



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE POSGRADO



**“PAPEL DE LAS CÉLULAS T EN LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR VP6
DIRECCIONADO A LANGERINA CONTRA LA INFECCIÓN POR
ROTAVIRUS EN UN MODELO MURINO”**

“T E S I S”
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR
QUE PRESENTA:
LA BIOL. YUNUEN ACEVEDO BETANCUR

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Cuernavaca, Morelos, Julio del 2018

LUGAR DE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Laboratorio de Inmunología Viral del Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el laboratorio de la Dra. María Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl, CISEI del Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos a Julio del 2018.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Tutor Principal: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Tutor Personal: Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Dra. Vera Lucia Petricevich

Dr. F. Rodolfo Gatica Marquina

MIEMBROS DEL JURADO DE EXÁMEN

Presidente: Dra. Vera Lucia Petricevich

Secretario: Dra. Gabriela Rosas Salgado

Primer vocal: Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez

Segundo Vocal: Dra. Judith González Christen

Tercer vocal: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

AGRADECIMIENTOS

Proyecto realizado con apoyo de beca del CONACyT con número 740359/598816.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Esquivel por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su apoyo constante durante la realización del mismo, por su ánimo para aconsejar y por sus comentarios severos pero acertados

A la Dra. Lourdes Gutiérrez Xicotécatl, por brindarnos apoyo cuando más lo necesitábamos al darnos espacio en su laboratorio

A Daniel Luna por su gran ayuda en los análisis citométricos

A la Dra. Vanessa por su buena disposición para enseñarme el manejo de los ratones

A Oscar Badillo por su apoyo esencial en la vacunación de los ratones y por sus asesoramientos

A Yuviceli por su ayuda incondicional en la colecta de muestras

A Marbeth Maleni por enseñarme a obtener suero murino

A Juan Carlos Villegas por la asistencia técnica

A la Biol. Nancy y al Dr. Gerardo por su apoyo en el cuidado de los ratones

Agradecimientos especiales

A mis padres Lucy & Victor, por interesarse en mi proyecto y por su esfuerzo en entenderlo haciéndome preguntas tan originales.

A mi xokoyotl Paloma por atreverse a ser genuina.

A todos mis compañeros del laboratorio: "Dany" , Dra. Vannesa , Alice, Herbey, Edgar y "Tepoz" , porque nunca me negaron un plumón cuando más lo necesitaba, por hacer los seminarios de los viernes bien amenos, por las pláticas random y espontaneas entre experimentos y por la "carrilla" sana y constructiva.

A todos los que lamentablemente olvide mencionar, pero que contribuyeron para lograr esta tesis, ¡gracias!

ABREVIATURAS

Aa: Aminoácidos

Ac: Anticuerpo

Acm: Anticuerpo monoclonal

Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6: Conjugado Anti Langerina-Dockerina + Cohesina-VP6

ARN dc: ARN de doble cadena

CD's: Células dendríticas

CFSE: Carboxifluoresceína

CL: Células de Langerhans

DI50: Dosis infecciosa 50

DLP: Del inglés *Double Layered particula*, partícula de doble capa.

DTT: Ditiotreitól

EDIM: del inglés *epizootic diarrhea of infant mice*,

FDA: del inglés *Food and Drug Administration*, Administración de alimentos y medicamentos

G: serotipos y genotipos determinados por las diferencias existentes en la glicoproteína VP7 de los RV.

i.n: Intranasal

i.p: Intraperitoneal

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

Isotipo-Dock-Cohe-VP6: Isotipo-Dockerina+Cohesina-VP6

kDa: Kilo Daltones

MHC: del inglés *major histocompatibility complex*, Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NSP: del inglés *Nonstructural protein*, proteína no estructural

OMS: Organización mundial de la Salud

p.i: Post-infección

P: serotipos y genotipos determinados por las diferencias existentes en la proteína sensible a proteasa VP4 de los RV

PBS: del inglés *phosphate buffered saline*, buffer fosfato salino

PP: Placas de Peyer

PLC-IP₃: fosfolipasa C-inositol 1,3,5 –trifosfato

RRV: Rotavirus de Simio Rhesus

RTLIC: Receptor tipo lectina C

RV: Rotavirus

s.c: subcutánea

SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SN: Sobrenadante

SNE: Sistema Nervioso Enterico

T.A: Temperatura ambiente

Tc: del inglés *T cytotoxic cell*, Célula T citotóxica o CD8

Th: del inglés *T Helper cell*, Célula T colaboradora o CD4

TLP: del inglés *Tree Layered Particle*, partícula de tres capas

uff: Unidades formadoras de focos.

Vi: Viroplasma

VLP: del inglés *viral like particle*, partículas pseudovirales

VP: del inglés *viral protein*, proteína viral o estructural

2-ME: 2-β mercapto -etanol

ÍNDICE

RESUMEN	i
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Rotavirus	1
1.1.1 <i>Importancia epidemiológica</i>	1
1.1.2 <i>Proteínas de los RV</i>	2
1.1.3 <i>Clasificación de los RV's</i>	5
1.1.4 <i>Ciclo de replicación los RV's</i>	5
1.1.5 <i>Patogenia de RV's</i>	7
1.2 Respuesta inmune en la infección por RV	8
1.2.1 <i>Respuesta inmune innata</i>	9
1.2.2 <i>Respuesta inmune adaptativa</i>	10
1.3 Vacunas aprobadas contra RV	11
1.4 VP6 como potencial candidato vacunal contra RV y la respuesta inmune	13
1.5 Direccionamiento de antígeno a CD's	14
1.5.1 <i>Receptores tipo Lectina C</i>	15
1.6 VP6 direccionada a CD's	17
2 JUSTIFICACIÓN	18
3 HIPÓTESIS	19
4 OBJETIVOS	20
4.1 <i>Objetivo general</i>	20
4.2 <i>Objetivos particulares</i>	20
5 MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 <i>Líneas celulares y medios de cultivo</i>	21
5.2 <i>Ratones</i>	21
5.3 <i>Virus</i>	22
5.3.1 <i>RV murino EDIM</i>	22
5.3.2 <i>RV de Simio Rhesus</i>	22
5.4 <i>Producción de los antígenos</i>	23
5.5 <i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	24
5.6 <i>Western-Blot</i>	25
5.7 <i>Inmunizaciones</i>	26
5.8 <i>Infección de ratones con EDIM_{WT}</i>	26
5.9 <i>ELISA para determinar carga viral</i>	26
5.10 <i>ELISA para detectar Ig's anti-RV en suero</i>	27
5.11 <i>Obtención de células de bazo</i>	28
5.12 <i>Purificación de células T CD4+ de bazo</i>	29
5.13 <i>Transferencia de células a ratones no vacunados</i>	29
5.14 <i>Producción de anticuerpos monoclonales</i>	29
5.15 <i>Eliminación in vivo de células T CD4+ y CD8+</i>	30

5.16 Generación de líneas celulares <i>in vitro</i> de células TCD4+ específicas a VP6 de RV.....	30
5.17 Citofluorimetría.....	31
5.18 Análisis estadístico.....	31
6 RESULTADOS.....	32
6.1 Caracterización de las vacunas usadas.....	32
6.1.1 <i>Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6</i>	32
6.1.2 <i>Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂</i>	33
6.2 Inmunogenicidad del conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6.....	34
6.3 Inmunogenicidad de la fusión Anti-Lang-VP6 289-302.....	37
6.4 Papel de las células T en la protección contra la infección por rotavirus inducida por el conjugado Anti.Langerina-Dock-Cohe-VP6.....	40
6.4.1 <i>Eliminación de células T CD4+ y CD8+ in vivo usando Acm específicos</i>	40
6.4.2 <i>Transferecia adoptiva de células T de memoria específicas para VP6 de Rotavirus</i>	46
6.5 Transferencia adoptiva de líneas de células T específicas para VP6.....	48
7 DISCUSIÓN.....	50
8 CONCLUSIONES.....	54
9 PERSPECTIVAS.....	55
10 BIBLIOGRAFÍA.....	56

RESUMEN

Rotavirus (RV) es el principal agente etiológico de gastroenteritis en niños menores de 5 años. La proteína VP6 de RV constituye la capa intermedia del virión y conforma al virus en más del 50%. Su gran conservación entre las diferentes cepas de RV's y su potencial para inducir respuestas inmunes protectoras, convierte a esta proteína en un excelente candidato para la promoción de una de una vacuna heterotípica de nueva generación. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que ratones vacunados subcutáneamente con VP6 direccionado a DEC-205 presente en la membrana de las células dendríticas (CD's) inducía una protección contra la infección intestinal por RV independiente de anticuerpos y dependiente de células T CD4⁺ y CD8⁺.

En el presente estudio se determinó si VP6 dirigido a otra lectina tipo C presente en la membrana de las CD's, como Langerina, también podía inducir una respuesta inmune protectora a nivel intestinal contra RV. Se utilizaron dos tipos de vacunas; en una VP6 fusionado a Cohesina (VP6-Cohe) se conjugó a un anticuerpo monoclonal (Acm) Anti-Langerina de ratón fusionado a Dockerina (Lang-Dock) (Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6) y en la otra el Acm Anti-Langerina fue fusionado con la secuencia peptídica 289-302 de VP6 (Anti-Lang-V₆₂₈₉₋₃₀₂), que contiene un epítipo de células T CD4⁺ reconocido en el contexto de la molécula del MHC clase II (IE^d). Para cada tipo de vacuna, se aplicaron dos dosis separadas por 21 días en presencia de Poli I:C, y en el caso de la fusión Anti-Langerina-VP6₂₈₉₋₃₀₂ se aplicaron hasta 3 dosis. A los 21 días de la última dosis, los ratones se retaron con el RV murino EDIM. La vacunación con el conjugado Anti Lang-Dock-Cohe-VP6 resultó ser altamente inmunogénica y además brindó una protección de casi un 60% contra la infección por RV. Por el contrario, la fusión Anti-Lang-V₆₂₈₉₋₃₀₂ no indujo protección aún después de 3 dosis, por tal motivo todos los ensayos de células T se llevaron a partir de ratones vacunados con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6.

Cuando las células T CD4⁺ como CD8⁺ fueron eliminadas *in vivo* con Acm's específicos en ratones vacunados antes del reto con RV, se encontró que ambas poblaciones eran determinantes en la protección. Se intentó corroborar este resultado transfiriendo células T de memoria específicas para VP6 a ratones *naive* retados con RV, sin embargo, por problemas técnicos no fue posible obtener resultados conclusivos.

