatográficas. En estudios epidemiológicos y de vacunas, estos ensayos se complementan con la técnica de RT-PCR ya que es más sensible y permite la genotipificación de los aislados virales. La ventana para la detección de excreción viral generalmente termina una semana después del pico de la enfermedad, pero el virus aún puede ser detectado por métodos sensibles, tales como PCR. Más aun, se han detectado niveles enzimáticos anormales en infantes infectados con rotavirus, lo cual debe estar relacionado con el vómito y la deshidratación asociada al virus (Crawford et al., 2017).

La enfermedad por rotavirus es tratada principalmente por rehidratación oral. La infección viral es autolimitada y no requiere de alguna otra terapia. Sin embargo, se ha reportado que los pacientes que están en terapia de rehidratación no absorben muy bien el azúcar y tienen altos niveles de glucosa en las heces (Nalin et al., 1979). Estos hallazgos concuerdan con experimentos en cerdos infectados por rotavirus en donde se encontró una deficiencia en el transporte de glucosa asociada al sodio (Davidson et al., 1977). El que los pacientes infectados por rotavirus puedan ser tratados con una terapia de rehidratación oral, aun con una deficiencia en la absorción de glucosa sugiere que estos tienen una menor demanda de absorción de glucosa asociada al sodio comparados

con pacientes con casos severos de diarrea por cólera. Estos hallazgos van de la mano con observaciones clínicas donde se puede notar que la diarrea por rotavirus es menos agresiva, con menos pérdida de sodio y agua.

1.2 El Sistema Inmune

El sistema inmune protege a los organismos de los distintos tipos de agentes patógenos o dañinos en la naturaleza. Ya sean parásitos, virus, bacterias, hongos e incluso antígenos de nuestra propia dieta. El sistema inmunitario está adecuado para defendernos del daño que éstos puedan causarnos. Existen dos tipos de respuesta: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa, la cual comprende barreras físicas y químicas (como la piel y la enzima lisozima respectivamente), células capaces de fagocitar al patógeno (macrófagos), y moléculas (PRRs; del inglés “pattern recognition receptor”) que reconocen patrones moleculares conservados en los microorganismos (PAMP; del inglés “pathogen-associated molecular patterns”). Por su parte, la inmunidad adaptativa comprende células especializadas en el combate a patógenos específicos (células B y T), y tiene la ventaja de generar memoria a largo plazo, después del primer contacto con el antígeno. Ambos tipos de respuestas trabajan en conjunto para proveer una defensa eficaz.

1.2.1 Células B y T

Como se mencionó anteriormente, las células B y T forman parte del sistema inmune adaptativo. Ambos tipos celulares son producidos en la médula ósea desde su precursor hematopoyético, y las poblaciones maduras se establecen en los órganos linfoides secundarios de todo el organismo. La célula B madura en la médula ósea, mientras que el precursor de la célula T migra al timo donde completa su maduración. La célula B puede unirse directamente con el

patógeno por medio de un receptor de antígeno único (BCR), el cual puede ser secretado después de la activación del linfocito. Tras ser expuesta a un agente patógeno, esta célula puede llegar a permanecer viva por un largo periodo de tiempo como célula plasmática productora de anticuerpo o como célula de memoria, la cual generará una respuesta más rápida frente a una segunda exposición contra antígeno (Cyster JG, Allen CDC., 2019). La célula T a diferencia del linfocito B, no secreta anticuerpos y su receptor no puede unirse directamente al antígeno. Este tipo celular se puede diferenciar en dos tipos distintos, linfocito T citotóxico (Tc; CD8⁺) y linfocito T cooperador (Th; CD4⁺) (Tschärke et al., 2015), y al igual que las células B generan células de memoria.

Casi todas las células pueden interactuar con los linfocitos Tc debido a la expresión de MHC clase I, sobre la cual expresan péptidos propios o péptidos virales internos derivados de la vía endógena de procesamiento y presentación de antígeno. Sin embargo, no todas las células pueden activar a los linfocitos Th pues carecen de MHC clase II, que expresa antígenos derivados de la vía exógena. Las células capaces de expresar MHC clase II, son consideradas células presentadoras de antígeno (APC), siendo principalmente las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Estas células tienen la capacidad de internalizar el patógeno, procesarlo y expresar péptidos antigénicos acoplados a la molécula MHC clase II sobre sus membranas. Dentro de este grupo, las células dendríticas son las más eficaces en esta tarea, y se consideran iniciadoras de la respuesta primaria de los linfocitos T.

1.2.2 Subpoblaciones de Linfocitos T.

Las células T maduran en el timo, expresan el receptor de célula T (TCR por sus siglas en inglés), y pueden expresar tanto la glicoproteína CD8 en células Tc, como la glicoproteína CD4 en células Th. A su vez, esta última población de células T se puede diferenciar en diferentes subpoblaciones caracterizadas por el perfil de citocinas secretadas y por los factores de transcripción expresados (Golubovskaya y Wu, 2016). A continuación, se enlistan las subpoblaciones de las células Th y sus características:

- **Células Th1:** Son consideradas las células por excelencia involucradas en inflamación celular y en las reacciones de hipersensibilidad retardada. Mayormente se les atribuye la producción de interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN γ), empero se ha reportado que también pueden expresar el factor de necrosis tumoral (TNF) y linfotóxina. Este tipo celular está comprometido por el factor de transcripción T-bet. El IFN γ producido por las células Th1, es una citocina proinflamatoria la cual tiene varias funciones incluyendo el incremento de los receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés), inducción de secreción de quimiocinas y activación de macrófagos entre otras.
- **Células Th2:** Son reconocidas por su papel en la defensa contra parásitos multicelulares y en su participación en las alergias y enfermedades atópicas. Estas células ejercen su función en los tejidos epiteliales, mayormente en el tracto gastrointestinal y en los pulmones. Este tipo celular es caracterizado el factor de transcripción GATA-3 y por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, así como IL-9 e IL-10. Las células Th2 ayudan a la diferenciación de los linfocitos B y a la maduración de células dendríticas por medio de IL-4.
- **Células Th9:** El desarrollo de estas células requiere la combinación de IL-4 y del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). Se caracterizan por expresar IL-9 la cual es una citocina importante en el desarrollo de los mastocitos y los linfocitos T, sin embargo, también son una fuente importante de IL-10 la cual tiene actividades antiinflamatorias.
- **Células Th17:** Estas células, inducidas por las citocinas IL-23, IL-6 y TGF β , están caracterizadas por el factor de transcripción ROR γ t y ejercen una fuerte respuesta inflamatoria debido a la expresión y secreción de IL-17. Algunas funciones de las Th-17 incluyen el reclutamiento de neutrófilos, la activación de células del sistema inmune innato y la inducción de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-1 β y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés). Adicionalmente, la señalización por medio de IL-17 induce la expresión de quimiocinas y otros factores inflamatorios como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 por sus siglas en

Comentado [T1]: Qué citosinas inducen a la sIL-17?

inglés), prostaglandina E2 (PGE2), así como la inducción de daño tisular por medio de la inducción de metaloproteinasas y péptidos antimicrobianos.

- **Células T reguladoras (Treg):** Estas células, inducidas principalmente por la IL-2 y IL-15, están caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FOXP3 el cual es crítico para su desarrollo, y sus funciones reguladoras. Producen IL-10 y TGF- β . Los efectos inmunosupresores de IL-10 están mediados por sus efectos en las células presentadoras de antígeno, en donde se ha demostrado que induce una desregulación de los MHC clase I y II (Raphael et al., 2015).

Comentado [T2]: Qué citosinas inducen a las Treg?

1.2.3 Procesamiento y presentación de antígeno a células T

El sistema inmune usa diferentes vías para la eliminación de antígenos tanto intracelulares como extracelulares. Existen dos vías por las cuales las células del organismo pueden procesar y presentar antígenos para ser reconocidos por las células T. Estas son la vía endógena para presentación de antígeno a células Tc y la vía exógena para la presentación de antígeno a células Th.

La vía endógena está presente en todos los tipos celulares, pues es una estrategia biológica que no solamente ayuda a detectar células infectadas por patógenos, sino también ayuda a detectar células cancerosas. Esta vía comúnmente está asociada a la degradación y al recambio de proteínas celulares que estén dañadas, mal plegadas o su vida media haya llegado al final. Estas proteínas son degradadas por un complejo proteolítico llamada proteosoma. Este complejo este compuesto por dos subunidades (20S y 19S) y se encarga de romper enlaces peptídicos en un proceso dependiente de ATP. Algunas células presentadoras de antígeno contienen un proteosoma especial que recibe el nombre de inmunoproteosoma, este complejo contiene algunos componentes que son inducidos por exposición a interferón- γ o TNF- α . Esta vía comprende péptidos (8-10 aa de

longitud) derivados del procesamiento citosólico de las proteínas. Estos péptidos son translocados desde el citosol hacia el retículo endoplásmico por medio de las proteínas TAP1 y TAP2. Mientras tanto, el ensamblaje del MHC clase I se lleva a cabo dentro del retículo endoplásmico con la ayuda de las proteínas calnexina y calreticulina, entre otras. Una vez ensamblada la molécula de MHC clase I, el péptido que es translocado por las TAPs puede unirse a ella y ser expresado en la membrana celular (Figura 4, lado izquierdo).

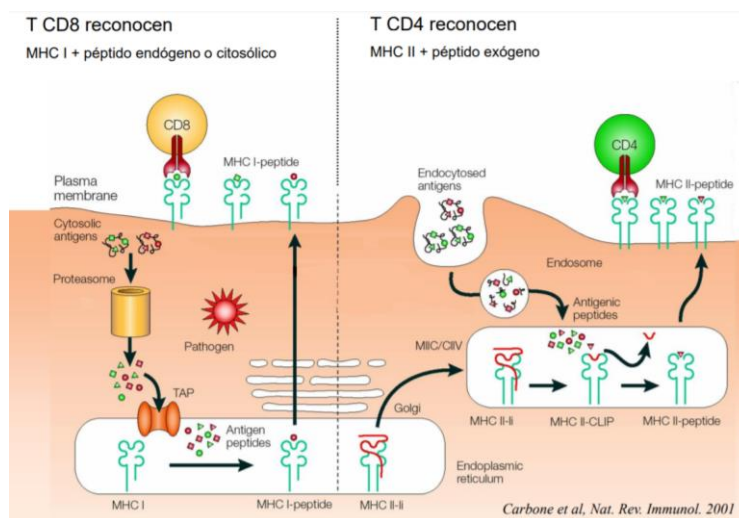


Figura 4.- Vías endógena y exógena del procesamiento de antígeno para células T. En la vía endógena (izquierda), los antígenos son degradados por el proteosoma, y se convierten en péptidos. En la vía exógena (derecha), antígenos extracelulares son fagocitados hacia compartimentos endocíticos donde son degradados por enzimas endosomales y lisosomales dependientes de pH ácido. Los péptidos antigénicos provenientes de división de proteosoma, y los que provienen de compartimentos endocíticos se asocian con moléculas de MHC clase I o clase II, respectivamente, y los complejos de MHC-péptido a continuación son transportados hacia la membrana celular. Tomada de Carbone et al., Nat. Rev. Immunol. 2001.

En contraste, para la presentación de antígeno a células Th se utiliza la vía exógena de procesamiento y presentación de antígeno. Este proceso se lleva a cabo en APC ya que tienen la capacidad de internalizar el antígeno y procesarlo. El antígeno que ha sido endocitado

pasará por una serie de endosomas con un pH cada vez más ácido y por medio de múltiples enzimas proteolíticas será transformado en péptidos de entre 14-25 aa de longitud. Los péptidos generados se unen a las moléculas del MHC II en su camino exocítico en un compartimiento llamado MIIC. Una vez cargadas las moléculas de MHC II con el péptido, estas son transportadas a la membrana celular y reconocidas por las células Th (Figura 4, lado derecho).

Existe una tercera vía alternativa de presentación que solamente células especializadas, como las células dendríticas, utilizan. Está es llamada la vía de la presentación cruzada a las células Tc, que consiste en la presentación de antígenos exógenos en el contexto de las moléculas del MHC clase I (Figura 5). Aunque no se han dilucidado por completo los mecanismos involucrados, existe el consenso que los antígenos endocitados son translocados al citosol para generar péptidos de enlace a la molécula de clase I (Münz, 2019).

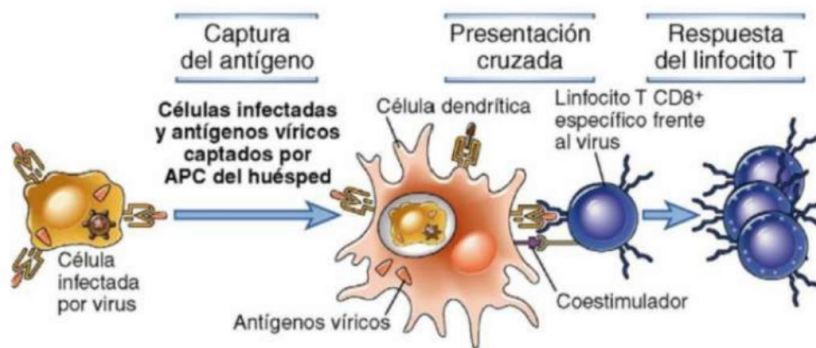


Figura 5.- Presentación cruzada de antígeno a células T. Tomada del libro *Inmunología Básica* Abbas & Litchman. Cap 5, pp. 82-105. APCs: Células presentadoras de antígeno. CTL: linfocito T citotóxico.

1.2.4 Células dendríticas.

Las células dendríticas presentan prolongaciones membranosas largas, semejando a las dendritas de células nerviosas. Esta similitud derivó en el nombre de estas células. Una de sus funciones más importantes es actuar como APC a linfocitos T en las respuestas primarias; esto es, las células dendríticas son indispensables para la activación de células T vírgenes. Estas células tienen cuatro maneras de capturar antígeno (1) por fagocitosis (2) por endocitosis (3) por pinocitosis y (4) por medio de endocitosis mediada por receptor. Una vez que han capturado el antígeno, abandonan los tejidos periféricos y viajan por la circulación hasta llegar a los órganos linfoides en donde presentaran el antígeno procesado a células T. Como APC tienen la capacidad de presentar en su membrana moléculas tanto de MHC clase I como clase II (Ugur y Mueller, 2019).

Las células dendríticas se encuentran en los órganos linfoides secundarios y en los diferentes tejidos del organismo, incluyendo las mucosas. En su estado inmaduro, las células dendríticas se localizan en el tejido periférico ejerciendo su función como captadoras de antígeno. Sin embargo, su capacidad para estimular a las células T es limitado debido a la baja expresión de MHC clase I y clase II, así como moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40 (Figura 6).

En ausencia de infección o de señales inflamatorias, la respuesta de las células dendríticas es básicamente tolerogénica. No obstante, cuando se dan señales inflamatorias, las células dendríticas entran en un estado de maduración aumentando los niveles de las moléculas del MHC I y II, las moléculas coestimuladoras y la expresión de receptores para las quimiocinas como CCR7 y CD62L, induciendo su migración hacia los nodos linfáticos secundarios en donde presentan antígeno a los linfocitos T (Mahnke, 2003).

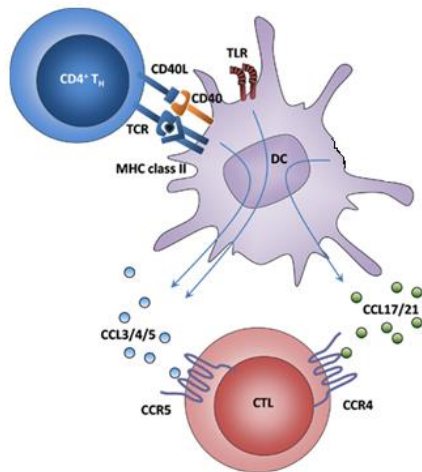


Figura 6.- Célula dendrítica presentando antígeno a linfocito Th. Las APCs, como son los macrófagos y las células dendríticas, engloban patógenos y/o células tumorales y sus productos. Los antígenos son procesados y presentados a las células Th vía las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que interacciona con el receptor de la célula Th (TCR). Las células Th responden secretando citoquinas, que activan otras células inmunes los linfocitos citotóxicos (CTL). Tomada y modificada de Jaime, 2013.

1.2.5 Subpoblaciones de células dendríticas

Las células dendríticas pueden ser clasificadas en tres grandes grupos: células dendríticas plasmacitoides, células dendríticas convencionales y células de Langerhans. Una característica importante es que las células dendríticas se definen por la expresión del marcador CD11c de superficie.

- Células dendríticas plasmacitoides: Este tipo celular, caracterizado por el marcador de superficie CD123⁺, se encuentra usualmente en la circulación sanguínea y son prevalentes en el bazo, el timo, la médula ósea y ciertos tejidos periféricos. Su proliferación está mediada por el factor de diferenciación FLT-3L (McKenna, Beignon y Bhardwaj, 2005). Utilizan receptores tipo Toll como TLR7 y TLR9 en la respuesta contra infecciones virales para producir interferón tipo 1.
- Células dendríticas convencionales: Se encuentran en tejido linfático y periférico y son caracterizadas por presentar el marcador de superficie CD11c⁺. Se subdividen en estacionarias y migratorias. Las células dendríticas migratorias capturan el antígeno y migran desde la piel, el hígado, los pulmones o el tracto gastrointestinal, hacia los ganglios linfáticos. En contraste, las células dendríticas estacionarias carecen de la capacidad para moverse y se quedan en los órganos linfoides (Segura et al., 2012).
- Células de Langerhans: En la piel existen otro tipo de células dendríticas importantes conocidas como células de Langerhans. Se encuentran en la epidermis y son responsables de la captura de antígeno y su presentación en órganos linfoides. Son reconocidas por la expresión de langerina, el cual es un receptor de lectina tipo C (Kaplan, 2010).

En este trabajo, al emplear el término de células dendríticas nos referiremos a las células dendríticas convencionales, a menos que se indique otra cosa.

1.2.6 Receptor DEC-205 y direccionamiento de antígeno a células dendríticas

Las células dendríticas presentan en la membrana plasmática diversos PRRs. Estos receptores reconocen diversos PAMPs presentes en los microorganismos o moléculas extrañas al organismo, lo que le permite sentir el medio ambiente. Dentro de los PRRs se encuentran los receptores de lectina tipo C, que reconocen carbohidratos presentes en los microorganismos o inclusive carbohidratos en las células apoptóticas.

El receptor DEC-205 (Figura 7) es una molécula de 205 kDa compuesta por una sola cadena polipeptídica caracterizada por un dominio N-terminal rico en cisteína, un dominio de fibronectina tipo 2 y un dominio de reconocimiento de diez carbohidratos, así como una secuencia de internalización en su cola citoplasmática. Esta estructura coloca a DEC-205 en la categoría de receptores de lectina tipo C I que reconocen manosa (Shrimpton et al., 2009). Se encuentra presente en altos niveles en el epitelio tímico cortical, así como en diferentes subpoblaciones de células dendríticas periféricas (Langerhans, dermales, intersticiales y de nodos linfáticos) (Figdor, 2002).

Una de las características importantes de DEC-205 es ser capaz de internalizar eficientemente el antígeno (Figura 8). La internalización del antígeno es dependiente de clatrina y dinamina, llevando al antígeno hacia endosomas tardíos o hacia lisosomas, donde es degradado generando péptidos que pueden ser presentados a las células T, tanto en el contexto del MHC clase I como II (Tel et al., 2011). Interessantemente, una vez que DEC-205 deposita el antígeno en los endosomas, es reciclado a la membrana celular, repitiendo el ciclo de captación e internalización de antígeno.

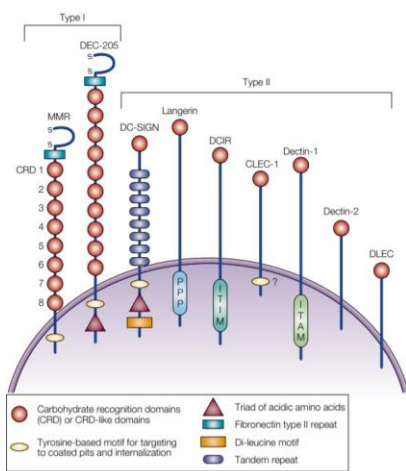


Figura 7.- Receptores de lectina tipo C expresadas por las células dendríticas y las células de Langerhans. Las lectinas de tipo C de tipo I (MMR y DEC-205) contienen una repetición rica en cisteína aminoterminal (S – S), una repetición de fibronectina de tipo II (FN) y 8-10 carbohidratos dominios de reconocimiento (CRD), que se unen al ligando de una manera dependiente de Ca^{2+} . MMR se une al ligando a través de CRD4 y CRD5. Las lectinas de tipo C de tipo II contienen solo una CRD en su carboxilo terminal. Tomado de Figdor, 2002.

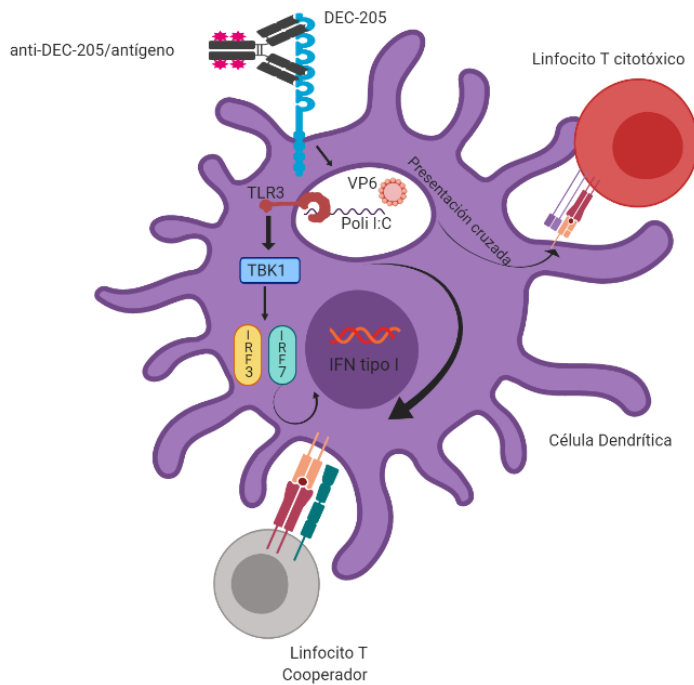


Figura 8.- Internalización de antígeno por medio del receptor DEC-205. En la imagen se aprecia la internalización del antígeno unido a un anticuerpo monoclonal anti-DEC-205, por parte del receptor DEC-205 y su posterior localización en un endosoma tardío, así como su presentación a linfocitos T.

Basado en la capacidad de DEC-205 para endocitar antígeno y que las células dendríticas son indispensables para la inducción de una respuesta primaria de células T, el grupo de Ralph Steinman (Bonifaz et al., 2002) propuso por primera vez dirigir antígenos de manera específica a DEC-205 para eficientar su endocitosis por parte de las células dendrítica y, de esta manera, potenciar la respuesta de las células T. Para esto, se utilizó un anticuerpo monoclonal específico dirigido hacia DEC-205 entrecruzado químicamente con ovoalbúmina (OVA) como antígeno modelo. El conjugado anti-DEC-205-OVA fue inoculado subcutáneamente (s.c.) en presencia de un análogo sintético de RNA de doble cadena (Poli I.C) como adyuvante, encontrando que los niveles de inducción de células T anti-OVA se incrementaba hasta 1000 veces en comparación con la inoculación con OVA sola. Esta fue la primera evidencia que el direccionamiento de antígeno hacia DEC-205 por medio de un anticuerpo monoclonal efectivamente potenciaba la respuesta de las células T.

Los trabajos pioneros sobre el direccionamiento de antígeno a células dendríticas permitió el desarrollo de vacunas experimentales contra agentes infecciosos y cáncer. En nuestro grupo hemos demostrado que el direccionamiento de VP6 de rotavirus por medio de un anticuerpo monoclonal específico para DEC-205 induce una respuesta protectora a nivel intestinal dependiente de células T (Badillo et al., 2015). Asimismo, usando el mismo protocolo con un péptido de la proteína M2 de influenza se encontró que los ratones montaban una respuesta protectora contra la infección dependiente de anticuerpos (Padilla-Quirarte et al., 2019). Por otra parte, se ha reportado que una vacuna de ADN codificante para el dominio de cadena pesada de la neurotoxina serotipo A de *Botulinum* fusionada al fragmento variable de cadena única (scFv por sus siglas en inglés) de un anticuerpo anti-DEC-205, generó una fuerte respuesta humoral y una gran proliferación de linfocitos junto con la maduración de células dendríticas (Chen et al., 2017). Por su parte, estudios realizados con el antígeno SAG1, el cual está presente en la membrana de *T. gondii* (protozooario parásito causante de la toxoplasmosis), usando un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo anti-DEC-205, condujo a un mejoramiento en la respuesta inmune tanto humoral como celular (Lakhrif et al., 2018). Los estudios anteriores son solo algunos ejemplos del uso del direccionamiento de antígeno a DEC-205 en diferentes infecciones como posible alternativa de vacunación.