Los resultados de este trabajo nos indican que VP6 direccionada a Langerina presente en las CD's es una alternativa para generar una respuesta inmune protectora a nivel intestinal con la infección por RV, y al igual que VP6 dirigido a DEC-205, las células T juegan un papel importante en esta protección. En estudios futuros sería importante determinar los mecanismos precisos por los cuales se induce esta respuesta.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Rotavirus

1.1.1 Importancia Epidemiológica

Rotavirus (RV) es un virus de estructura icosaédrica que ocasiona gastroenteritis en diversos mamíferos jóvenes. La entrada de RV a su hospedero es principalmente a través de la ruta fecal-oral y tiene tropismo hacia los enterocitos del intestino delgado, en donde se replica, ocasionando diarreas agudas que pueden conducir a una deshidratación severa ¹. En el humano, RV es el principal agente etiológico de gastroenteritis en niños menores de 5 años a nivel mundial ². La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 215,000 muertes infantiles mundiales ocurridas durante el 2013 a causa de infecciones gastrointestinales atribuibles a RV, la mayor parte ocurriendo en los países en vías de desarrollo como India, Nigeria y Pakistán ³. La OMS recomienda la implementación de vacunas contra RV y ha reportado que en el 2013 alrededor de 50 países ya habían introducido vacunas contra los serotipos de RV humanos más predominantes ³. Desde 2007, México puso en marcha un sistema de vacunación activo contra RV, reportándose una disminución del 41% de muertes en el 2008 causadas por gastroenteritis en niños menores de 1 año ⁴. Hay que destacar que aunque se está incrementando el número de países que llevan a cabo la vacunación contra RV, todavía los mecanismos por los cuales estas vacunas inducen protección no están completamente dilucidados ⁵. Aunado a esto, una limitante que muestran las vacunas actualmente aprobadas por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) que están compuestas por virus vivos atenuados, es la falta de una buena protección inmunológica ya que no previenen la infección. En los países desarrollados, estas vacunas sólo protegen de una gastroenteritis severa por RV en un 80%, mientras que en los países en vías desarrollo de Asia y África, la protección oscila entre 39% y 70% ⁶. Estos son motivos relevantes para mejorar el conocimiento de la función del sistema inmunitario ante una infección por RV, de tal suerte que pueda ser aplicado al diseño de nuevas vacunas contra los RV's humanos y de importancia veterinaria.

Aunque en la actualidad, la aplicación de vacunas orales hechas con virus vivos atenuados ha demostrado ser el método más efectivo para proteger contra la gastroenteritis por RV ², el estudio de vacunas basadas en subunidades proteicas de los RV's es una oportunidad para mejorar la entrega de antígeno viral a células específicas del sistema inmune (como células

dendríticas) y potenciar la protección ⁹⁵, además esta modalidad de vacunas tienen como ventaja ser más seguras en comparación con las vacunas elaboradas con virus atenuados que están relacionadas con riesgo de invaginación intestinal ⁸⁸.

1.1.2 Proteínas de los RV's

Los RV's son miembros de la familia Reoviridae y estructuralmente están conformados por varias capas concéntricas con un diámetro de aproximadamente de 600 a 1000 Å ⁷. Poseen por lo general un genoma de 11 segmentos de ARN de doble cadena (ARN dc), los cuales codifican para seis proteínas virales o estructurales (**VP**, del inglés *viral protein*) y seis proteínas no estructurales (**NSP** del inglés *Nonstructural protein*) ⁸ (**Figura 1a**). Las VP's forman las tres capas concéntricas de una partícula madura de RV o virión (**Figura 1 b y c**).

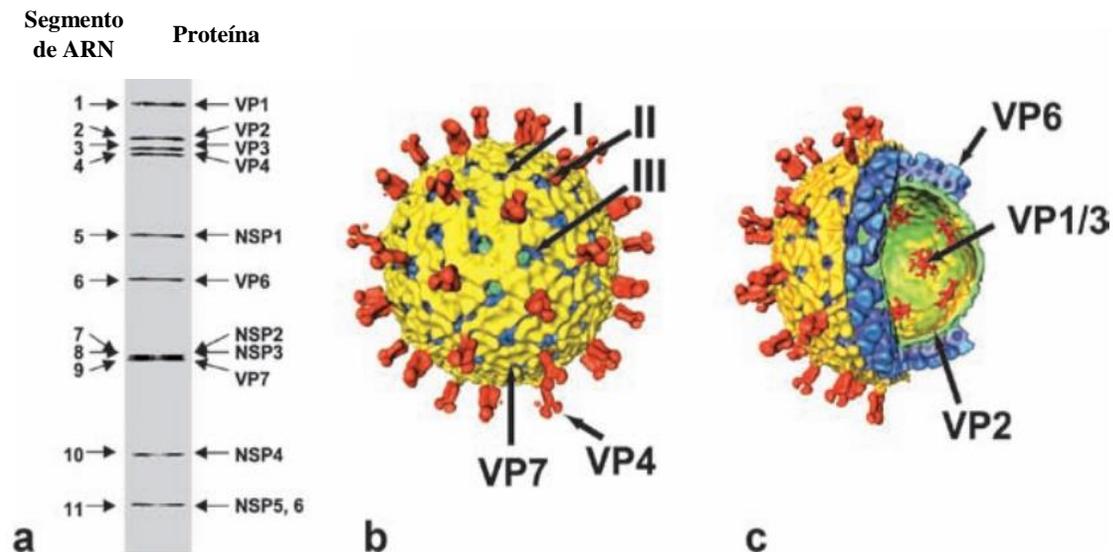


Figura 1: Genoma y proteínas de RV. a) Gel PAGE mostrando los 11 segmentos de ARN dc de RV (izquierda) y su asignación con la proteína correspondiente (derecha). Los segmentos 7, 8 y 9 que corresponden a NSP2, NSP3 y VP7 respectivamente migran a la misma distancia por poseer segmentos de ARN de una longitud parecida. b) Superficie de una partícula madura de RV, en rojo se representan las 60 espículas de VP4 y en amarillo se representa las 780 copias de VP7 las cuales conforman la capa externa. Las flechas que indican I, II y III son los canales acuosos. c) Corte de un virus maduro para mostrar la capa media compuesta por VP6 (azul) y la capa interna constituida por VP2 (verde). El complejo de transcripción VP1/3 está inmerso en VP2 (estructura roja en forma de flor) (Tomado de Pesavento, *et al.* 2006)

La capa interna o nucleocápside rodea al genoma viral y está compuesta por las proteínas VP1, VP2 y VP3. Es en estas partículas donde se lleva a cabo la replicación del ARN viral gracias a la VP1 que es probablemente una RNA polimerasa dependiente de RNA ⁸⁴ y a VP3

que posee actividad guanidiltransferasa y metilasa⁸. La VP2 constituye la mayor parte de la nucleocápside y está relacionada con el empaquetamiento del ARN's virales⁸⁵.

La capa intermedia está compuesta por VP6, que es la proteína estructural que se encuentra en mayor cantidad⁸. VP6 forma espontáneamente trímeros y es muy estable; esta característica y el hecho de que contiene determinantes antigénicos conservados entre diferentes cepas de RV's, son la razón de que VP6 sea el blanco antigénico principal en los ensayos de diagnóstico inmunológico para los RV. Los epítopes de VP6 que son conservados entre todas las cepas de RV del grupo A son llamados epítopes de grupo. En esta proteína también se han identificado otros epítopes, llamados epítopes de subgrupo, los cuales han sido utilizados como marcadores epidemiológicos para clasificar diferentes cepas dentro del grupo A⁸⁶.

La capa externa está conformada por VP4 y VP7. Dentro de VP7 se encuentran embebidas espículas formadas por VP4, la cual tiene que ser procesada por una proteasa del lumen intestinal para la activación de VP5 y VP8, que a su vez interaccionan con receptores de la célula hospedera⁸⁷.

Las proteínas no estructurales de RV's, NSP1 a NSP6, son codificadas por los segmentos 5, 7, 8, 10 y 11, respectivamente. Como su nombre lo indica, estas proteínas no forman parte de la estructura del virión. Son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula, aunque aún no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones⁸.

En la **Tabla 1** se resumen las funciones de las VP's y NSP's de los RV's.

Tabla 1: Funciones conocidas de las proteínas de RV's

Segmento de RNA	Proteína	Masa (kDa)	Función
1	VP1	125	ARN polimerasa dependiente de ARN, localizada en la cápside más interna. Forma el complejo de transcripción con VP3.
2	VP2	95	Proteína estructural que forma la cápside más interna requerida para la actividad replicasa de VP1.
3	VP3	88	De guaniltransferasa y metiltransferasa que promueve el "capping" de los ARN mensajeros. Forma parte del complejo de transcripción del virión.
4	VP4	85	Se agrupa en trímeros para conformar una espícula en la capa exterior. Antígeno de neutralización específico tipo P. Proteína de unión a la célula. Proteína cortada por tripsina originando VP5 (58 kDa) y VP8 (27 kDa), lo cual potencia la infectividad.
5	NSP1	53	Se asocia con el citoesqueleto, diversidad en su secuencia entre diferentes cepas, tiene un papel en suprimir la respuesta de INF- α en la célula.
6	VP6	45	Forma la mayor parte del virión, proteína estructural de la capa intermedia, subgrupo de antígeno, requerida para la transcripción.
7	NSP3	34	Homodímero, se une al extremo 3' del ARN mensajero de RV. Se une al factor de elongación eIF4G1, involucrado en la regulación traduccional.
8	NSP2	35	NTPasa y Helicasa, involucrada en la formación del viroplasma. Esencial para la síntesis de RNA dc.
9	VP7	34	Glicoproteína estructural de la capa externa, antígeno de neutralización tipo G.
10	NSP4	20	Enterotoxina viral. Modula niveles de calcio intracelular y replicación de ARN.
11	NSP5	26	Interactúa con NSP2 and NSP6. Forma homodímeros. Se une a ARN de cadena sencilla. Componente del viroplasma. Esencial para la replicación viral.
11	NSP6	11	Producto del segundo marco de lectura abierto del gen del segmento II. Interactúa con NSP5. Localiza al viroplasma

Modificado de Angel *et al*,2007

1.1.3 Clasificación de los RV's

Los RV's son clasificados en grupos (A-E) y subgrupos en base a la especificidad antigénica de la proteína estructural VP6 ⁹. RV's del grupo A son la causa común de gastroenteritis en humanos. Los RV's son clasificados más a fondo en serotipos en base a los epítomos neutralizantes de VP7 (una glicoproteína) llamados serotipos G, y de VP4 (que es sensible a proteasas) llamados serotipos P. Como el genoma de RV es segmentado, los genes que codifican VP7 y VP4 se pueden segregar independientemente, generando una nomenclatura binaria. Existen 15 serotipos G, los cuales son generalmente equivalentes a los genotipos G (determinados por su relación de secuencia) y comúnmente cualquiera de los dos es reportado. Más del 90% de las cepas de RV's humanos son identificados globalmente como cepas G1, G2, G3, G4 o G9. Hay 14 serotipos P y por los menos existen 25 genotipos P (los cuales se designan en corchetes), los cuales no siempre son equivalentes y ambos son reportados. La mayoría de los RV's circulantes comparten neutralización cruzada del serotipo P1 ⁵.

1.1.4 Ciclo de replicación de los RV's

En primera instancia, el mecanismo de entrada de RV se ha estudiado principalmente *in vitro* en las células epiteliales de riñón de macaco, denominadas MA104 ¹⁰. El ciclo de replicación de RV da comienzo cuando una partícula madura o partícula de tres capas (TLP, del inglés *tree layered particle*) (**Figura 1b**) a través del procesamiento de la proteína externa VP4, se une a los sialo-glicanos ¹¹ o antígenos del grupo histo- sanguíneo ¹² sobre la superficie celular, lo cual desencadena la interacción con otros receptores celulares, en donde pueden estar involucrados las integrinas (alpha2beta1, alphavbeta3, y alphaxbeta2) y Hsc70 ¹³. Seguida de estas interacciones, el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptores y en el endosoma, se pierde la capa externa, quedando expuesta VP6. Esto desencadena la liberación de una partícula de doble capa (DLP, del inglés *double layered particle*) al citoplasma, la cual es transcripcionalmente activa ¹⁴. Las DLP's dan inicio a la transcripción de los ARN mensajeros los cuales son usados para la traducción de las proteínas virales y una vez que se generan las proteínas virales, el genoma de RV que es de ARN dc, se replica y es empaquetado en las nuevas DLP's en unas estructuras que se llaman viroplasmos (Vi), que requieren de los componentes denominados “cuerpos lipídicos” para

su formación¹⁵. Las DLP's se unen a NSP4, la cual funciona como un receptor del retículo endoplásmico (RE), durante este proceso, las partículas se aprecian transitoriamente envueltas en el RE. La remoción de la membrana pasajera y el ensamblaje de las capas externas VP4 y VP7 generan un virus maduro, es decir una TLP. Los viriones son liberados a través de la lisis celular¹⁴. En la **Figura 2** se resumen los pasos implicados en la replicación de un RV en una célula MA104.