1.2.7 Sistema inmune de mucosa intestinal.

Una de las entradas principales de agentes patógenos al cuerpo es por medio de la mucosa epitelial del tracto gastrointestinal. Ésta controla su entrada y, de igual manera, regula la absorción de los nutrientes de la dieta, aun estando constituida solo por una capa de células. En parte, este objetivo se cumple debido a la presencia de las uniones estrechas entre estas células ya que impiden que partículas mayores a 2-kDa penetren el epitelio intestinal y puedan ocasionar infecciones. De igual manera, existen diferentes adaptaciones protectoras que no se encuentran en sitios ajenos al epitelio gastrointestinal. Un ejemplo de esto es la presencia de los péptidos antimicrobianos, entre ellos las defensinas, los cuales causan la muerte de los microbios por medio de su internalización a la membrana y posterior formación de poros. Por otra parte, las células especiales localizadas en sitios inductores del tejido linfático asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés) denominadas células M, son las que se encargan de buscar patógenos potenciales provenientes de la ingesta. Las células M transportan a los patógenos internalizados hacia las células dendríticas que se encuentran en el domo sub-epitelial por medio de transporte vesicular trans-epitelial. Además de las células M, las células dendríticas intraepiteliales también pueden captar antígenos a través de la barrera epitelial, éstas externan su citoplasma hacia el lumen intestinal con el objetivo de captar patógenos sin que se rompa la barrera epitelial, esto debido a que ambos tipos celulares expresan en sus membranas uniones estrechas, lo que mantiene la protección intestinal (Rescigno., et al., 2001). Las células dendríticas captan el antígeno que transportaron las células M, lo procesan, y posteriormente migran hacia la placa de Peyer donde residen linfocitos B y T y donde les presentan los péptidos procesados en el contexto de MHC clase I y clase II. Los linfocitos una vez activados, salen de la placa de Peyer para dirigirse a los ganglios linfáticos mesentéricos, pasan por la linfa y, finalmente, llegan a la circulación sanguínea alojándose en los ganglios linfáticos periféricos y/o regresan a la lámina propia intestinal para ejercer su función efectora (Nagler, 2001).

Por su parte, en la lámina propia se encuentran primordialmente células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina A (IgA), proteína que es secretada en grandes cantidades en forma

de dímero en la mucosa, contrastando con su forma monomérica en sangre. Al receptor polimérico de inmunoglobulinas presente en la porción bazo lateral de la mucosa epitelial se le une la IgA y, posteriormente, es endocitada y transportada hasta la zona apical en donde será excretada hacia el lumen intestinal. La IgA ejerce tres niveles de protección al sistema intestinal: 1) regula la protección contra patógenos en el lumen intestinal al ser secretado en grandes cantidades impidiendo que los patógenos hagan contacto con la mucosa epitelial; 2) en su paso a través de la célula epitelial, la IgA capta antígenos que se localicen dentro de la célula y los traslada fuera de éstas; 3) igualmente, puede captar antígenos desde la lámina propia y excretarlos hacia el lumen, contribuyendo a la limpieza de la zona (Robinson et al., 2001).

1.2.8 Sistema inmune de mucosa nasal

En los conductos nasales tanto de humano como de ratón se organizan tejidos linfoides. Los humanos cuentan con un complejo anillo de Waldeyer el cual es un conjunto de estructuras compuestas por tejido linfóide situadas en la faringe, cuya función es la protección y defensa de la entrada a las vías aérea y digestiva. Estas estructuras colectivamente forman lo que se conoce como NALT (Nasal-associated lymphoid tissue, por sus siglas en inglés) (Figura 9), mientras que los ratones poseen tejidos linfoides asociados a la nariz. Los NALT son dos estructuras paralelas en forma de campana ubicadas en los conductos nasales por encima del paladar duro, y generalmente se consideran componentes secundarios del sistema linfóide asociado a la mucosa.

Las superficies de la amígdala están cubiertas por epitelio especializado de las criptas. Las criptas penetran en el tejido linfóide subyacente para formar una malla, permitiendo un estrecho contacto entre el mundo exterior, las células dendríticas y los linfocitos dentro de las amígdalas. Dentro de la NALT se encuentran compartimentos discretos de linfocitos B y T intercalados con células dendríticas presentadoras de antígenos. Estas células están rodeadas por una capa de células epiteliales intercaladas con células M que son responsables de la recuperación de antígenos de las

superficies mucosas de las vías respiratorias. Los linfocitos naive que circulan a través del NALT están preparados para responder a los primeros encuentros con patógenos respiratorios.

Las células epiteliales de la cripta expresan quimiocinas como CCL20 y atraen células dendríticas inmaduras. Dentro de estas estructuras linfoides, se encuentran distintos tipos de células dendríticas. Se han encontrado al menos 5 subtipos de células dendríticas en las amígdalas en humanos HLA-DR^{hi}CD11c⁺, HLA-DR^{mod}CD11c⁺ CD13⁺, HLA-DR^{mod}CD11c⁻ CD123⁻ y pDC HLA-DR^{mod}CD11c⁻ CD123⁺ CD4⁺. Dentro de este epitelio, las CDs inmaduras forman conjugados con las células B, pero no con células T (Iwasaki, 2007).

Dentro del NALT, las **CDs** son las APC predominantes que estimulan la respuesta de linfocitos citotóxicos cuando se administra un antígeno en presencia de toxina de cólera como adyuvante.

Comentado [T3]: Tienes que definir la abreviación la primera vez que aparezca en la tesis y usarla a lo largo de todo el escrito.

Mientras que las NALT desaparecen en los humanos a la edad de dos años, el anillo de Waldeyer y los órganos linfáticos de estructura similar continúan persistiendo durante toda la vida. A diferencia de los humanos, los ratones retienen NALT durante toda la vida, lo que proporciona un modelo animal conveniente para el estudio de las respuestas inmunitarias que se originan en los senos nasales (Cisney et al., 2012).

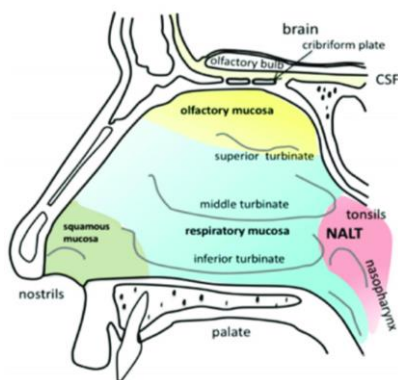


Figura 9.- Anatomía de la cavidad nasal humana. Tomada de Gänger and Schindowski, 2018.

1.2.9 Respuesta inmune contra rotavirus.

Rotavirus infecta exclusivamente a los enterocitos del intestino delgado, por lo tanto, la respuesta inmune intestinal desempeña un papel importante contra el patógeno (Figura 10). Las infecciones que se ocasionan por patógenos intestinales como rotavirus, se eliminan principalmente por células del sistema inmune adaptativo. Dichas células se localizan en órganos linfoides asociados a la mucosa del intestino, constituida por Placas de Peyer (PP), lámina Propia (LP) y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM). En PP y GLM se activan células Tc, células Th y células B (Nagler, 2001) y, migran a la LP. Su direccionamiento tan específico es debido a que en la membrana de los linfocitos se encuentra presente el heterodímero de las integrinas $\alpha 4\beta 7$ y de la quimiocina CCR9 específicos para GALT (Svensson et al., 2002; Kunkel y Butcher, 2003); los cuales, participan en la contención y eliminación de los patógenos. Así mismo, las células T también pueden migrar de la LP al compartimiento intra-epitelial funcionando como linfocitos intraepiteliales (LIE), que son capaces de contribuir en la eliminación de las infecciones. En una infección natural por rotavirus los anticuerpos intestinales IgA desempeñan un papel central en la eliminación y contención de una infección primaria, así como en la prevención de una infección secundaria por el mismo serotipo. En la eliminación de la infección participan las células Tc, en la proliferación y diferenciación de las células B y Tc son las células Th quienes contribuyen en este proceso (Angel et al., 2012). Recientemente se ha reportado que las células epiteliales intestinales, las cuales son blanco de la infección, producen INF- β y IFN- λ , los cuales podrían ser determinantes para contener la infección (Hernandez et al., 2015). Por consiguiente, es evidente que, en una infección natural, el mecanismo de protección es multifactorial, implicando tanto la respuesta inmune adaptativa como la innata. Sin embargo, se desconoce cabalmente si la protección inducida por las vacunas en contra de rotavirus podría ser similar a la infección natural (multifactorial) o presentar una combinación diferente de los mecanismos antes mencionados.

Comentado [T4]: Ya las habías mencionado y no definiste la abreviación

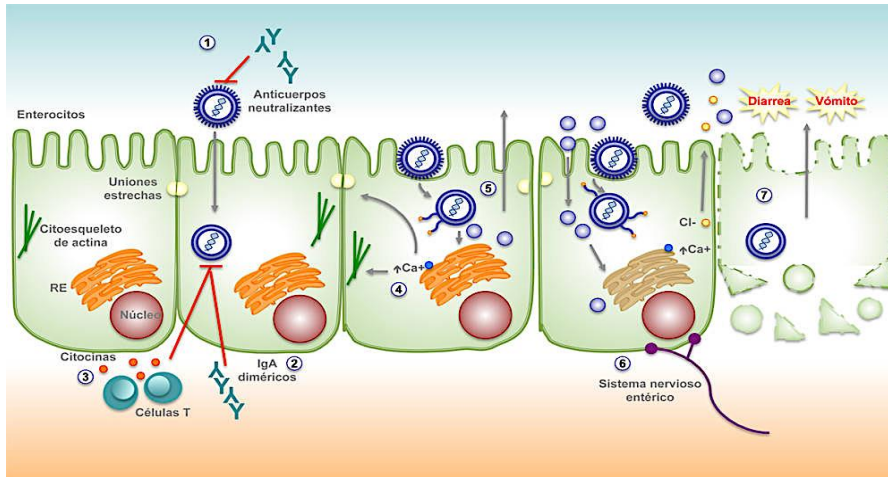


Figura 10.- Respuesta inmune contra rotavirus. 1) Infección de los enterocitos maduros por rotavirus. 2) IgAs actúan como medio de neutralización directa siendo la primera línea de defensa a la infección primaria. 3) Células presentadoras de antígeno por acción de interferón tipo 1, presentan al antígeno a las células T y B iniciando la expansión clonal. 4) La pérdida de la capa exterior inicia la transcripción de las proteínas virales. Estas se acumulan en el citoplasma y, por medio de las proteínas NSP2 y NSP5, son internalizados en viroplasmos. 6) Adquisición de la capa intermedia y finalmente en el retículo endoplásmico son agregadas las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa. 7) Rotavirus induce el aumento de los niveles de calcio, provocando la salida de agua e iones cloro de la célula. El virión sale de la célula causando lisis de los enterocitos provocando malabsorción intestinal y por tanto diarrea aguda. Tomado de: <https://vanguardia.com.mx/articulo/investigacion-mexicana-avanza-en-el-entendimiento-de-la-naturaleza-del-rotavirus>

1.2.10 VP6 como antígeno modelo de vacunación

VP2 y VP6 son las proteínas más conservadas en todas las cepas de rotavirus reportadas, porque las hace excelentes candidatas para generar vacunas heterotípicas. De estas dos proteínas, solamente VP6 ha demostrado ser altamente inmunogénica, además de ser un blanco importante de células Th, Tc y anticuerpos (Franco et al., 2006; Ward y McNeal, 2010). Se ha demostrado en

modelos animales como, ratón y cerdo, que VP6 soluble o multimérico (Esquivel et al., 2000; Choi et al., 2002, Palomares et al., 2007), péptidos de VP6 (Choi et al., 2000), partículas seudovirales compuestas de VP2/6 (VLP) (O'Neal et al., 1997; Shuttleworth et al., 2005; Perez et al., 2005) y VP6 expresado *in vivo* por vacunación con DNA (Yuan et al., 2005; Choi, et al., 2002; Lopez-Guerrero et al., 2018) pueden inducir una protección contra la infección por rotavirus de manera tanto homotípica como heterotípica. Esta protección puede ser inducida tanto por la vía parenteral como la vía de mucosa, aunque la vía de mucosa es claramente más efectiva (Pasetti Marcela, et al., 2011).

Recientemente, en un trabajo previo del laboratorio, se demostró que VP6 puede inducir una eficiente protección cuando es direccionado hacia las células dendríticas (Badillo et al., 2015). En este estudio, ratones BALB/c que fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) dos veces con 1.5 µg de VP6 enlazado químicamente al anticuerpo monoclonal de rata NLDC-145, específico para DEC-205 de ratón, mostraron una protección a nivel intestinal contra la infección por rotavirus de aproximadamente un 40 %. Contrario a los ratones que fueron inoculados con las mismas cantidades de VP6 o anti-DEC-205 acoplado a la proteína irrelevante OVA, donde no se presentó protección. Se asume que la capacidad protectora del conjugado anti-DEC-205:VP6 muy probablemente fue debida a la distribución sistémica del conjugado, su captación específica por las células dendríticas de los órganos linfoides intestinales y, la subsecuente, inducción de células T a nivel de mucosa intestinal (Bonifaz et al., 2004). Sin embargo, se desconoce si la protección contra rotavirus inducida por la vacunación s.c. con el conjugado anti-DEC-205:VP6 puede mejorarse al emplear como vía de inducción la mucosa nasal, o si la protección es dependiente de la respuesta humoral, celular o de ambas.

2 Planteamiento del Problema y Justificación

Los rotavirus son una causa común de gastroenteritis aguda en humanos y representan un serio problema de salud pública. El último muestreo global llevado a cabo en el 2015, estimó que 215,000 infantes perdieron la vida a causa de este patógeno (WHO, 2015; Tate et al., 2008). Actualmente existen dos vacunas contra rotavirus (Rotarix[®] y RotaTeq[®]), sin embargo, su eficacia es relativamente baja en países de África sub-sahariana y algunos países del sur de Asia (Angel, Franco y Greenberg, 2012). Además, estas vacunas están hechas con virus atenuados y se teme el surgimiento de rearreglos entre la cepa vacunal y la silvestre que resulten más virulentos, así como el surgimiento de cepas con genotipo diferente producto de zoonosis y para las cuales no sean efectivas las vacunas actuales. Por lo tanto, las vacunas comerciales existentes no ofrecen una respuesta de salud, sobre todo en países de bajos ingresos, donde ocurren el mayor número de efectos severos y mortales, como consecuencia de la pobreza. Es por eso por lo que se considera que el desarrollo de nuevas vacunas contra rotavirus es una necesidad apremiante, sin embargo, consideramos que es necesario implementar estrategias diferentes a las vacunas actuales. En este sentido, se propone generar protección mediante virus inactivados, partículas pseudovirales (VLPs), proteínas virales o subunidades de proteínas virales, en conjunto con un potente adyuvante (Angel, Franco y Greenberg, 2007).

Por lo anterior, consideramos que resulta pertinente realizar estudios sobre nuevos mecanismos que intervengan en la protección contra rotavirus (sobre todo una protección heterotípica). En un trabajo previo del laboratorio se encontró que ratones vacunados subcutáneamente (s.c) con VP6 direccionado a la molécula DEC-205 presente en las CDs por medio de un anticuerpo monoclonal indujo hasta 45% de protección contra la infección por rotavirus. Aunque la vacuna indujo anticuerpos séricos anti-VP6, no indujo anticuerpos IgA a nivel intestinal, por lo que es muy probable que la protección fue mediada por células T. Estos resultados demostraron que la vacunación parenteral con un conjugado anti-DEC-205:VP6 puede inducir protección a nivel intestinal; situación contraria a lo que se observó con VP6 solo, que indujo anticuerpos séricos pero no protección contra la infección. Estos estudios sugieren que, a pesar de

que la vía de inducción fue parenteral, la inmunización para VP6 mediante el direccionamiento a DEC-205, favorece para que el sistema induzca protección en la mucosa intestinal.

Por otra parte, la cantidad de VP6 administrado fue de 1.5 μg en dos dosis, lo cual parece ser bastante bajo. Sin embargo, en el estudio referido no se determinó la dosis óptima a inocular, por lo que se ignora si hay un efecto dependiente de la dosis. Asimismo, no se evaluó en detalle las características, tales como títulos y perfil de isotipos, de los anticuerpos séricos.

Por otro lado, resulta muy importante comparar la respuesta de ratones inoculados parenteralmente con el conjugado con la respuesta cuando el conjugado es inoculado en una mucosa como i.n., ya que, de acuerdo con los antecedentes en la literatura, se esperaría inducir una respuesta inmune más potente, sin embargo, sólo se podrá confirmar hasta realizarse un estudio comparativo entre las dos vías de vacunación. De esta manera, en este trabajo nos proponemos comparar la respuesta inmune contra rotavirus en ratones vacunados s.c. o i.n. con diferentes dosis del conjugado anti-DEC-205:VP6 y, de esta manera, determinar la mejor ruta de inmunización.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la protección y la respuesta inmune humoral contra rotavirus inducida por VP6 direccionado a DEC-205 administrado por la vía parenteral o i.n. en un modelo de ratón.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Comparar los niveles de anticuerpos séricos anti-VP6 en ratones vacunados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 s.c. o i.n. a diferentes dosis.
- 2.- Comparar los niveles de protección contra la infección por el rotavirus murino EDIM inducidos en ratones vacunados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 s.c. o i.n. a diferentes dosis.
- 3.- Comparar los niveles de anticuerpos intestinales IgA anti-VP6 en ratones vacunados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 s.c. o i.n. a diferentes dosis y retados con un el rotavirus murino EDIM.

4 HIPOTESIS

La vacunación i.n. con el conjugado anti-DEC-205:VP6 inducirá una mejor respuesta inmune protectora y humoral contra rotavirus, tanto a nivel sistémico como en la mucosa intestinal, que la vacunación parenteral.

5 MATERIAL Y METODOS

5.1 Diseño experimental. - Grupos de 3-4 ratones hembras BALB/c (H-2^d) de 5 a 8 semanas de nacidos libres de patógenos (Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM y bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública), se inocularon s.c. o i.n. con el conjugado anti-DEC-205:VP6 equivalente a 130, 400 o 800 ng de VP6, en presencia de 50 µg de Poli I:C (agonista de TLR.3) como adyuvante en el caso de la inmunización s.c y 2.5 µg de toxina de cólera para la inmunización i.n. Como controles, se incluyeron grupos de ratones inoculados con Poli I:C y anti-DEC-205, o toxina de cólera y anti-DEC-205 respectivamente.

5.2 Producción y purificación del anticuerpo monoclonal NLDC. - El hibridoma de rata IgG2a NLDC-145 (anti-DEC-205 de ratón) (Bonifaz et al., 2004) (Donado por la Dra. Laura Bonifaz Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS) se cultivó en 500 ml de medio libre de suero CD Hybridoma (GIBCO), en frascos de 1 litro con agitador magnético (Bellco Glass, INC) en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂. Una vez que se alcanzó la saturación máxima celular y un 50 % de mortalidad, se centrifugaron las células y los anticuerpos en el sobrenadante condicionado se purificaron por medio de una columna de sefarosa G (GE, Health Care). Se determinó la concentración del anticuerpo por un ensayo de ácido bicinchonínico (BCA) (Thermo Scientific) y se almacenaron alícuotas a -80 °C hasta su uso.

5.3 Entrecruzamiento del anticuerpo monoclonal NLDC con rVP6Ew. - El anticuerpo monoclonal NLDC anti-DEC-205 se entrecruzó con VP6 recombinante del rotavirus Ew (rVP6_{Ew}) por el método de Traut/SMCC (PIERCE) como se reportó previamente (Badillo et. al., 2015). El conjugado se purificó por medio de una columna superdex 75, se concentró en un filtro de Amicon 10 kDa y se analizó el producto por un gel de acrilamida.

5.4 Western blot. - Para constatar la presencia de la partícula viral VP6 en el entrecruzado anti-DEC-205:VP6. Para esto se realizó una electroforesis en la que se colocaron VP6 purificado, el entrecruzado anti-DEC-205:VP6, así como el anticuerpo solo anti-DEC-205. Estas muestras se colocaron tanto en condiciones no reductoras como en condiciones reductoras usando β -mercapto etanol. Finalizando la electroforesis, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (PerkinElmer) en una cámara de transferencia (Biorad). Para esto se usó buffer de transferencia (34 mM Tris, 276 mM Glicina y 162 ml de etanol absoluto por cada 700 ml de buffer) y una corriente de 200 mA por 1 hr. Al término de la transferencia, la membrana se bloqueó con PBS/Tween 0.05%/10% de leche en polvo descremada (Carnation) (solución de bloqueo) 30 min a temperatura ambiente. Con la membrana ya bloqueada, se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05%/10% por 10 min cada lavado. Finalizando los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo de conejo anti-RRV 1/5000 en solución de bloqueo por 1 hr a temperatura ambiente. Se procedió a realizar 4 lavados con PBS/Tween 0.05%/10% por 10 min cada lavado y finalmente se realizó una segunda incubación con el anticuerpo de cabra anti-conejo (Dako) acoplado a peroxidasa 1/5000 en solución de bloqueo. Para revelarlo se usó el Kit de Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) con 50 μ l de solución luminol y solución oxidativa 1:1 por cada cm^2 de membrana, se dejó reaccionando por 1 min y se reveló en oscuridad.

Comentado [T5]: Poner lugar de producción

5.5 Inmunización de ratones y reto con rotavirus murino EDIM. – Como se mencionó anteriormente, se utilizaron ratones hembra BALB/c de 5-8 semanas de nacidos, libres de patógenos, proporcionados por los Bioterios del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (IBT-UNAM) y del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Los ratones se mantuvieron en un ambiente estéril en cajas con filtro. Para sacrificarlos, se optó por la dislocación cervical.

Grupos de 3-4 Ratones se inocularon s.c. en la espalda o i.n. con el conjugado anti-DEC-205:VP6 equivalente a 130, 400 o 800 ng de VP6 y 50 µg de Poli I:C o 2.5 µg de toxina de cólera como adyuvante o con las mismas cantidades de anti-DEC-205 (como control negativo) y 50 µg de Poli I:C o 2.5 µg de toxina de cólera como adyuvante. Al día 21, recibieron un refuerzo conteniendo las mismas cantidades de acuerdo con su grupo y al día 40 fueron retados con rotavirus como a continuación se describe.

Los ratones fueron retados oralmente con 100 µL de DMEM conteniendo 1×10^4 unidades formadoras de focos (UFF) del rotavirus murino EDIM wt con una aguja de alimentación para ratones de punta roma, con previa administración de 100 µL de agua con bicarbonato de sodio al 1.33 % (para neutralizar los ácidos estomacales). Estudios previos hechos por Ward, McNeal y Sheridan (1992) han encontrado en este modelo de infección de ratón adulto que los virus murinos se excretan en las heces desde el día 2 y hasta los días 5-6, para después a los días 7 y 8 desaparecer por completo de las heces. De esta manera, se coleccionarán muestras de heces a partir del día 0 y diariamente hasta el día 8, para posteriormente determinar replicación viral a través de la carga antigénica presente en las heces usando un sistema de ELISA de captura (Esquivel F. R. 2000). Para evaluar la inmunogenicidad de los antígenos, los ratones se sangraron a los días 0, 21 y 40 para analizar los niveles de anticuerpos anti-VP6 en suero por ELISA.

5.6 Detección de rotavirus en las heces. - Las heces fueron descongeladas y resuspendidas al 5% (peso volumen) en buffer diluyente (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5% de suero fetal bovino, 0.05% Tween-20 y 10 mM azida de sodio) y se almacenaron toda la noche a 4° C. Al siguiente día, las muestras fueron agitadas en vórtex y centrifugadas a 14,000 rpm por 5 min, se obtuvo el sobrenadante y se determinó la carga antiviral por un ensayo de ELISA de captura. Para esto, microplacas de 96 pozos de fondo redondo (Costar Alta adherencia), fueron cargadas con 50 µL de TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) una dilución 1:2500 de un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra contra varias cepas de rotavirus como anticuerpo de captura y se incubaron toda la noche a 4° C. Al día siguiente se lavaron las placas 2 veces con TNC/Tween 0.05% (solución de lavado) y se bloquearon con 150 µL de TNC/5% de leche en polvo descremada

(Carnation)/Tween 0.05% (solución de bloqueo) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 2 veces, se agregaron 50 μ L del sobrenadante de la suspensión de heces por duplicado y se incubaron por 2 horas a 37° C. Se lavaron 4 veces, y se adicionaron 50 μ L de solución de lavado con un anticuerpo policlonal hiperinmune de conejo anti-rotavirus RRV diluido 1:500 y se incubó por 1 hora a 37° C. Posteriormente se lavaron 4 veces y se adicionaron 50 μ L de una dilución de 1:2000 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) y se incubó por 1 hora a 37° C. Se lavaron 4 veces y se adicionaron 50 μ L de sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio; Sigma) diluido 1:100 en DAE (0.1% Dietanolamina, 1 mM MgCl, 0.029% Azida de sodio). La reacción se llevó a cabo de 30 min a 1 hora a 37° C y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Bio-Tek instruments inc.). Como control positivo se utilizó lisado de células MA-104 infectadas con el rotavirus RRV y como control negativo DMEM o buffer diluyente.