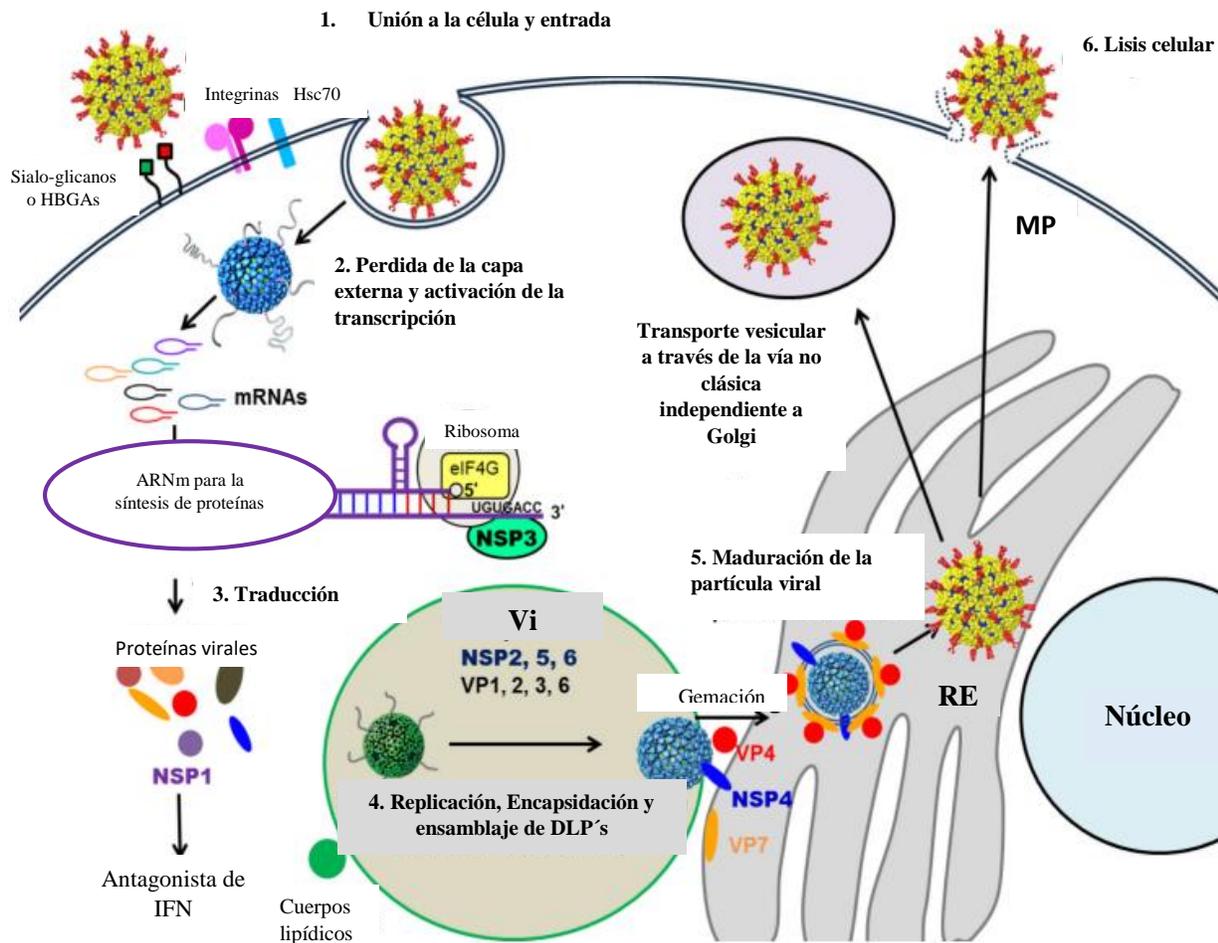


Figura 2: Ciclo de replicación de los RV's. Los pasos generales que implican la replicación de RV son: **1.** unión de RV a la célula a través de la interacción las proteínas externas del RV con receptores de la superficie celular. **2.** Pérdida de la capa externa, exposición de VP6 y activación de la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm) gracias a VP1 y VP3. **3.** Inicio de la traducción de las proteínas virales en polisomas o en retículo endoplasmático (RE). **4.** La replicación del ARN, encapsidación del genoma viral y ensamblaje de DLP's se llevan a cabo en los viroplastos (Vi) que contienen una alta concentración de proteínas virales. **5.** Una vez que se ensamblan en los Vi las DLP's, estas salen y geman con RE y adquieren una membrana transitoria en donde se formaran las partículas TLP's. **6.** Finalmente, las TLP's salen de la célula hospedera mediante la lisis celular. MP, membrana plásmatica (Modificado de Hu, *et al.*, 2012).

1.1.5 Patogenia de RV

El proceso de patogénesis de RV que conduce a diarrea es iniciado cuando este se une e infecta los enterocitos maduros, que tienen funciones digestivas y de absorción de nutrientes, cerca de las puntas de las microvelocidades en el intestino delgado (**Figura 3A**). El empaquetamiento de las proteínas virales producidas y la replicación de RNA suceden en los Vi. Se propone que la producción intracelular de NSP4, que tiene la función de tipo enterotoxina, causa la liberación de Ca^{2+} del RE, incrementando la concentración de Ca^{2+} citosólico (**Figura 3B-1**) y como consecuencia se desencadenan diversos eventos celulares como son: daños en la red del citoesqueleto de las microvellosidades, disminución de la expresión de disacaridasas (y otras enzimas digestivas) en la parte apical de la célula, inhibición del cotransporte de soluto- Na^+ y necrosis ¹.

Los eventos que conducen a una malabsorción como consecuencia de la reducción del epitelio intestinal en la capacidad de absorber nutrientes son los siguientes: disminución de la actividad de los transportadores de Na^+ -soluto y en la expresión de enzimas digestivas en la superficie epitelial. Por otro lado, la liberación de NSP4 proveniente de una célula infectada tiene un efecto paracrino en una célula vecina no infectada, la NSP4 se puede unir a esta célula a través de receptores por el momento desconocidos ¹⁶ estimulando la cascada fosfolipasa C-inositol 1,3,5 -trifosfato (PLC-IP₃) que culmina en la liberación de Ca^{2+} del RE incrementando el Ca^{2+} intracelular (**Figura 3B-3**). Si NSP4 actúa sobre los enterocitos, destruye las uniones estrechas y se incrementa la permeabilidad paracelular (**Figura 3B-2**), pero si NSP4 actúa sobre las células de las cripta el incremento de Ca^{2+} intracelular conduce a la secreción en la cripta, mediado por la activación del transportador de Cl^- (**Figura 3B-4**). También NSP4 puede estimular el Sistema Nervioso Enterico (SNE), incrementando Ca^{2+} citoplasmático que induce secreción de Cl^- ¹⁷.

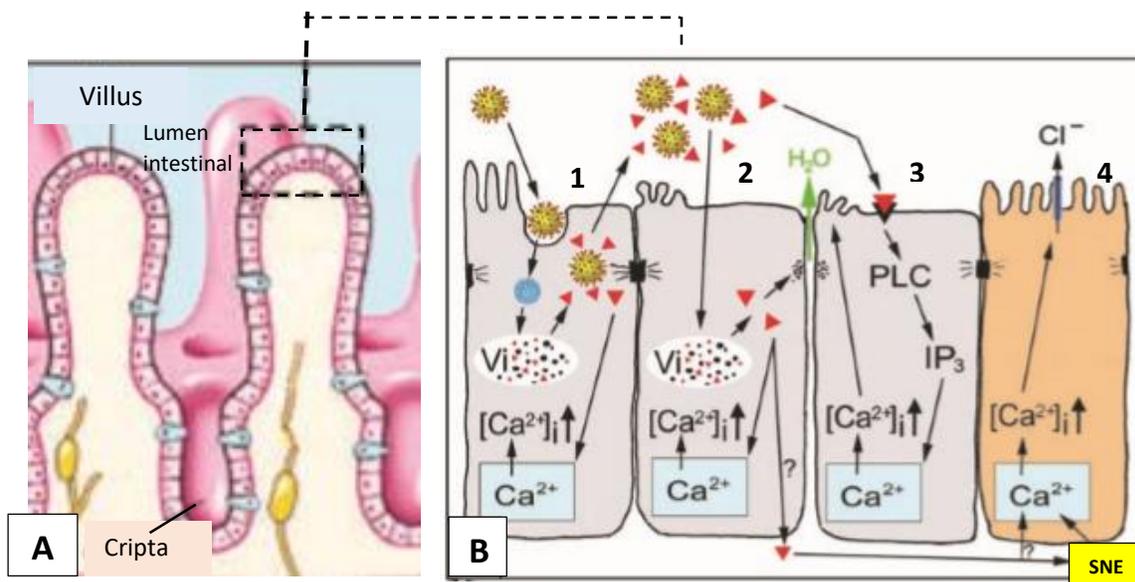


Figura 3: Patogénesis de RV. **A)** Representación de la arquitectura del intestino delgado. Villus es la proyección intestinal en forma de dedo que está recubierto por los enterocitos (recuadro punteado) que limitan con el lumen intestinal. **B)** Amplificación de los enterocitos y eventos de la patogénesis por RV: **1** Un RV que se encuentra en el lumen intestinal se une a un enterocito, se internaliza y se desnuda. Se forman los viroplasmos (Vi) y se liberan virus y proteínas del virus. NSP4 (triángulo rojo) podría ser liberado por una vía no clásica de secreción. NSP4 intracelular induce la liberación de Ca^{2+} principalmente del retículo endoplasmático (cuadro azul) ocasionando un incremento del Ca^{2+} intracelular. **2** Una célula es infectada secundariamente después de la liberación del virus desde la célula inicial. NSP4 que se produce por la infección daña las uniones estrechas, permitiendo el flujo paracelular de agua y electrolitos. **3** NSP4 se une a receptores y desencadena la cascada de PLC e IP_3 que resulta en la liberación de Ca^{2+} que se encuentra en retículo endoplasmático ocasionando un incremento intracelular de Ca^{2+} . **4** La célula café representa una célula de la cripta que puede ser estimulada directamente por NSP4 o NSP4 puede estimular el Sistema Nervioso Entérico (SNE), que se representa en el cuadro amarillo, lo cual induce la secreción de Cl^- . (Modificado de Ramig, 2004)

1.2 Respuesta inmune en la infección por los RV's

Los mecanismos de inmunidad contra la infección por RV han sido estudiados principalmente en el modelo murino, donde se ha encontrado que tanto la respuesta inmune innata como adaptativa de la mucosa intestinal intervienen en la contención y eliminación de la infección. A continuación se clasifican los tipos de respuesta inmunológicas que se han descubierto y propuesto ante una infección por los RV's.

1.2.1 Respuesta inmune innata

Células dendríticas

Las células dendríticas (CD's) son conocidas por el importante papel que juegan enlazando la inmunidad innata y la adaptativa, siendo las células presentadoras de antígeno (CPA) más potentes que existen y con la capacidad única de activar linfocitos T CD4+ que no han tenido contacto antigénico previo ⁹⁰. No sólo son importantes en la regulación de respuestas inmunógenas efectivas, sino también en la inducción de fenómenos de tolerancia inmunológica, necesarios para evitar la aparición de procesos autoinmunes. Tras la captación y procesamiento de los antígenos, las CDs se dirigen principalmente a los órganos linfoides, donde se produce la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8+ y CD4+, proceso en el cual es necesaria la interacción con Complejo Mayor de Histocompatibilidad I o II (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) respectivamente y con otras moléculas accesorias como las moléculas coestimuladoras y las moléculas de adhesión ⁸⁹.

Un estudio realizado en ratones reveló que ante una infección por RV's, se observó una respuesta de CD's de intestino *in vivo* ³⁰. En este trabajo observaron la migración a las 48 horas post-infección de las CD's a la parte superior de las Placas de Peyer (PP), expresando moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86, también encontraron la expresión de RNA mensajero para citocinas proinflamatorias INF β , IL-12/23p40 y TNF α , por otro lado, observaron el aumento de citocinas anti inflamatorias como IL-10. Estos resultados sugieren que en un tiempo corto después de una infección por RV's, las CD's que se localizan en las PP tienen la función de controlar la infección a través de la producción de citocinas antivirales y de la activación de células T. Al mismo tiempo, evitando una respuesta inmune excesiva.

Inflamosoma

Un trabajo novedoso demuestra que un tipo de inflamosoma, llamado Nlrp9b, se expresa exclusivamente en las células epiteliales del intestino y ante una infección por RV, este desencadena una vía de señalización que restringe la infección por RV *in vivo*, a través del reconocimiento del ARN dc de RV por la helicasa de RNA contenida dentro del complejo de Nlrp9b, dando como resultado final la maduración de la IL-18 ³³, la cual previene y resuelve

una infección por RV³⁴. Estos resultados señalan la importancia de la participación de las vías de señalización de la inmunidad innata en el intestino ante una infección por RV.

Células epiteliales

Trabajos recientes demostraron en el modelo murino que en una infección primaria la producción de IFN- λ por células epiteliales de intestino puede limitar el daño en tejido intestinal³¹, en conjunto con IL-22 producida por linfocitos intestinales es requerido para control efectivo de la replicación de RV, por otro lado, la expresión de los receptores para ambas citocinas actúan en cooperación para la activación de STAT 1 (factor esencial en la señalización por los interferones) la cual es requerida para la inducción de genes estimulados por Interferón (ISGs) que confiere un estado antiviral en células epiteliales, que puede limitar la replicación viral en mucosa intestinal³².

1.2.2 Respuesta inmune adaptativa

Células B y células T

En el caso de la respuesta de células B, se ha encontrado que después de la infección por RV, los anticuerpos (Ac's) IgA's intestinales juegan un papel importante tanto en la contención de la respuesta primaria como en la protección profiláctica contra una reinfección con el mismo serotipo^{18,19}. Se ha propuesto que existen dos posibles mecanismos de protección por Ac's IgA's (a) por neutralización directa de la infección bloqueando las proteínas externas del virus VP4 y VP7 y (b) por la acción de Ac's no neutralizantes que reconocen VP4, VP7 e inclusive la proteína intermedia VP6^{20, 21 y 22}. En este último caso, se ha planteado que los Ac's IgA's reconocen a VP6 a lo largo de su transcitosis en las células epiteliales intestinales para ser vertidas en el lumen intestinal, bloqueando de esta manera la morfogénesis viral por un mecanismo aún no establecido²³. Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar si en una infección natural realmente este mecanismo es importante. Por otro lado, ratones deficientes en células B no previenen la infección pero son capaces de resolverla aunque en un tiempo más prolongado (10 días), muy probablemente debido a la acción directa de las células T en la lámina propia destruyendo las células infectadas. Las células Tc juegan un papel importante en la resolución y contención de la infección primaria por RV, aunque el mecanismo exacto no ha sido entendido ya que

empleando ratones deficientes en Perforina, Fas, INF- α/β , INF- γ , IL-6 se encontró que la infección se resuelve de manera similar a los ratones silvestres²⁴. Las células Th ayudan a la eficiente inducción de células B productoras de anticuerpos IgA y células Tc, así como a la eficiente inducción de memoria^{18 y 25}. Por otro lado, no se puede descartar que las células Th pueden tener una función efectora directa como lo demuestran trabajos previos en modelos de vacunación^{26 y 27}. En ratones deficientes de células B y T se observó que RV generaba una infección persistente pero localizada en el epitelio intestinal, que se resolvía cuando células B y T específicas a RV fueron transferidas a estos ratones²⁸. Esto claramente sugería que la respuesta inmune innata es importante en la contención pero no en la resolución de la infección. Esto se demostró cuando se encontró que ratones transgénicos deficientes en STAT-1 presentaban un incremento significativo de los títulos virales en intestino comparado con los ratones control, sin embargo, la resolución de la infección se llevó a cabo de manera normal²⁹.

1.3 Vacunas aprobadas contra RV

Actualmente existen en el mercado dos vacunas orales que fueron sujetas a pruebas experimentales largas en fase III para comprobar su eficacia y seguridad contra los RV's humanos: Rotarix y Rotateq^{35,36 y 83}. Rotarix es una vacuna de RV humano atenuado adaptado a tejido de cultivo de la cepa P1A[8]G1, subgrupo II de VP6 y cepa B del geno-grupo NSP4³⁷ (**Figura 4A**) y después de 2 dosis produce una protección del 85% contra gastroenteritis severa². Por otro lado, Rotateq es una vacuna que está compuesta de cinco cepas de RV's rearreglantes, cada una de ellas se deriva de cepa bovina parental (WC3) y cada una de ellas contiene un gen que codifica VP4 ó VP7 de un RV de origen humano³⁶ (**Figura 4B**). Después de completar 3 dosis, brinda una eficacia del 98% contra la gastroenteritis severa³⁸. Anteriormente se inmunizaba con la vacuna Rotashield, la cual estaba elaborada a partir de un RV rearreglante de simio-humano y contenía cuatro componentes serotípicos de VP7³⁹. Esta vacuna fue retirada del mercado debido a que se relacionaba con intususcepción, que consiste en un evento patológico en el cual el intestino se invagina ocasionando su obstrucción⁴⁰. A pesar de que se está incrementando el número de países que inmunizan con Rotarix y Rotateq, todavía los mecanismos por los cuales estas vacunas inducen protección y las bases moleculares de su atenuación no están completamente entendidos. Una limitante

que han mostrado ambas vacunas es la falta de reproducibilidad de una buena protección inmunológica entre poblaciones de diferentes regiones del mundo. La seguridad y efectividad de estas vacunas no está en su totalidad garantizada y toda inmunización debe estar sujeta a ser mejorada. Este es un motivo relevante para el desarrollo de vacunas de nueva generación.

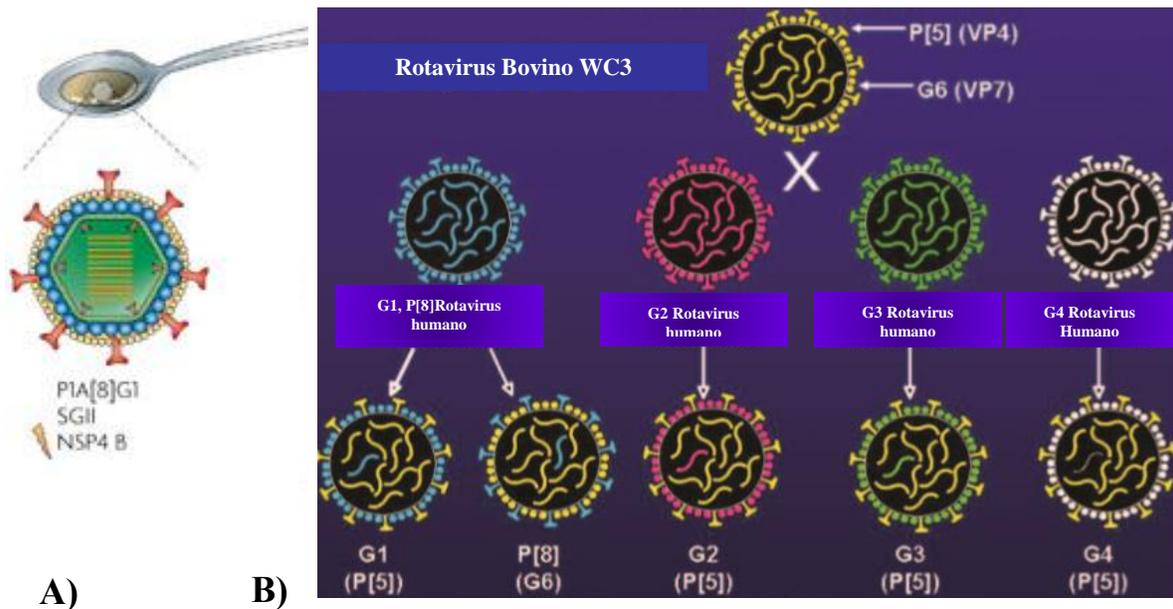


Figura 4: Vacunas orales aprobadas actualmente contra RV: A) Rotarix, vacuna elaborada a partir de RV humano atenuado cepa P1A[8]G1 que representa VP7 y VP4 más comunes, subgrupo II de VP6 y cepa B del geno-grupo NSP4 (Modificado de Angel, 2007). B) Rotateq, vacuna elaborada de cinco RV's rearreglantes humano-bovino, cuatro expresan la proteína VP7 humana (G1, G2, G3, o G4) y la proteína VP4 bovina (P7[5]), y el quinto rearreglante expresa la proteína VP4 humana (P1A[8]) y la capa externa G6 del RV bovino (Modificado de Offit, 2006).

1.4 VP6 como potencial candidato vacunal y la respuesta inmune

La proteína VP6, que determina el grupo antigénico de RV, está altamente conservada y posee un alto grado de homología, de entre un 87% y 90 % en su secuencia nucleotídica con los RV's del grupo A ⁴¹ lo que la convierte en un candidato atractivo como agente inmunizante que podría proveer una protección heterotípica ⁴². Diversos estudios realizados en modelos murinos, han demostrado que la vacunación con VP6, o con péptidos de VP6, produce una respuesta protectora tras una infección subsecuente con RV ^{27, 43 y 44}.

La VP6 administrada por la vía intranasal (i.n) en presencia del adyuvante toxina termolábil de *Escherichia coli* induce protección contra RV murino en un 96% ^{27, 45 y 46}. A pesar de que VP6 es la proteína más inmunogénica, los Ac's que ella estimula tras la aplicación nasal es no-neutralizante, por lo tanto el mecanismo de protección que genera VP6 podría ser a través de una vía diferente a la clásica de neutralización viral. Lo anterior se ha demostrado en modelos murinos deficientes en la producción de células B, los cuales tras la inmunización con VP6 administrada por la vía i.n junto con un adyuvante son protegidos casi en su totalidad tras una infección subsecuente con el RV murino EDIM ⁴⁵. Esta protección obtenida con VP6 administrada por la vía i.n en compañía de un adyuvante demostró fuertemente ser dependiente solamente de células T CD4+ ²⁷.