5.7 Detección de anticuerpos contra VP6 en suero por ELISA. - Las muestras de sangre de cada ratón se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 min en una microcentrífuga, se colectó el suero y se almacenó a -20° C hasta su uso. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo redondo (Costar Alta adherencia) las cuales fueron cargadas con 50 μ L de PBS con una dilución 1:2500 de un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra contra varias cepas de rotavirus como anticuerpo de captura y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 2 veces con PBS/Tween 0.05 % (solución de lavado) y se bloqueó con 150 μ L de PBS/ 5 % leche descremada en polvo (Carnation)/Tween 0.05 % (solución de bloqueo) por 2 hr a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces, y se agregaron 50 μ L de un lisado de células infectadas MA-104 con el rotavirus RRV y se incubaron por 2 hr a 37°C. A continuación, se lavaron 4 veces, y se adicionaron por duplicado 50 μ L de los sueros de ratones inmunizados diluidos 1:200 en PBS y se incubaron 1 hr a 37° C. Se lavaron 4 veces, y se adicionaron 50 μ L de TNC con un anticuerpo policlonal de cabra anti- Ig's de ratón acoplado a Peroxidasa (Dako) a una dilución 1:2500 y se incubaron 1 hr a 37° C. Se lavó 4 veces y se adicionaron 50 μ L de sustrato PNPP 1:100 en dietanolamina al .1%. Se leyó la absorbancia a 405 nm a los 30, 45 y 60 min en lector de placas en lector de placas (Bio-Tek instruments inc.). Como control positivo se usó suero de ratones inmunizados del grupo control a los 21 días después del

reto y como control negativo se utilizó PBS. En todos los casos el valor negativo sin antígeno será restado a toda la placa.

5.8 Detección de IgA contra rotavirus en heces. - Se utilizaron microplacas de fondo redondo (Costar Alta Adherencia) y fueron cargadas con 50 μ L de de buffer TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂) junto con una disolución 1:2500 de un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra contra varias cepas de rotavirus como anticuerpo de captura y se incubó toda la noche a 4° C. Al día siguiente se lavaron las placas 2 veces con TNC/Tween 0.05% (solución de lavado) y se bloquearon con 150 μ L de TNC/5% de leche en polvo descremada (Carnation)/Tween 0.05% (solución de bloqueo) por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces, y se agregaron 50 μ L de un lisado de células infectadas MA-104 con el rotavirus RRV y se incubaron por 2 hr a 37°C. A continuación, se lavaron 4 veces, y se adicionaron por duplicado 50 μ L del sobrenadante de la suspensión de heces por duplicado y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Posteriormente se lavaron 4 veces y se adicionaron 50 μ L de una dilución de 1:1500 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgA de conejo acoplado a peroxidasa. Se lavó 4 veces y se reveló como previamente se describió, la absorbancia a 492 nm se leyó en un lector de placas (Bio-Tek Instruments Inc.). Como control negativo se utilizó TNC.

5.9 Análisis estadístico. – Los experimentos se realizaron al menos en 2 ocasiones de manera independiente. Los datos se procesaron en el programa Excel y se expresaron como la media +/- la desviación estándar. La significancia de la diferencia entre los grupos experimentales se determinó a través de un análisis de comparaciones múltiples ANOVA. Una vez que se determinaron diferencias entre las medias, se aplicó la prueba de Tukey como prueba post-Hoc, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Todas las pruebas fueron calculadas por el software Prisma 8.0 (GraphPad Software In. LA Jolla, CA).

6 RESULTADOS

6.1 Producción y purificación del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205.

Para la producción del anticuerpo monoclonal anti-DEC 205, se cultivó el hibridoma NLDC 145 en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina, 5×10^{-5} M β -2-mercaptoetanol y 10 μ g/ml gentamicina. El cultivo se adaptó paulatinamente al medio CD Hybridoma libre de suero para finalizar con una concentración de SFB del 1%. De esta manera, se disminuyó la cantidad de proteína contaminante proveniente de suero. Una vez finalizado el periodo de adaptación el cultivo fue expandido y una vez que se encontrara un 80% de mortalidad de las células del hibridoma, el sobrenadante rico en anticuerpos se colectó.

Para la purificación del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205, se utilizó una columna de proteína G con afinidad por la región Fc del anticuerpo. La columna se lavó con un buffer de fosfato de sodio (20mM, pH 7) y el sobrenadante se recirculó por la columna por 6 h. Posteriormente, la columna se lavó con el buffer de fosfato de sodio y el anticuerpo pegado a la columna se eluyó con glicina 0.1 M (pH 2.7). Se recolectaron 28 fracciones de 1 ml en tubos de poliestireno previamente cargados con 50 μ L de Tris-base (pH9). Finalmente, se leyó la absorbancia a 280 nm de las fracciones (Figura 11). Se seleccionaron las fracciones 10 a 20 que presentaron los mayores niveles de absorbancia, y se mezclaron. La mezcla fue concentrada por medio de un filtro Amicon (Millipore) con un corte de 50 kDa y el contenido de proteína cuantificada por el método de BCA. Se obtuvo un total de 4 mg de anticuerpo monoclonal anti-DEC-205. Estos se dividieron en 4 alícuotas de 500 μ g y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

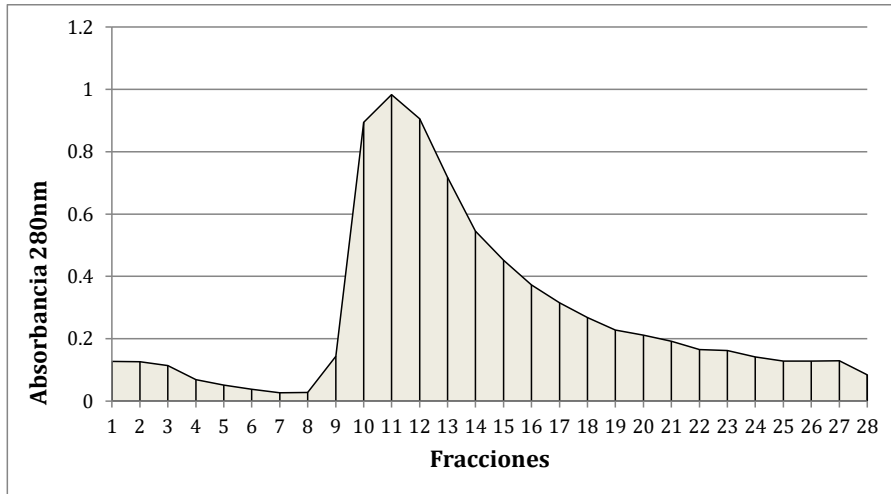


Figura 11.-Absorbancia de las fracciones obtenidas del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 NLDC-145. Se colectaron las fracciones 10-20 las cuales mostraron una mayor absorbancia, obteniendo aproximadamente 10 ml. Estas fracciones fueron concentradas usando filtros Amicon de 50 kDa.

Para verificar la identidad y pureza del anticuerpo monoclonal, 5 µg de esta proteína fueron evaluados por SDS-PAGE al 10 %. Tanto en condiciones no reductoras como reductoras. Como se observa en la Figura 12, en condiciones reductoras se observó una banda predominante de 150 kDa, mientras que en condiciones reductoras se observaron dos bandas, una de 50 kDa y otra de 25 kDa que corresponden a la cadena pesada y ligera, respectivamente. De esta manera, se corroboró que la preparación del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 está altamente enriquecida en anticuerpo y las impurezas o degradación está a nivel de trazas (100-130, 72 y 36 kDa).

Comentado [T6]: Esto te pidieron que lo pusieras?

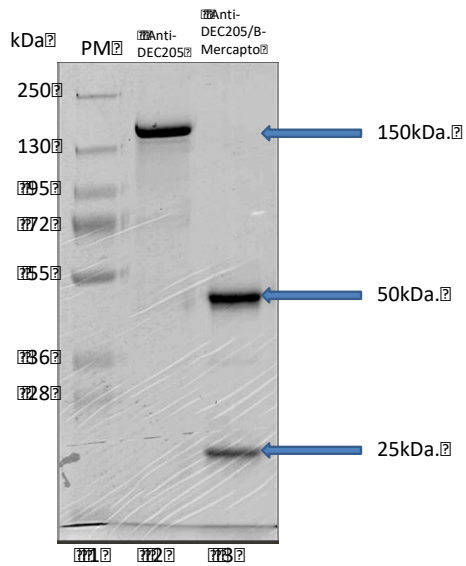


Figura 12. Determinación de la integridad de anti-DEC-205. Análisis por SDS-PAGE al 10% del anticuerpo en condiciones reductoras y no reductoras. El gel se fijó y tiñó con azul de Comassie. Se logra visualizar en el gel la banda de 150 kDa correspondiente al anticuerpo (carril 2), así como las bandas de 50 kDa y 25 kDa pertenecientes a las cadenas pesada y ligera respectivamente en condiciones reductoras (carril 3). Por debajo de la banda de 150 kDa se aprecia un barrido de la muestra, lo que sugiere una leve contaminación de la muestra o degradación del anticuerpo.

6.2 Generación del conjugado anti-DEC205:VP6

Con la finalidad de entrecruzar el anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 con la proteína viral VP6 recombinante de rotavirus, se usó el método de SMCC /Traut (PIERCE) como se reportó previamente (Badillo et. al., 2015). La proteína VP6 recombinante fue sintetizada y purificada *in*

vitro por el Dr. Oscar Badillo (CISEI, INSP). Para esto, se activó tanto el anticuerpo monoclonal antiDEC205 (350 µg) como la proteína viral VP6 (350 µg) con SMCC (Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) y reactivo de Traut (2-iminothiolano), respectivamente. Una vez activadas las moléculas, se procedió a dializarlos separadamente en una membrana de nitrocelulosa con un poro de 3.5 kDa para remover el exceso de sales. Finalmente, los dos reactivos se mezclaron y se dejaron toda la noche en incubación a 4° C. Pasado este tiempo, se dializó en una membrana con un poro de 100 kDa para remover el exceso de VP6 no entrecruzado. Se realizaron 4 ensayos de conjugación y se cuantificó la cantidad de proteína de cada ensayo por el método de BCA y se almacenaron las preparaciones a -80 °C hasta su uso. La evaluación de los conjugados se llevó a cabo por SDS-PAGE al 10%.

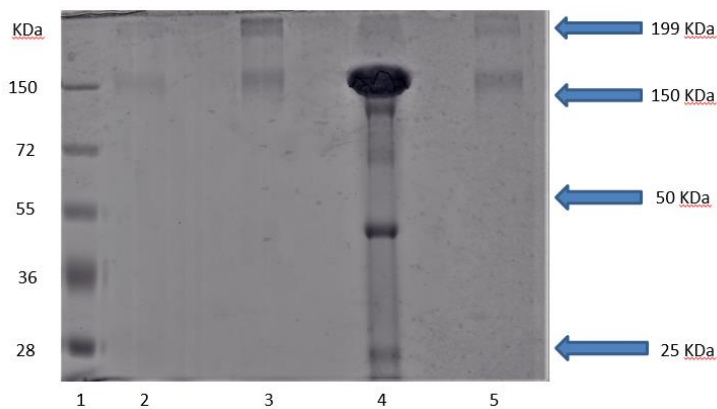


Figura 13. - Caracterización de los conjugados anti-DEC-205:VP6. Análisis por SDS-PAGE al 10 %. Los conjugados anti-DEC-205:VP6 se colocaron de esta manera: Carril 1-marcador de peso molecular; Carril 2- Conjugado 4 (4.2 µg); Carril 3-Conjugado 3 (3.6 µg); Carril 4- Conjugado 1 (79.8 µg); Carril 5- Conjugado 2 (3.3 µg).