Debido a la relevancia que posee VP6 para inducir una memoria protectora contra RV independiente de células B, es importante conocer las regiones que sean epítopes de linfocitos T. Las regiones de VP6 responsables de la protección brindada tras su aplicación por la vía de mucosas se han determinado mediante inmunizaciones con diferentes regiones sobrelapantes, y se ha visto que una región que comprende el carboxilo terminal de la proteína de VP6 en los aminoácidos (aa) 289 -302 brinda una protección de casi el 100% ⁴³, cuya región también coincide con un epítope de reconocimiento de VP6 porcino (cepa YM) por un hibridoma de células de T CD4+ presentado bajo el contexto de MHC II IEd ⁴⁷, sin embargo, la vacunación con VP6 completa y aplicada por la vía i.n desencadena un epítope inmunodominante diferente en células T CD4+ que comprende la región de aa 242-259 ⁴⁸. Estos resultados sugieren que la vacunación con la región de aa 289-302 genera sus propias T CD4+, mientras que la vacunación con VP6 completa aplicada por la vía i.n genera células T CD4+ de memoria dominantes contra una región diferente.

El mecanismo de protección brindado con la vacunación de VP6 quimérica (VP6 unida a la proteína de unión a maltosa), más adyuvante aplicada por la vía nasal también ha sido estudiado utilizando como herramientas diversos mutantes murinos con deficiencias en la producción de células B, deficiencias en el receptor de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, así como en ratones con inmunodeficiencia combinada. Como resultado de estos análisis, se demostró que tras la vacunación con VP6 quimérica aplicada con el adyuvante de toxina termolábil atenuada, aplicada de manera intranasal, las células T CD4⁺ son las principales responsables de la protección en contra de RV murino EDIM²⁷.

Otra de las formas de inmunización con VP6 que se ha estudiado, es con VP6 recombinante producida en Baculovirus, aplicada de manera intramuscular. VP6 forma diferentes estructuras oligoméricas *in vitro*, las cuales son altamente inmunogénicas en ratón sin la necesidad de adyuvantes externos⁴⁹. Debido a las estructuras antigénicas repetitivas, estos oligómeros son capaces de ligarse a receptores de las células B eficientemente⁵⁰, mientras que VP6 soluble generalmente requiere un adyuvante para la inducción de respuesta inmune. Se ha demostrado que con esta vacunación se producen Ac's que son capaces de reconocer diferentes RV's, es decir produce una reactividad cruzada. Aunque la función de VP6 en la inmunidad protectora todavía no está completamente comprendida, VP6 puede ser suficiente para generar inmunidad protectora. En ratón y conejos ha sido lograda esta protección con partículas de doble capa⁵¹, dl2/6-VLPs⁵², y la proteína VP6 sin los antígenos de superficie VP4 y VP7²⁶.

1.5 Direccionamiento de antígeno a CD's.

Para muchas enfermedades que ocasionan un alto índice de mortalidad y morbilidad, como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y la malaria, es importante que las vacunas induzcan una respuesta fuerte de células T, conformada por células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ y células T CD8⁺ y para inducir estas respuestas de células T⁵³⁻⁵⁶, la vacunación de “**direccionamiento de antígeno a las CD's**” aprovecha 3 características importantes de las CD's: **1)** procesan antígenos de manera eficiente, como microbios complejos y células tumorales para posteriormente mostrarlos bajo el contexto MHC clase I y MHC clase II a las células TCD8 y T CD4⁺ respectivamente^{57 y 58}; **2)** las CD's se convierten en estimuladores potentes de la inmunidad después de someterse a una compleja

diferenciación o maduración en respuesta a un panel de estímulos, como lo puede ser ligandos de microbios para los receptores tipo Toll (TLR's) ^{59 y 60}, linfocitos innatos ^{61 y 62}, y unión de CD40 ⁶³; y **3**) las CD's se localizan en las áreas de las células T de los órganos linfoides donde ellas expanden células T específicas a antígeno y cuando maduran, inducen células T CD4+ productoras de IFN- γ y células T citotóxicas ^{64 y 65}.

1.5.1 Receptores tipo lectina C

Las CD's están equipadas con varios receptores sobre su membrana celular que coadyuvan con la captura de patógenos, entre ellos se encuentran los "receptores tipo lectina C" (RTL C) ⁶⁶, que son receptores dependientes de calcio y reconocen carbohidratos, así como glicoproteínas, manosas (presentes en virus, micobacterias y hongos) y glucanos (presentes en micobacterias y hongos). Entre los principales componentes de estos receptores se encuentran los siguientes dominios: de cisteína, de fibronectina, de reconocimiento de carbohidrato, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático ⁶⁷ (**Figura 5**). Ejemplos importantes de estos receptores son Langerina (CD207), DC-SIGN (CD209) y DEC205 (CD205).

El uso de anticuerpos monoclonales (Acm) específicos contra alguno de estos RTL C para direccionar antígenos a CD's da como resultado un incremento de las respuestas inmunes ^{68 y 69}. Por ejemplo experimentos en modelo murino de direccionamiento del antígeno ovoalbúmina (OVA) a DEC205 administrado por la vía subcutánea (s.c) incrementan la respuesta de células T ⁶⁸. También el direccionamiento de antígenos del VIH a DEC205 administrado por la vía i.n incrementa la respuesta de células T CD4+ a nivel gastrointestinal ⁹². Por otro lado también se ha observado que el direccionamiento de antígenos de adenovirus hepatotrópicos a DEC205 genera la producción de células T citotóxicas que destruyen los hepatocitos infectados, esta vacunación sería el blanco de otros virus que tienen un tropismo hacia hígado ⁹³.

El RTL C Langerina, que se encuentra principalmente sobre las células de Langerhans (CL) en el epitelio estratificado, es un blanco importante para direccionar antígenos, se ha observado que una vez que el VIH-1 es reconocido por Langerina, el virus es endocitado e internalizado en los gránulos de Birbeck, en donde el virus es degradado para posteriormente ser presentado bajo el contexto de MHC I y II a células T, previniendo la

infección de la célula, por el contrario, cuando se encuentra ausente Langerina sobre las CL, el VIH-1 interacciona con sus receptores CD4 y CCR5 expresados sobre las CL para posteriormente integrar su genoma a la célula e infectar a las células T ⁹¹. También ensayos de direccionamiento de OVA a Langerina indican un incremento en la presentación de antígeno a células T CD4+ y TCD8+ específicas a OVA ⁹⁴.

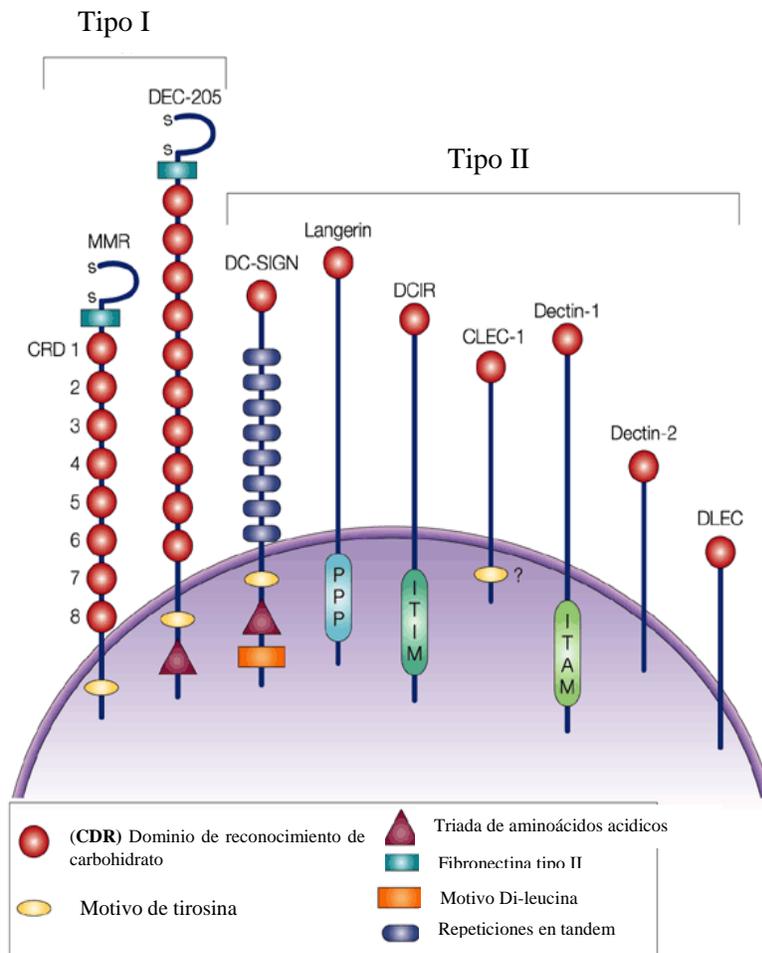


Figura 5. Representación de dos tipos de receptores de lectina tipo C ó moléculas tipo Lectina que son producidas por células dendríticas y células de Langerhans. Dentro de las lectinas tipo I se encuentran MMR y DEC-205 que contienen un amino terminal rico en repeticiones ricas en cisteína (S-S), una fibronectina tipo II (FN) y de 8 a 10 dominios de reconocimiento a carbohidrato (CRD) que una ligando de manera dependiente de calcio. Lectinas de tipo II contienen solo un CDR en el dominio de su carboxilo terminal que se encuentra extracelularmente. Los dominios citoplásmicos de las lectinas tipo C son diversos y contienen varios motivos conservados que son importantes para la captura de antígeno, por nombrar algunos: motivo basado en tirosina para internalización, triada de aminoácidos ácidos y motivos de di-leucina. (Modificado de Figdor, *et al*, 2002).

1.6 VP6 direccionada a CD's

En nuestro laboratorio, se ha propuesto el direccionamiento de VP6 a CD's como una plataforma de vacunación para incrementar la respuesta de células T protectoras. Como resultado de estos estudios, se ha observado un incremento en la protección (independiente de IgA's) de un 45% en ratones inmunizados con la proteína VP6 direccionada a DEC-205 en compañía de un adyuvante de RNA dc sintético (Poli I:C); siendo esta protección dependiente de células Th1^{44 y 70}. Asimismo, recientemente, resultados preliminares en nuestro laboratorio demostraron que ratones inmunizados con la VP6 direccionada a Langerina, induce inclusive niveles de protección mayores que los dirigidos a DEC205 (hasta un 70 % de protección) (Comunicación personal con Dr. Oscar Badillo).

2 JUSTIFICACIÓN

La VP6 es un producto del segmento 6 del genoma de RV que está constituida por 397 aminoácidos con un peso molecular de 45 kDa y constituye más del 50% del virión ⁷¹. Su gran conservación entre las diferentes cepas de RV y su potencial para inducir respuestas inmunes protectoras, convierte a esta proteína en un excelente candidato para la generación de una vacuna heterotípica de nueva generación basada en una respuesta de células T ^{27 y 43}. Ante la estimulación antigénica con RV porcino, se encontró que células Th pueden reconocer a RV de manera homotípica y heterotípica y que VP6 es blanco importante de esta respuesta ⁴⁷. Sin embargo, más estudios dirigidos a entender la función de las células T en este sistema son necesarios.