Como se puede apreciar en la Figura 13, en los carriles 2-5 se observa la banda de 150 kDa, correspondiente al anticuerpo monoclonal anti-DEC-205. Sin embargo, también se observa un barrido con un peso molecular de 199 kDa, lo cual puede corresponder con el complejo anti-DEC-205:VP6. En base a la relación de intensidad entre las bandas de 150 kDa y 199 kDa, se

puede sugerir que las preparaciones 2 y 3 fueron más exitosas dado que su proporción fue similar. Por su parte, la preparación 1, a pesar de contar con una cantidad grande de proteína, la proporción de la banda de 199 kDa es minoritaria, sugiriendo una baja formación del conjugado. Hay que hacer notar que las bandas suplementarias con peso menor a 150 kDa fueron observadas debido al exceso de proteína.

Una vez determinada la presencia de los conjugados por SDS-PAGE, era indispensable confirmar la presencia de VP6 en el conjugado anti-DEC-205:VP6. Para esto se realizó un western blot para VP6, para lo cual las muestras se evaluaron en condiciones no reductoras. En la Figura 14 se puede observar en el carril correspondiente a VP6 purificada una banda inmunoreactiva de 45 kDa. Asimismo, en el carril correspondiente se aprecia una banda de aproximadamente 250 kDa que corresponde al entrecruzado anti-DEC-205:VP6, así como una banda de 45 kDa correspondiente a VP6 purificado. El anticuerpo anti-DEC-205 no generó ninguna señal. Este resultado sugiere que el conjugado anti-DEC-205:VP6 contiene al menos un molécula de VP6.

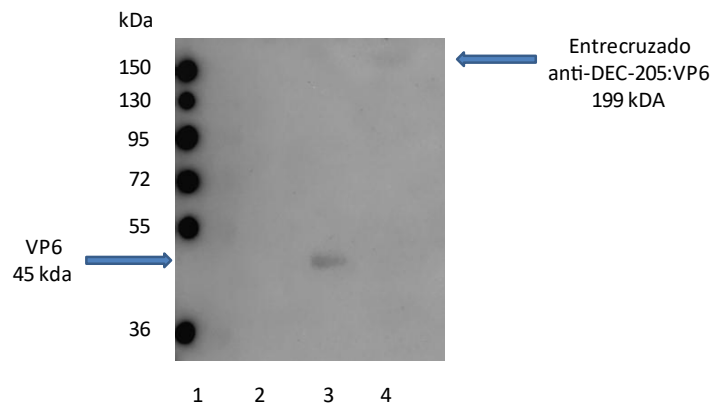


Figura 14. – Western Blot contra VP6. Se corrieron muestras de proteína en un gel SDS-PAGE al 10 % y se realizó un western blot usando un anticuerpo de conejo anti-RRV seguido de un anticuerpo anti-conejo IgG HRP. Carril 1: pesos moleculares. Carril 2: anti-DEC-205 solo. Carril 3: VP6. Carril 4: anti-DEC-205:VP6.

6.3 Inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 entrecruzado con VP6 y comparación de la vía de administración.

Una vez que se obtuvieron los conjugados anti-DEC-205:VP6, se evaluó su capacidad para inducir una respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus en ratones, así como la comparación entre las vías s.c. e i.n.

Para la vía de administración s.c. se realizaron dos experimentos, administrándose 130 ng o 400 ng de VP6 conjugado a anti-DEC-205. Ambos en presencia de 50 µg de Poli I:C como adyuvante. Como grupo control, se inmunizaron 3 ratones únicamente con el anticuerpo anti-DEC-205 y 50 µg de Poli I:C. La segunda inmunización se realizó el día 21 bajo las mismas condiciones. Al día 40 del inicio del experimento, los ratones se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM para evaluar la carga viral. Los días 0, 21 y 40 se tomaron muestras de suero para evaluar los anticuerpos anti-VP6.

Para evaluar los niveles de anticuerpos séricos contra VP6 se realizó un ensayo de ELISA de captura usando lisados de células MA-104 infectadas con rotavirus RRV como antígeno. Como se observa en la Figura 15, se encontró que sólo los ratones inmunizados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 al día 40 presentaron altos niveles de anticuerpos comparados con los animales inmunizados sólo con anti-DEC-205 más Poli I:C (Figura 15A y B). Como control positivo del ensayo se utilizó suero obtenido de un ratón infectado (día 12 postinfección).

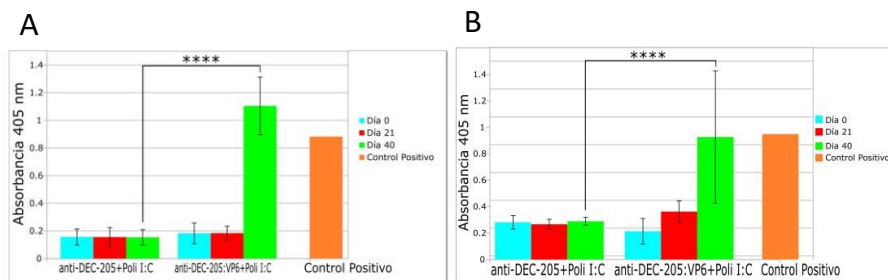


Figura 15. – Producción de anticuerpos séricos en ratones inmunizados con anti-DEC-205:VP6 por vía s.c. Los sueros de los ratones inmunizados s.c. con el conjugado anti-DEC-206:VP6 equivalente a A) 130 ng o B) 400 ng de VP6 más Poli I:C y los sueros fueron colectados a los días 0, 21 y 40 post inmunización y analizados por ELISA. Como control se vacunaron ratones únicamente con el anticuerpo anti-DEC-205 y Poli I:C. Como control positivo de utilizó suero de ratones control a los 12 días post reto.

El promedio y la desviación estándar se calculó a partir de 2 experimentos independientes por cada dosis.
****, $P < 0.0001$.

Se encontró que todos los grupos de ratones inmunizados, excepto los inmunizados con anti-DEC-205:VP6, presentaron una curva clásica de excreción viral en las heces, esto es, existe una fuerte señal de antígeno viral al día 2 que se mantiene hasta el día 5 comenzando a descender al día 6 y desapareciendo por completo hacia el día 8. En contraste, los ratones inoculados con anti-DEC-205:VP6 presentaron una leve reducción de la carga viral con respecto al grupo control desde el día 4 y hasta el día 7 (Figura 16A y B). El porcentaje de protección se determinó en base a las áreas bajo la curva del tratamiento respecto al control, alcanzando un 10% y 16% para el caso de la inmunización con 130 ng y con 400 ng del conjugado, respectivamente.

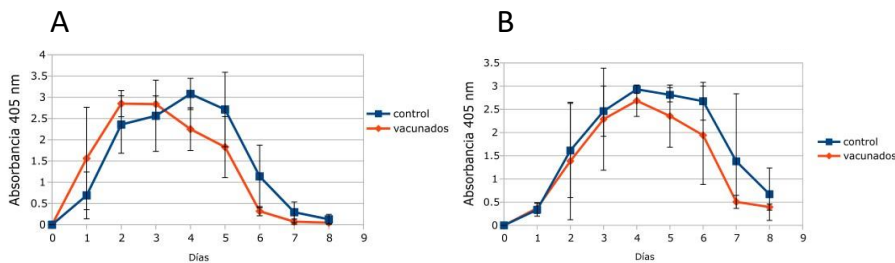


Figura 16. – Curva de infección viral en ratones inoculados s.c. con dos dosis del conjugado anti-DEC-205:VP6. Los ratones fueron inoculados s.c. con anti-DEC-205 o el conjugado anti-DEC-205:VP6 en presencia de Poli I:C y retados al día 40 con el rotavirus EDIM. La carga viral fue evaluada en las heces desde el día 0 hasta el día 8, por medio de un ensayo de ELISA. Se reveló con anticuerpo de conejo anti RRV y se midió la absorción. A) inmunización con anti-DEC-205:VP6 equivalente a 130 ng de VP6, B)

inoculación con anti-DEC-205:VP6 equivalente a 400 ng de VP6. El promedio y la desviación estándar se calculó a partir de 2 experimentos independientes por cada dosis.

Comentado [T7]: 4 experimentos por dosis?

Por otra parte, para la evaluación de la vía de administración i.n. se realizaron tres tratamientos donde se administraron 130 ng, 400 ng o 800 ng del conjugado anti-DEC-205:VP6, en presencia de 2.5 µg de toxina de cólera como adyuvante. Como grupo control, se inmunizaron ratones únicamente con el anticuerpo anti-DEC-205 y 2.5 µg de toxina de cólera. Como en los ensayos s.c., la segunda inmunización se realizó el día 21 bajo las mismas condiciones. Al día 40 del inicio del experimento, los ratones se retaron oralmente con el rotavirus murino EDIM para evaluar la carga viral. Los días 0 y 21 se tomaron muestras de suero para evaluar los anticuerpos anti-VP6.

Como se observa en las Figuras 16A, B y C, se encontró que tanto los ratones inmunizados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 así como el grupo control no presentaron niveles apreciables de anticuerpos séricos anti-VP6 en ninguna de las concentraciones del conjugado: 130 ng (Figura 17A), 400 ng (Figura 17B) y 800 ng (Figura 17C). Como control positivo se utilizó suero obtenido de un ratón infectado (día 12 postinfección), que como se esperaba mostró un incremento en más de 3 veces de anticuerpos anti-VP6 en comparación a los grupos experimentales..

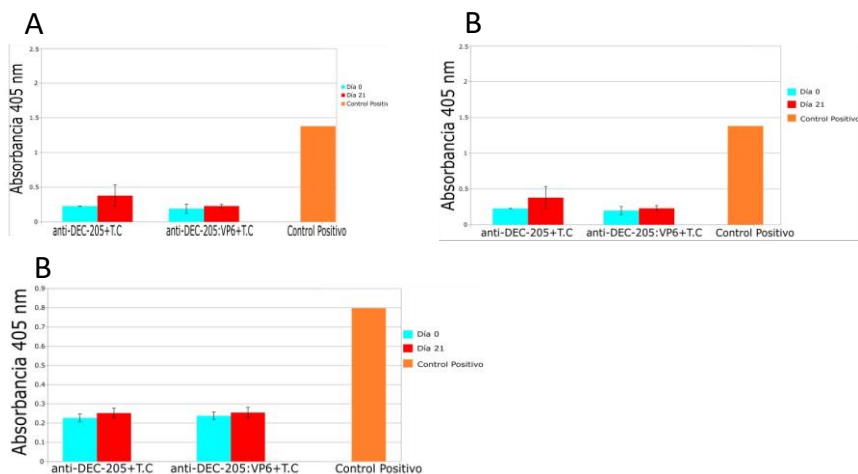


Figura 17. – Producción de anticuerpos séricos en ratones inmunizados con anti-DEC-205:VP6 por vía i.n. Los sueros de los ratones inmunizados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 equivalente a A) 130 ng, B) 400 ng o C) 800 ng de VP6 más toxina de cólera fueron colectados a los días 0 y 21 post inmunización y analizados por ELISA. Como control se vacunaron ratones únicamente con el anticuerpo anti-DEC-205 y toxina de cólera. Como control positivo se utilizó suero de ratones control a los 12 días post reto. El promedio y la desviación estándar se calculó a partir de 3 experimentos independientes por cada dosis.

Por otro lado, se encontró que los ratones inoculados con anti-DEC-205y retados con el rotavirus EDIM mostraron una curva clásica de excreción viral en las heces, presentando una fuerte señal de antígeno viral al día 2, la cual se mantiene hasta el día 5 y que comienza a descender al día 6, para desaparecer por completo hacia el día 8. En contraste, los ratones inoculados con el conjugado anti-DEC-205:VP6 presentaron una reducción de la carga viral de acuerdo al incrementó en la dosis aplicada: el porcentaje de protección alcanzado fue de un 13% para la dosis de 130 ng (Figura 18A), 58% para la dosis de 400 ng (Figura 18B) y 69% para la dosis de 800 ng de VP6 (Figura 18C).

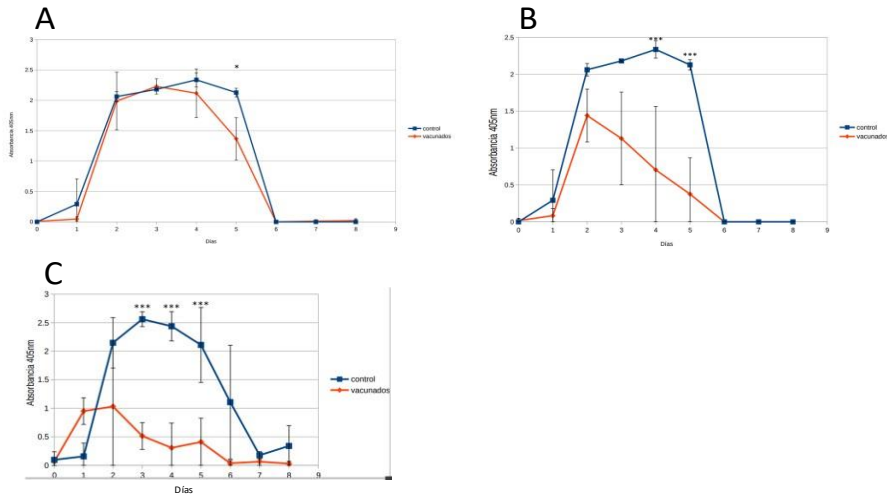


Figura 18. – Curva de infección viral en ratones inoculados i.n con dos dosis del conjugado anti-DEC-205:VP6. Los ratones fueron inoculados i.n. con anti-DEC-205 o el conjugado anti-DEC-205:VP6 retados al día 40 con rotavirus EDIM y la carga viral fue evaluada en heces desde el día 0 hasta el día 8, revelado con anticuerpo de conejo anti RRV y se midió la absorbancia. A) inmunización con 130 ng de VP6, B) 400 ng y C) 800 ng de VP6. El promedio y la desviación estándar se calculó a partir de 3 experimentos independientes por cada dosis. *, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Finalmente, en base a los resultados presentados en las Figuras 16 y 18, se realizó la comparación entre las vías de administración y los efectos de protección obtenidos con el conjugado anti-DEC-205:VP6. En la Figura 19 se muestra el porcentaje de protección inducido por los diferentes protocolos de inmunización con anti-DEC-205:VP6. Hay que hacer notar que esta figura incluye la protección obtenida en un trabajo previo (Badillo, et al.,2015) con 1500 ng de VP6 en el entrecruzado por la vía s.c. Como se puede observar, 130 ng de conjugado tanto en la vía s.c. como i.n. otorgan un efecto similar pero muy bajo. Sin embargo, la aplicación de 400 ng ofreció resultados claramente diferentes, mientras que sólo se obtuvo un 16% de protección por la vía s.c., la misma dosis de conjugado generó 58% de protección por la vía i.n. En base a estos

resultados se puede sugerir que la inmunización i.n. ofrece una respuesta de protección mucho más eficiente que la vía s.c.

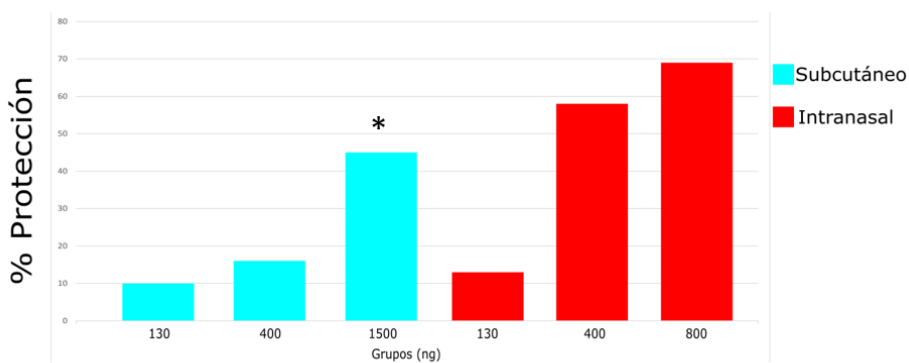


Figura 19. – Niveles de protección inducidos por el conjugado anti-DEC-205:VP6 administrado s.c o i.n. Se muestra el porcentaje de protección, determinado por el área bajo la curva del tratamiento respecto al control, inducido por los diferentes protocolos de inmunización con anti-DEC-205:VP6. *, Se incluye el porcentaje de protección obtenido previamente en otro trabajo (Badillo, et al.,2015) con 1.5 μ g de VP6 en el entrecruzado.

6.4 Detección de IgA contra rotavirus en heces.

Para la detección de IgAs en heces únicamente se utilizaron las muestras obtenidas del experimento donde se inmunizo con 800 ng de VP6 i.n. Tanto el grupo vacunado como el grupo

control presentaron una similitud en sus niveles de IgAs, teniendo una presencia de estos a partir del día 4 hasta finalizar la toma de muestras (día 8 de la infección) (Figura 20).

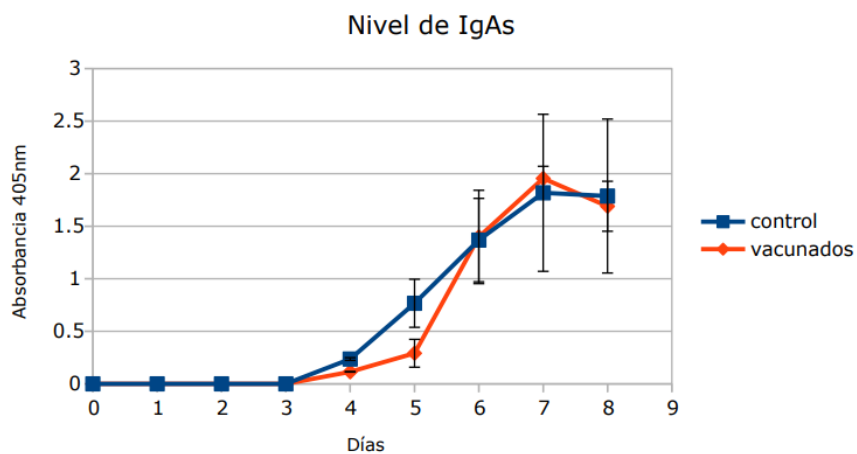


Figura 20. – Detección de anticuerpos IgA anti rotavirus en heces de ratones infectados. Se obtuvieron heces de ratones vacunados con anti-DEC-205:V6 o anti-DEC-205 solo, como control, en presencia de toxina de cólera e infectados con el rotavirus EDIM y la presencia de anticuerpos IgA anti-rotavirus evaluados por un ensayo de ELISA. Se utilizó un lisado de células MA-104 infectadas con el rotavirus RRV como antígeno. El ensayo se reveló con un anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón.

7 DISCUSIÓN

Como se describió en los antecedentes, actualmente están disponibles en el mercado dos vacunas en contra de la infección por rotavirus. Sin embargo, esto no implica que sean 100% efectivas o que no se puedan implementar otras formulaciones para tratar con la enfermedad. Además como se mencionó, ambas vacunas están realizadas con virus atenuados, por lo que aún conllevan riesgos potenciales a considerar, como lo es un rearreglo entre la cepa vacunal y la infecciosa, o un posible riesgo de intususcepción (Crawford, et al., 2017).

Tomando en cuenta esto, se propuso que la inmunización con el antígeno VP6 podría mejorarse con su direccionamiento a la molécula DEC-205, presente en las células dendríticas. Como se describió anteriormente, el direccionamiento hacia DEC-205 ha sido exitosamente evaluado en otros sistemas inmunológicos (Bonifaz, et al., 2004). Con esto en mente, en un estudio previo de nuestro grupo de investigación (Badillo, 2015) se observó que con cantidades tan bajas como 1.5 μg de VP6 en el conjugado anti-DEC-205:VP6, inoculado por vía s.c., se podía conferir hasta un 45% de protección frente a la enfermedad en un modelo murino. Comparado con la inoculación s.c. de VP6 solo, la cual no brindó protección. Estos resultados confirman que el direccionamiento hacia DEC-205 favorece la respuesta inmune de células B y T. Tomando en cuenta que rotavirus es un patógeno de mucosas y que la respuesta inmune en mucosas difiere de la sistémica, al presentar los linfocitos tanto B como T receptores como CCR9 y las integrinas $\alpha_4\beta_7$ que funcionan como receptores de direccionamiento (las cuales les confieren la capacidad de retornar a la mucosa) (Svensson et al., 2002; Kunkel y Butcher, 2003), tal vez una inoculación directamente en mucosa podría ser más potente.

Como se mencionó en materiales y métodos, para este estudio se recurrió al uso de un anticuerpo monoclonal (NLDC-145) dirigido al receptor DEC-205 presente principalmente en la membrana plasmática de estas células y que constituye el mismo anticuerpo que originalmente se empleó en otros estudios donde se confirmó el efecto potenciador de la respuesta inmune por direccionamiento hacia DEC-205. Sin embargo, como se encontró en el estudio de Badillo y cols., la conjugación química entre el anticuerpo anti-DEC-205 y la proteína VP6, realizada por el

reactivo de Traut, no ofrece una alta eficiencia. Por esa situación se realizaron 4 experimentos de conjugación mostrando resultados variables. Como se puede observar en la Figura 11, la presencia de una banda de peso molecular mayor que los 150 kDa del anticuerpo, sugiere la presencia del conjugado. Sin embargo, también es apreciable que su proporción con respecto a la banda de anticuerpo fue muy diferente entre los experimentos, variando de casi un 50% de conjugación (experimento 3) hasta menos del 1% (experimento 1). Por su parte, la Figura 12 sugiere que esta banda de mayor peso molecular que 150 kDa es inmunorreactiva a anticuerpos específicos en contra de VP6, suponiendo la formación de un enlace covalente entre las dos moléculas.

Como se mencionó en la Justificación del estudio, con estas preparaciones de la conjugación química de anti-DEC-205:VP6 se realizaron dos experimentos. En uno se inoculó el conjugado anti-DEC-205:VP6 en presencia de un adyuvante de manera s.c. y en otro de manera i.n., evaluando diferentes dosis en cada caso. Como control se inocularon grupos únicamente con anti-DEC-205 solo en presencia de un adyuvante (poli I:C para los s.c. y toxina de cólera para los i.n.).

En el caso de la inoculación s.c., se evaluaron las cantidades equivalentes a 130 ng y 400 ng de VP6. Ambas cantidades indujeron una presencia significativa de anticuerpos séricos solo hasta el día 40, día en el que se aplicó el refuerzo de la vacuna. Sin embargo, la protección otorgada apenas fue de un 10 y un 16% respectivamente.

Para los experimentos con inoculación i.n., se evaluaron las dosis equivalentes a 130 ng, 400 ng y 800 ng de VP6. La dosis de 130 ng confirió una protección de solo un 13%, muy parecida a la inoculación s.c. Sin embargo, las dosis de 400 ng y 800 ng de VP6 indujeron una protección de un 58% y 69% respectivamente. Esta protección se refleja en las curvas de replicación viral en donde se puede apreciar que a partir del día 2, la infección no es tan alta como en el grupo control y más aún, esta continua su descenso desde el mismo día. Finalmente, se realizó una comparación del porcentaje de protección inducida por la vacunación dependiendo de la vía de administración. Sorprendentemente, desde la dosis tan bajas de 400 ng de VP6 inoculados de forma i.n. se obtiene un porcentaje de protección aun mayor que con 1.5 µg de VP6 administrados subcutáneamente (Badillo et al., 2015). En base a estos resultados, como se sugirió previamente, empleando un modelo murino de infección por rotavirus se observó que la inmunización i.n. fue más eficiente

para inducir protección en contra del virus intestinal, incluso si se emplea el sistema de direccionamiento a DEC-205. Esto puede ser consecuencia del sistema de comunicación-reconocimiento de los elementos celulares entre los sistemas de mucosas (Svensson et al., 2002; Kunkel y Butcher, 2003). Sin embargo, para caso específico de este modelo de infección se requiere llevar dar continuidad a estos experimentos y poder caracterizar los mecanismos específicos de la comunicación nasal e intestinal.

Por otro lado, al evaluar la inmunización i.n. no se observó la inducción de anticuerpos séricos para las tres dosis evaluadas del conjugado. Estos resultados nos sugieren que en nuestro modelo la vacunación sistémica es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos séricos pero la vacunación en mucosas no. Este es un resultado interesante ya que es ampliamente conocido que las inmunizaciones en mucosa pueden inducir respuestas inmune eficientes en mucosas y a nivel sistémico (Nagler-Anderson, 2001).