El direccionamiento de VP6 a CD's, mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Acm's) que reconocen receptores tipo lectina C que se expresan sobre las CD's, tales como Langerina o DEC 205 que inducen una internalización eficiente de sus ligandos para después presentarlos principalmente a células T, mejora la respuesta inmune protectora contra RV, y se ha propuesto en nuestro grupo de trabajo que esta respuesta es T dependiente, principalmente de células T CD4+ ⁴⁴. También se ha observado que cuando se eliminan las células T CD4+ la protección inducida contra la infección en los ratones vacunados con el Acm DEC-205 unido a VP6 (conjugado Acm DEC-205:VP6) se anuló por completo y al eliminar la población T CD8+ se obtuvo un 50% de la reducción de la protección. Estos resultados sugieren que la vacunación con VP6 direccionado a CD's está involucrada con la generación de células T que ayudan a la protección contra RV ⁷⁰. Resultados preliminares del laboratorio indican que VP6 dirigido a otro receptor tipo lectina C, como Langerina, también induce protección contra la infección. De esta manera, en este trabajo se planteó investigar el posible papel de las células T específicas a VP6, generados en ratones vacunados con esta proteína dirigida a Langerina presente en las CD's, en la protección contra la infección por RV.

3 HIPÓTESIS

Las células Th y Tc específicas para VP6, generadas en ratones inmunizados parenteralmente con VP6 direccionado a Langerina presente en las CD's, tienen un papel importante en la protección contra la infección por RV en un modelo murino.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de las células Th y Tc específicas para VP6, generadas en ratones inmunizados parenteralmente con VP6 direccionado a CD's, en la protección contra la infección por RV en un modelo murino.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Montar el modelo murino de vacunación parenteral de VP6 dirigido a Langerina para inducir protección contra la infección por RV a través de la actividad de las CD's.
- Determinar si la eliminación de las células Th y Tc *in vivo* en ratones vacunados, abroga la protección inducida contra la infección por rotavirus.
- Evaluar la capacidad de las células Th y Tc, generadas por la vacunación, para transferir inmunidad protectora contra la infección por RV en ratones no vacunados.
- Generar líneas celulares *in vitro* de células T anti-VP6 provenientes de ratones vacunados y determinar si son capaces de transferir inmunidad protectora contra la infección por RV en ratones no vacunados.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Líneas celulares y medios de cultivo

A continuación se enlistan en la **Tabla 2** las líneas celulares que se utilizaron en este proyecto y se describen los medios para su crecimiento. Todos los medios y suplementos usados fueron adquiridos de GIBCO.

Tabla 2: Líneas celulares utilizadas en este proyecto y sus condiciones de cultivo

Características de la línea celular		Medio de cultivo para su crecimiento
<p>MA104 ATCC® CRL-2378</p>	<p>Células epiteliales de riñón de macaco</p>	<p>DMEM con 10% de suero fetal bovino, 2mM de Glutamina, 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.</p>
<p>GK 1.5 ATCC® TIB-207™ (hibridoma)</p>	<p>-Productora del Isotipo Rata IgG2b, κ -El anticuerpo que produce reconoce CD4 de ratón</p>	<p>RPMI 1640+ (RPMI+) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 5x10⁻⁵ M 2- mercaptoetanol, 2mM de glutamina, 10 mM Hepes y 10 µg/mL de gentamicina</p>
<p>53-6.72 ATCC® TIB-105™ (hibridoma)</p>	<p>-Productora del Isotipo Rata IgG2a, κ -El anticuerpo que produce reconoce CD8 de ratón</p>	

5.2 Ratones

Se utilizaron ratones hembras BALB/c (H-2^d) de 6-8 semanas de nacidos, libres de patógenos, del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Se mantuvieron en un ambiente estéril en cajas con filtro bajo condiciones de 12 horas de luz/ 12 horas de

oscuridad y se proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Se sacrificaron por dislocación cervical.

Por otro lado se ocuparon ratones desnudos “nude” (*nu/nu*) hembras de 6-8 semanas de edad que fueron proporcionados por el Bioterio la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El desarrollo de los experimentos con estos ratones se realizaron dentro de la zona controlada del Bioterio “Área blanca” bajo condiciones estériles.

5.3 Virus

5.3.1 RV murino EDIM_{wt}

Los ratones BALB/c se infectaron con el RV murino EDIM_{wt} (del inglés *epizootic diarrhea of infant mice*), del tipo G3[P16] el cual fue proporcionado por el Dr. Richard Ward del Children’s Medical Center en Cincinnati Ohio. En nuestro laboratorio, EDIM se amplificó en ratones neonatos de 3 días de nacidos, los cuales se infectaron con 1×10^4 unidades formadoras de focos (uff), y 5 días post infección (p.i) se colectaron los intestinos delgados y se homogenizaron en TNC (10mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM CaCl₂). Enseguida se alicuotaron y congelaron a -80°C hasta su uso. Para la titulación de los homogenizados, se infectaron grupos de ratones BALB/c de 6 -8 semanas de edad con diferentes concentraciones del homogenizado y se evaluó la carga de EDIM en heces mediante un ELISA de captura. De esta manera, por cada preparación se determinó la dosis infecciosa 50 (DI50), la cual indica la dosis a la cual 50 % de los ratones se infectaron usando la fórmula de Red-Muech⁷².

5.3.2 RV de Simio Rhesus

Las células MA104 se infectaron con el RV de Simio Rhesus (RRV) del tipo P5B[3], G3, con la finalidad de amplificar este RV y utilizar este lisado como control positivo de antígeno en las ELISAS de carga viral y como antígeno en las ELISAS de detección de inmunoglobulinas (Ig’s) específicas para RV. El título viral de estos lisados se determinó mediante el ensayo de inmunoperoxidasa en células MA104, el cual permite contar focos infecciosos⁷³.

5.4 Producción de los antígenos

En colaboración con los Drs. Gerardo Espino, Sandra Zurawsky y Gerard Zurawsky, Instituto Baylor para la Investigación en Inmunología, se generaron conjugados entre el anticuerpo monoclonal (Acm) anti-Langerina (4C7) de ratón y VP6 de la cepa de rotavirus murino Ew (VP6_{EW}). Usando una plataforma bastante novedosa que se basa en la interacción con alta afinidad de las moléculas Cohesina- Dockerina que de manera natural conforman el celulosoma bacteriano⁷⁴. De manera independiente, el Acm Anti-Langerina fue expresado *in vitro* en células HEK-293 fusionado a Dockerina (Acm-Lang-Dock) y VP6 fusionado a Cohesina (Cohe-VP6). Las proteínas de fusión se purificaron por una columna de proteína G y en nuestro laboratorio se conjugaron. Para esto, ambas construcciones se mezclaron en PBS por 10 min a temperatura ambiente (T.A), lo que resultó en el conjugado Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6. Teóricamente el conjugado contiene un 70% de masa de Lang-Dock y 30 % de Cohe-VP6 (**Figura 6**). Como control, se produjo un Acm de inespecífico del mismo isotipo del Acm Anti-Langerina (Isotipo-Dock) y se conjugó de la misma manera a Cohe-VP6 (Isotipo-Dock-Cohe-VP6).

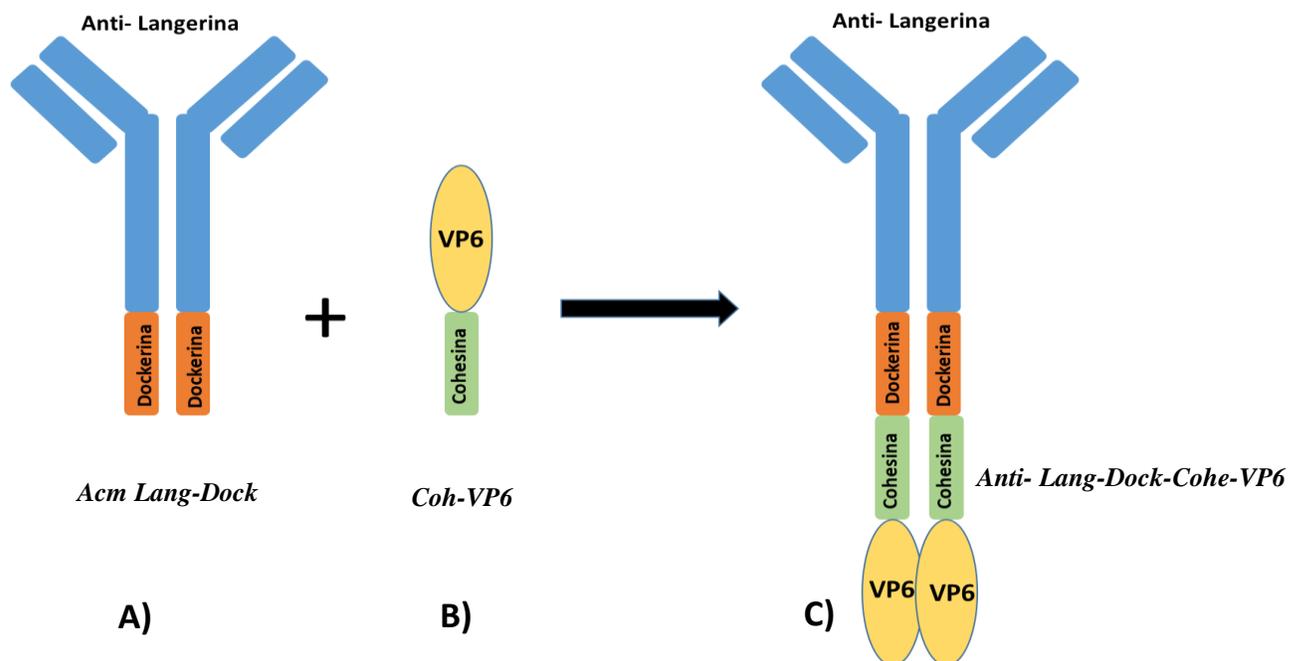


Figura 6: Generación del conjugado Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6. A) Se muestra la construcción del anticuerpo monoclonal Anti-Langerina fusionado con dockerina (Acm Lang-Dock) y B) la construcción Cohesina fusionado con VP6 (Coh-VP6), ambas realizadas por Dres. Zurawsky y Espino. C) La mezcla de ambas construcciones generan el conjugado **Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6** por la alta afinidad que existe entre la cohesina y dockerina. (Tomado de Esquivel, 2017)

Por otro lado, el grupo de Baylor también produjo el Acm Anti-Langerina fusionado al carboxilo terminal de la cadena pesada con la secuencia de 14 aminoácidos (aa) RLSFQLMRPPNMTP de VP6_{Ew} (Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂) correspondientes a un epítipo reconocido por células Th en el contexto de la molécula del MHC II (IE^d)⁴⁷ (**Figura 7**).

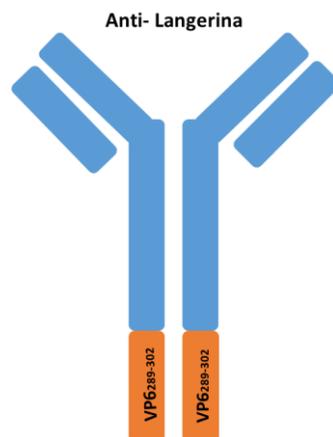


Figura 7: Representación del antígeno vacunal Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂. Acm Anti-Langerina, unido en la cadena pesada, con péptido de VP6 de Ew que corresponde los aa 289-302 (VP6₂₈₉₋₃₀₂). (Tomado de Esquivel)

Las proteínas de fusión y los conjugados generados fueron analizados rutinariamente por mediante geles SDS-PAGE.