Por otra parte, al evaluar los niveles de IgA en los animales inoculados con 800 ng i.n. del conjugado, no se observó un incremento de los niveles con respecto a los animales control. Resultados similares fueron reportados por Badillo et al. (2015) en ratones vacunados s.c. con el conjugado anti-DEC-205:VP6 con una dosis equivalente a 1.5 µg de VP6. Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron niveles de protección contra la infección por rotavirus entre el 40 y el 70%. Todo lo anterior sugiere que la protección inducida en los dos modelos de vacunación con el conjugado anti-DEC-205:VP6 es debida a la generación de células T de memoria que migran a la lámina propia y epitelio intestinal donde ejercen su función efectora. Más estudios son necesarios para determinar de manera precisa el o los mecanismos de protección inducidos por el direccionamiento de VP6 hacia las CDs.

Limitaciones del estudio

Como se describió previamente, debido a la poca eficiencia y alta variación de la conjugación química entre el anticuerpo anti-DEC-205 y la proteína VP6, se contó con una cantidad limitada de material para llevar a cabo su caracterización y separación del anticuerpo anti-

DEC-205. Asimismo, el western blot que intentaba confirmar la presencia de VP6 en esta banda de peso molecular, no es claramente visible, por lo que se requeriría mejorar el sistema de análisis de electroforesis y western blot.

Por otro lado, se desconoce si la presencia de anticuerpo anti-DEC-205 y VP6 libres pudiera afectar los resultados de la inmunización. Sin embargo, como se mostró comparativamente el empleo de sólo la proteína VP6 i.n. no ofreció protección, ni la presencia de anti-DEC-205. En el estudio previo de Badillo y cols. también se confirmó que anti-DEC-205 conjugado con OVA no indujo protección en contra del reto del rotavirus en este mismo modelo experimental. Por todo esto, a pesar de emplearse una preparación semipura, todo apunta a sugerir que el efecto de protección depende de la presencia del conjugado anti-DEC-205:VP6. En ese sentido, quizás se pudiera hacer estudios comparativos más rigurosos al emplear una preparación de conjugado purificado o por lo menos enriquecido.

8 CONCLUSIÓN

La ruta de administración por vía i.n. resulta ser más eficaz en la inducción de protección frente a la infección por rotavirus, requiriendo cantidades tan bajas como 400 ng de VP6 para obtener una protección mayor a la obtenida cuando se administra subcutáneamente. Asimismo, este estudio sugiere que la mayor protección parece no depender de una respuesta inmune humoral, por lo que se sugiere que pudiera estar basada en la inmunidad celular; para lo cual habrá que realizar más experimentos en el futuro.

9 REFERENCIAS

Angel, J., M.A. Franco, and H.B. Greenberg, Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*, 2007.5 (7): p. 529-39.

Angel, J., M.A. Franco, and H.B. Greenberg, Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol*, 2012.2 (4): p. 419-25.

Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q.-Y., Morris, A. P., & Estes, M. K. (1996). Age-Dependent Diarrhea Induced by a Rotaviral Nonstructural Glycoprotein. *Science*, 272(5258), 101–104. doi:10.1126/science.272.5258.101

Badillo- 2015. Targeting of rotavirus VP6 to dec-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine*. Vol. 33. P4228-4237.

Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S.-I., Soares, H., ... Steinman, R. M. (2004). In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(6), 815–824. doi:10.1084/jem.20032220

Chen, B.-Y., Zhou, G., Li, Q.-L., Lu, J.-S., Shi, D.-Y., Pang, X.-B., Huang, P.-T. (2017). Enhanced effects of DNA vaccine against botulinum neurotoxin serotype A by targeting antigen to dendritic cells. *Immunology Letters*, 190, 118–124. doi:10.1016/j.imlet. 2017.08.004.

Cisney, E. D., Fernandez, S., Hall, S. I., Krietz, G. A., & Ulrich, R. G. (2012). Examining the Role of Nasopharyngeal-associated Lymphoreticular Tissue (NALT) in Mouse Responses to Vaccines. *Journal of Visualized Experiments*, (66). doi:10.3791/3960.

Crawford, S., Ramani, S., Tate, J., Parashar, U., Svensson, L., Hagbom, M., Estes M. (2017). Rotavirus Infection. *Nature Reviews Disease primers*, 3 (17083). DOI: 10.1038/nrdp.2017.83.

Cyster JG, Allen CDC. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*, 177(3), 524-540. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.016.

Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler, Hamilton JR. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets: intestinal structure and transport. *J Clin Invest* 1977;60 1402-9.

Estes, M. K. & Greenberg, H. B. in *Field's Virology* (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 1347–1401 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).

Golubovskaya, V., & Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers*, 8(3), 36. doi:10.3390/cancers8030036.

Hernández, P. P., Mahlaköiv, T., Yang, I., Schwierzeck, V., Nguyen, N., Guendel, F., Diefenbach, A. (2015). Interferon- λ and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nature Immunology*, 16(7), 698–707. doi:10.1038/ni.3180

Hossain, M., & Wall, K. (2019). Use of Dendritic Cell Receptors as Targets for Enhancing Anti-Cancer Immune Responses. *Cancers*, 11(3), 418. doi:10.3390/cancers11030418.

Iwasaki, A. (2007). Mucosal Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 381–418. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141634.

Juana Angel, A. Duncan Steele, & Manuel A. Franco. (2014). Correlates of protection for rotavirus vaccines: Possible alternative trial endpoints, opportunities and challenges. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(12), 3659-3671. <http://dx.doi.org/10.4161/hv.34361>.

Kaplan, D.H. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends immunol.* 2010, 31, 446-451.

Kunkel EJ, and Butcher EC. 2003. Plasma-cell homing. *Nature*. 3: p. 822-29.

Lakhrif, Z., Moreau, A., Hérault, B., Di-Tommaso, A., Juste, M., Moiré, N., Aubrey, N. (2018). Targeted Delivery of *Toxoplasma gondii* Antigens to Dendritic Cells Promote Immunogenicity and Protective Efficiency against Toxoplasmosis. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00317.

Mahnke, K. (2003). Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*, 101(>12), 4862–4869. doi:10.1182/blood-2002-10-3229.

McKenna, K., Beignon, A.S., Bhardwaj, N. Plasmacytoid dendritic cells: Linking innate and adaptative immunity. *J. Virol.* 2005, 79, 17-27.

Münz, C. (2019). Autophagy proteins influence endocytosis for MHC restricted antigen presentation. *Seminars in Cancer Biology*. doi:10.1016/j.semcancer. 2019.03.005.

Nagler-Anderson, C., Man the barrier! Strategic defenses in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol.* 2001. 1: p. 59-67.

Nalin D R. Levine MM. Mata L, et al., Oral rehydration and maintenance of children with rotavirus and other bacterial diarrheas. *Bull WHO* 1979;57: 453-9.

Padilla-Quirarte, H. O., Lopez-Guerrero, D. V., Gutierrez-Xicotencatl, L., & Esquivel-Guadarrama, F. (2019). Protective Antibodies Against Influenza Proteins. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.01677

Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1), 5–17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4), 361–367. doi:10.1038/86373.

Rha, B., Tate, J. E., Weintraub, E., Haber, P., Yen, C., Patel, M., Parashar, U. D. (2014). Intussusception following rotavirus vaccination: an updated review of the available evidence. *Expert Review of Vaccines*, 13(11), 1339–1348. doi:10.1586/14760584.2014.942223

Robinson, J. K., Blanchard, T. G., Levine, A. D., Emancipator, S. N., & Lamm, M. E. (2001). A Mucosal IgA-Mediated Excretory Immune System In Vivo. *The Journal of Immunology*, 166(6), 3688–3692. doi:10.4049/jimmunol.166.6.3688.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 2012, 209, 653-660.

Shrimpton, R. E., Butler, M., Morel, A.-S., Eren, E., Hue, S. S., & Ritter, M. A. (2009). CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular Immunology*, 46(6), 1229–1239. doi:10.1016/j.molimm.2008.11.016.

Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Brodén, T., Márquez, G., Agace, W., CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 α beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*, 2002. 110(8): p. 1113-21.

Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., & Parashar, U. D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(2), 136–141. doi:10.1016/s1473-3099(11)70253-5

Tel, J., Benítez-Ribas, D., Hoosemans, S., Cambi, A., Adema, G. J., Figdor, C. G., de Vries, I. J. M. (2011). DEC-205 mediates antigen uptake and presentation by both resting and activated human

plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 41(4), 1014–1023. doi:10.1002/eji.201040790.

Tscharke, D. C., Croft, N. P., Doherty, P. C., & La Gruta, N. L. (2015). Sizing up the key determinants of the CD8+ T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 15(11), 705–716. doi:10.1038/nri3905.

Ugur, M., & Mueller, S. N. (2019). T cell and dendritic cell interactions in lymphoid organs: More than just being in the right place at the right time. *Immunological Reviews*, 289(1), 115–128. doi:10.1111/imr.12753.

Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. *J Virol*. 1990 Oct;64(10):5070-5.

WHO, Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013. *Wkly. Epidemiol Rec*, 2013. 88(5): p. 49-64.

Yen, C., Tate, J. E., Patel, M. M., Cortese, M. M., Lopman, B., Fleming, J., Parashar, U. D. (2011). Rotavirus vaccines. *Human Vaccines*, 7(12), 1282–1290. doi:10.4161/hv.7.12.18321

Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de la respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus inducida por VP6 direccionado a DEC-205 cuando se administra parenteralmente o en mucosa**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Omar Jabín Velázquez Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2021-06-07 11:09:37 | Firmante

BQM2IDryZEMjV54V7+s6Zowpy6TrVCh5fnM8NosiVM4bo7iJ/eV8UXB46r4sRJ14FrdW5u4CQLYg0dKcDqljXazNiQvA5ApZ/bMKR2rRrvW4WHMQFgPuCXEKcInYPVkoXaqjDIs16uLwfVNTHz9TBGI+IZrPBaC5UnjBQYUcNjeCUHRaPkqzBdgv7yCmRD6Ge8l2/U8jQVfaKsb71JLW4pTFOcES22DmC4cZlYyLkAaweDx7hlo/o7CKqT/lgJLSh6D6aVdJq5AZsCeB19W89lrgiiA7pDw8r61u16EF1rYnVFzI2QgXfRY7ZI919TKpMS7BZ1ZNslofdleX3qjQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



XjxRKp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9HJjthlUrtFJ1TjCKFJuDWoW6MmBN6FN>



Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de la respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus inducida por VP6 direccionado a DEC-205 cuando se administra parenteralmente o en mucosa**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Omar Jabín Velázquez Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. José Luis Montiel Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2021-06-08 13:53:19 | Firmante

ALGqd9MZ3AzacDzqFju2ZQyJd7Nd4D5kj/WADc0OgOpPzqppi5dybRYqRcbwLn+YezZHaPEglJNE0qFIZ6l39ZkeFbszZvRJaW088TLEdvrpnjVFmRs1RREA11DrGoQG7CUNdLReTZ1w5SKTmVVGuZlfrdQtQJ6Oibizi90yFLrMaxYd53Vwkc6EPy+vm5cw+OikkkqVQyETITshhYckua4W9Ybm3JM653HocVQDMI//a9y9FXQQGyr32NTn2GeaBlhYxlHPZWqZhpziCwjHRA0tiKkp+jcsnKCPRx2M/Nb3mMieSQbA8DlyO+B9dOWeUBJolRFNxAQ4HSp+YyihnPJQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[aKyk6h](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GIMSuGPbH4bSMei2Hc76WPQMtzlh6zYS>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2021.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de la respuesta inmune protectora contra la infección por rotavirus inducida por VP6 direccionado a DEC-205 cuando se administra parenteralmente o en mucosa**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Omar Jabín Velázquez Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. María Angélica Santana Calderón



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-06-02 08:57:08 | Firmante

UguzSDaj48eOuU5YY7hDHqVC52IBb+cxmSQqf9QmESqH134cXzPMI5Ytf07s0JJn3ck88+txUO8Rw0vh5xmfKqK79+lxosyMIMoZeQS7qyDiRYb/QsWbXa0X5qLEi9Wj3fugDn
petnepUtNUdkReYxOVoBLzXDbIL6Ev2EnT1ejZsThCFFon++sD7YJ65vEqPymxhUeCYRYXl9KnfB6X4bfmpSZjiUfBzxGUK66enFQXoPw4T0urQ7Ly1Azu71sM4195u068VyyWdZ
4FrjZzqwn+4fyy1tNyuzECBo8mN9x973QNRgSFc0mg6cuZNdJw4tYXuN7O66PV8Pz91aaA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



NbosCB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JYBVhWgrUdUgfvBSVAkwhR67J11W0IW3>