5.5 Electroforesis SDS-PAGE

Para el análisis de los conjugados de Anti-Lang-Dock-cohe-VP6, o de Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂, se prepararon geles SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Se prepararon geles separadores al 12% de acrilamida en un volumen de 5 mL, para ello se mezclaron 2.248 mL de H₂O destilada, 2 mL de acrilamida al 30% (Biorad), 650 µL de Tris 3M pH 8.8, 50 µL de SDS al 10%, 50 µL de persulfato de amonio al 10% y 2µL de TEMED. La solución se vertió entre los cristales cubriendo las $\frac{3}{4}$ partes del área e inmediatamente se terminaron de llenar los vidrios con agua destilada para nivelar la superficie del gel. Se dejó polimerizar el gel por 20 minutos a T.A, se retiró el H₂O. Para los geles al 11% de acrilamida se mantienen las mismas concentraciones de los componentes, excepto que se agregaron 1.83 mL de acrilamida al 30%. A continuación se preparó el gel concentrador al 5% de acrilamida en un volumen de 2 mL con 1.37 mL de H₂O destilada,

340 μL de acrilamida al 30% (Biorad), 250 μL de Tris 1M pH 6.80, 20 μL de SDS al 10%, 20 μL de persulfato de amonio al 10% y 2 μL de TEMED, enseguida se vertió y se colocó un peine y se dejó polimerizar por 30 minutos a T.A. Posteriormente, las placas de vidrio fueron insertadas en la cámara electroforética y se agregaron 500 mL de buffer de corrida (25 mM Tris-base, 250 mM, 0.1% SDS).

Las muestras de proteínas se mezclaron con buffer de carga 5x (35 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 5% v/v glicerol y 0.1% de azul de bromofenol) en un volumen final de 20 μL , se hirvieron por 5 minutos, se enfriaron en hielo y se cargaron en las diferentes muescas del gel. Las muestras fueron cargadas con el agente reductor 2- β mercapto etanol (2-ME) o con ditioneitol (DTT) al 1%. Como control de corrida se utilizaron 4 μL de una mezcla de marcador de peso molecular con un rango de 250-10 KDa (Fermentas). Las proteínas se corrieron a una corriente inicial de 5 mAmp (mili Amperes) por 5 minutos y posteriormente a 20 mAmp por 60 minutos.

5.6 Western-Blot

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Perkin Elmer) en una cámara de transferencia (BioRad). El gel y la membrana se cubrieron con el buffer de transferencia (34 Mm Tris, 276 mM Glicina y 162 mL de etanol absoluto por cada 700 mL de buffer) y se llevó a cabo la transferencia a una corriente de 200 mAmp por 1 hora. Enseguida la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con PBS-tween al 0.05% con 10% de leche por 20 minutos a T.A. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-tween 0.05% y se agregó el anticuerpo policlonal anti RV hecho en conejo diluido 1:15,000 en solución de bloqueo y se dejó en agitación por 16 horas a 4°C. Se lavó por 6 veces con PBS-tween 0.05% y se agregó el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-Conejo-HRP (Dako) diluido 1:15,000 diluido en solución de bloqueo. Se lavó por 6 veces con PBS-tween 0.05% y se reveló con 300 μL de luminol más 300 μL de solución oxidativa (Kit Western Lightning Plus, Perkin Elmer). Enseguida la membrana se expuso en el scanner Odyssey.

5.7 Inmunizaciones

Para evaluar la capacidad de los conjugados de Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 para inducir una respuesta inmune anti-RV, grupos de 4-5 ratones BALB/c fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) con conjugados equivalentes a 3.5 μg de VP6 en presencia de 50 μg de Poli I:C como adyuvante. Como controles, dependiendo del experimento, grupos de ratones fueron inoculados con el Acm Anti-Lang-Dock, Isotipo-Dock-Coh-VP6, 5 μg de VP6 solo o PBS en presencia de adyuvante. La segunda inmunización se realizó el día 21 bajo las mismas condiciones. Al día 42 del inicio del experimento los ratones se retaron oralmente con el RV murino EDIM_{wt} para evaluar la carga viral en heces en los diferentes grupos. A los días 0, 21 y 42 se tomaron muestras de suero para evaluar los Ac's anti-VP6.

Por otro lado, grupos de 2-3 ratones se inocularon s.c con Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ a una concentración equivalente a 500 ng del péptido en compañía de 50 μg Poly IC por 2 ó 3 dosis separadas por 21 días. Como controles negativos se inoculó 1 μg de péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ o PBS en presencia de adyuvante. Veintiún días después de la última dosis se infectaron los ratones oralmente con EDIM_{wt} para evaluar la carga viral.

5.8 Infección de ratones con el RV murino EDIM_{wt}

Previo a la infección se administraron a los ratones 100 μL de bicarbonato al 1.33% por vía oral con el fin de neutralizar el pH estomacal, por medio de una cánula gastroesofágica. Diez minutos después, los ratones se inocularon oralmente con 100 μL de DMEM sin suero de una dilución de homogenizado intestinal con EDIM 1:500³⁰. Cabe destacar que inmediatamente antes de infectar con EDIM y cada 24 horas durante los siguientes 8 días se colectaron heces de los ratones en tubos eppendorf, los cuales se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.9 ELISA para determinar carga viral

Las muestras de heces se descongelaron y resuspendieron al 5% (peso/volumen) en una solución amortiguadora disolvente (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 5% de suero fetal bovino, 0.05% Tween-20, 10 mM azida de sodio) y se incubaron a 4°C de 14 a 16 horas. Posteriormente, las muestras se agitaron vigorosamente en un vortex para disgregar

las heces y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante (SN) obtenido se utilizó para el análisis por ELISA como un parámetro de replicación viral.

A placas de 96 pozos de fondo redondo de alta adherencia (Corning) se les agregaron 50 μL /pozo de un Ac policlonal de cabra contra varias cepas de RV's (hecho en nuestro laboratorio) diluido 1:5000 en PBS y se incubaron a 4 °C de 14 a 16. Después, la placa se lavó dos veces con TNC (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl_2) con 0.05% de Tween-20 (TNC-Tw) y se bloqueó con 50 μL de 5% de leche descremada en polvo disuelta en TNC-Tw por 2 horas a T.A. Al término de este tiempo las placas se lavaron con 150 μL de TNC-Tw por 2 veces, se agregaron 50 μL de los SN de las heces por duplicado y se incubó a 37°C por 2 horas. En este paso, para el control positivo se agregó a un par de pozos lisado de células MA104 infectadas con RV RRV y como control negativo un par de pozos se agregó solución amortiguadora disolvente. Las placas se lavaron por 4 veces con TNC-Tw, se agregaron 50 μL un anticuerpo policlonal hiperinmune contra RV RRV producido en conejo (hecho en nuestro laboratorio) diluido 1:2000 en TNC-Tw con 5% de leche descremada y se incubó por una hora a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con TNC-Tw, se añadieron 50 μL de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Zymed) diluido 1:2000 en TNC-Tw con 5% de leche y se incubó por 1 hora a 37°C. Después de lavar 4 veces con TNC-Tw, se añadieron 50 μL de sustrato p-nitrofenil fosfato disodio disuelto en 1:50 en dietanolamina (0.1% de dietanolamina, 1mM MgCl , 0.029% Azida de sodio) y se incubó de 30 a 60 min 37°C y se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Multi Skan (Labsystems).

5.10 ELISA para la detección de Ig's anti-RV en suero

Los ratones fueron sangrados de la cola en los días que se indican para cada experimento. Para obtener el suero, los ratones se metieron en un caja limpia y se calentaron en presencia de un foco por 5 min con la finalidad de dilatar las venas de la cola. Enseguida se frotó la cola con etanol y se secó con papel limpio. Con un bisturí se hizo un corte transversal en una vena dilatada y se colectó la sangre en un tubo eppendorf. Los tubos con sangre se mantuvieron en hielo por 2 horas para después ser centrifugados a 4500 rpm a T.A por 5 minutos. La fase acuosa se recuperó en otro tubo y se almacenó a -20°C hasta su análisis

Para el ELISA se cargó una placa de 96 pozos (Corning 3366) con 50 μL /pozo de un anticuerpo policlonal de cabra contra varias cepas de RV diluido 1: 5000 en PBS 0.02% de Azida de Sodio y se dejó incubando de 14-16 horas a 4°C. Se lavó con 150 μL /pozo por 2 veces con PBS Tween 0.05% (PBS-Tw) y se bloqueó con 150 μL de PBS Tw-leche 5% y 0.02% Azida de Sodio por 2 horas a T.A. Se lavó por 4 veces con PBS-Tw y se incubó la placa con 50 μL /pozo de lisado de RRV por 2 horas a 37°C. Se lavó por 4 veces con PBS - Tw y se colocaron 50 μL de los sueros diluidos 1:50 en PBS -Tw leche 5% y 0.02% Azida de Sodio por 1 hora a 37°C. Como control positivo se cargó un suero de un ratón infectado con EDIM_{wt} de 21 días post infección y como control negativo PBS-Tw leche 5% y 0.02% Azida de Sodio. Se lavó por 4 veces con PBS-Tw y se agregaron 50 μL de anticuerpo anti Ig's de ratón peroxidasa diluido 1:1500 en PBS-Tw por 1 hora a 37°C. Se lavó 4 veces con PBS-Tw y se agregaron 50 μL /pozo de la preparación de 2 mg sustrato ortofenil-Fenilendiamina;Sigma disuelto en 5 ml de buffer citratos-fosfatos (ácido cítrico 51.4 mM y Fosfato de sodio 24.3 mM más 10 μL de H₂O₂) y se incubó por 10 minutos a T.A y la reacción se detuvo con 50 μL de ácido sulfúrico 2M. Finalmente se leyó la absorbancia a 492 nm.

5.11 Obtención de células de bazo

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y las células de bazo fueron obtenidas como se indica a continuación:

El bazo fue extraído con material de disección estéril en presencia de dos mecheros. El bazo inmediatamente se colocó en un tubo con 10 ml de solución de sal balanceada de HANK esterilizada por filtración (NaCl 8000 mg/L, KCl 400 mg/L, KH₂PO₄ 60 mg/L, Glucosa 1000 mg/L, Na₂HPO₄ 48 mg/L, MgSO₄ 98 mg/L, CaCl₂ 140 mg/L, NaHCO₃ 350 mg/L y EDTA 2mM). El bazo se maceró con una malla de acero inoxidable usando el émbolo de una jeringa de 10 ml. La suspensión celular se pasó a través de una malla de 100 μm (CORNING 431752) y se centrifugó 1200 rpm a T.A por 5 min. El botón celular se resuspendió en 8 mL de solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 12 mM y EDTA 0.1 mM) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Enseguida, se añadieron 7 mL de solución HANK y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. El botón celular se lavó 2 veces con 10 ml de HANK centrifugando a 1200 rpm por 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 ml de RPMI⁺ y se contaron las células viables usando azul de tripano y una cámara de Neubauer.

5.12 Purificación de células T CD4⁺ de bazo.

Las células T CD4⁺ de bazo fueron purificadas por el método de adherencia (“panning”), una placa Petri bacteriológica de poliestireno se 100 X 15 mm de diámetro se cubrió con 10 mL de Tris 0.05 M pH 9.5 conteniendo 5 µg/mL del Acm de rata anti CD4 de ratón GK1.5. Después de incubar por 40 min a TA, la placa se lavó suavemente 4 veces con 10 mL de PBS, seguido de un quinto lavado con 5 mL de PBS 1% SFB. Una placa se cargó con 37x10⁶ células provenientes de bazo de ratón Anti Langerina-Dock-Cohe-VP6 y otra con 17x10⁶ células provenientes de bazo de ratón Isotipo-Dock-Cohe-VP6, resuspendido cada grupo en 3 mL de PBS 5% SFB y se incubó por 40 min a 4°C, se distribuyeron las células homogéneamente por inclinación leve y se dejó incubando por 30 min más a la misma temperatura. Al término de la incubación se colectaron las células no adheridas, se centrifugaron y contaron para usarlas en ensayos de transferencia celular y citofluorometría. Para recuperar las células adheridas se adicionaron 25 ml de PBS 1 % de SFB y se pipeteó vigorosamente y estas serían células enriquecidas con T CD4⁺. Se centrifugaron y contaron para usarlas en ensayos de transferencia celular y citofluorometría.

5.13 Transferencia de células a ratones no inmunizados

Para evaluar la capacidad de las células de bazo o las células T CD4⁺ específicas para VP6 para inducir protección contra la infección por rotavirus, grupos de ratones fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con diferentes cantidades de células (dependiendo del experimento) en 100 µL de PBS. Se utilizó una jeringa de insulina con aguja 32 G. Enseguida se infectaron los ratones con el rotavirus murino EDIM (en el caso de células aisladas TCD4⁺aisladas por “panning”) o a las 2 hr post-transferencia para el resto de los experimentos y se evaluó la replicación viral a lo largo de 8 días como se indica en **Apartado 5.9.**

5.14 Producción de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales (Acm's) de rata anti-CD4 y anti-CD8, fueron producidos en ratones desnudos (*nu/nu*) de 6 a 8 semanas de nacidos. Para esto, se inocularon 150 µL de adyuvante incompleto de Freund o Pristane (2,4,6,19,14 tetrametilpentadecano, Sigma) i.p. Dos semanas después, se inocularon 2x10⁶ a 4x10⁶ células de los hibridomas anti-CD4

GK1.5 o anti-CD8 53.67.2 en 100 μ L de PBS. Después de 1 a 2 semanas se colectó el ascites por medio de una punción i.p. con una aguja de calibre grueso 27 G. El ascites se colectó en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 2000 rpm a 4 °C. Se tomó el SN tratando de evitar la grasa y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Se cuantificó la concentración de proteína mediante el micrométodo de BCA (ácido bicinonínico) (Pierce).

5.15 Eliminación *in vivo* de células T CD4⁺ y CD8⁺

Para la eliminación de células T *in vivo* los ratones fueron inoculados i.p. con 500 μ L de PBS conteniendo cantidades apropiadas de ascites de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 GK1.5 o anti-CD8 53-6.72. Se realizaron 3 inoculaciones separadas por 3 días. La eliminación de las células T CD4⁺ o CD8⁺ se confirmó por citofluorometría de flujo con anticuerpos específicos usando células de bazo.

5.16 Generación de líneas celulares *in vitro* de células T CD4⁺ específicas para VP6 de RV

Para la generación de una línea celular *in vitro* de células T CD4⁺ específicas para VP6 de RV, se realizaron ciclos de estimulación antigénica y expansión con células de bazo de ratones vacunados con Lang-Dock-Cohe-VP6. Así, se estimularon 2×10^6 células /mL de RPMI⁺ con 1 a 5 μ g de VP6 purificado (producido *in vitro* en el laboratorio de la Dra. Lourdes Gutiérrez, CISEI, INSP) previamente sometido a luz ultravioleta para prevenir contaminación de los cultivos. Al tercer día de cultivo se adicionaron 10 % v/v de sobrenadante condicionado de células XG310 mIL-2 (que contiene altos niveles de IL-2 de ratón), para expandir las células T CD4⁺ activadas (específicas para VP6) y se continuó la incubación por 4 días más. Al término de este tiempo, las células se colectaron y se sembraron a 2×10^5 células/ mL en presencia de 2×10^6 células/ mL de células de bazo normal tratadas con Mitomicina C (células presentadoras) para prevenir su replicación y de 1 a 5 μ g de VP6. Para el tratamiento con mitomicina, 2×10^7 células de bazo/ mL se incubaron por 20 min a 37 °C con 25 μ g de Mitomicina C (Sigma) y posteriormente se lavaron dos veces con medio sin suero y se adicionaron al cultivo. Después de 3 días de incubación se adicionaron 10 % v/v de sobrenadante condicionado de células XG310 mIL-2 y se continuó

el cultivo por 4 días. Este último ciclo de estimulación- expansión se repitió hasta un máximo de 5 veces para tratar de obtener una línea celular pura.

5.17 Citofluorometría

Las células previamente colectadas se resuspendieron en 500µL de Buffer de enlace (BE) + 2 % de suero de conejo y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Después, las células se distribuyeron a una placa de 96 pozos de fondo en “v” (Costar) y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante de los pozos se decantó y se agregaron 50 µL del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4-FITC (clona RMA-5; eBioscience), anti-CD8a_APC (clona 53-6.7; BioLegend) o anti-TCRβ-FITC (clona H57-597; BioLegend), diluidos 1;200 en BE, se incubó a 4°C durante 20 minutos protegido de la luz. Después, se agregaron 100 µL de BE y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. El SN de los pozos se descartó, se agregaron 100µL de paraformaldehído al 2 % en PBS y se incubó por 20 min a TA. Finalmente, las células de cada pozo se pasaron a tubos de plástico para su análisis por citofluorometría, usando el citómetro BD-FACS CANTO II (laboratorio de la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay, IBT-UNAM) o el citómetro AMNIS IMAGESTREAM MARK (IBT). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Flow-Jo.

5.18 Análisis estadístico

La significancia estadística (valor-*p*) fue calculada usando la prueba ANOVA de una vía y de dos vías. Las pruebas fueron calculadas por el software Prisma 5.0 (GraphPad Software In. LA Jolla, CA).

6 RESULTADOS

6.1 Caracterización de las vacunas usadas

6.1.1 *Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6*

Como se mencionó previamente, el Acm Anti-Lang-Dock y la proteína de fusión Cohe-VP6 fueron producidas *in vitro* por células HEK-293 transfectadas. Para generar la vacuna, ambas proteínas fueron mezcladas en PBS para producir el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6. El Acm Anti-Lang-Dock, la proteína de fusión Cohe-VP6 y el conjugado fueron analizados por electroforesis en un gel de acrilamida y por Western Blot usando un Ac policlonal anti-RV, ambas electroforesis se realizaron en condiciones reducidas. En el gel de acrilamida se puede apreciar que el Acm Anti-Lang-Dock generó dos bandas, una de aproximadamente 55 kDa, tamaño cercano al peso esperado de 57 kDa de la cadena pesada fusionada a Dockerina, y otra de 25 kDa correspondiente a la cadena ligera (**Figura 8 A**). Por otro lado, Cohe-VP6 presentó un peso de aproximadamente 100 kDa cuando el peso esperado era de 70 kDa, esto se pudo deber a modificaciones postraduccionales no contempladas en el cálculo del peso molecular. Cuando el conjugado se analizó, se encontraron las tres bandas correspondientes a la cadena ligera, la cadena pesada fusionada a Dockerina y Cohe-VP6. Como se esperaba, en el Western Blot solamente Cohe-VP6 y el conjugado dieron una señal en el peso molecular de 100 kDa que corresponde a Cohe-VP6 (**Figura 8 B**). El conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 también se analizó en condiciones no reducidas, sin embargo, su alto peso molecular (teóricamente 450 kDa) impidió su resolución en el gel (resultado no mostrado). Estos resultados nos confirman la identidad de las proteínas recombinantes y que estas pueden formar eficientemente el conjugado anti-Lang-Dock-Cohe-VP6.

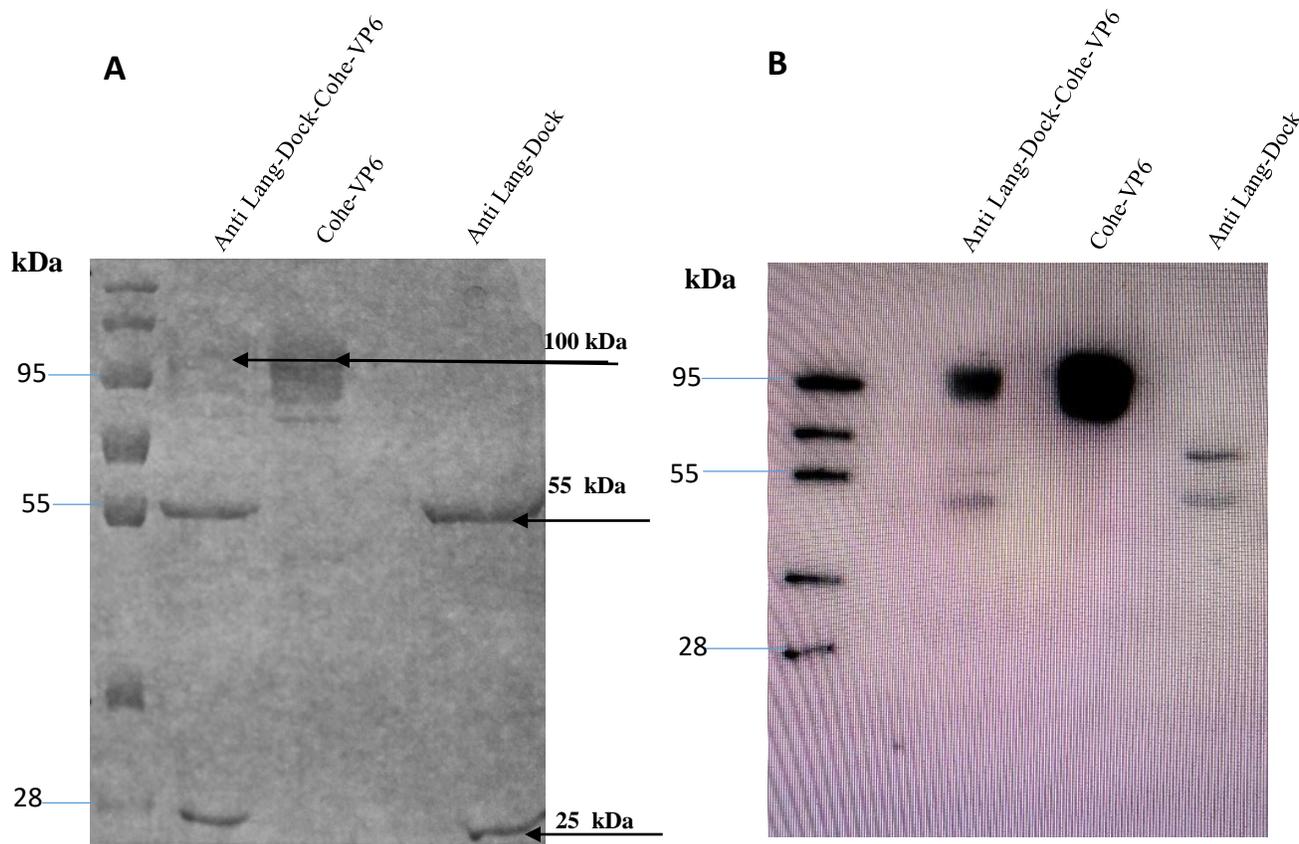


Figura 8: Caracterización del conjugado *Anti Lang-DockCohe-VP6*. A) Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Todas las muestras se trataron con el agente reductor DTT. Se observa la cadena pesada de aproximadamente 57 kDa y la cadena ligera de 25 kDa (flechas) tanto en el conjugado Anti Lang –Dock-Cohe-VP6 como en Anti Lang-dock. Por otro lado, también se observa una banda de aprox. 100 kDa (flecha) en el conjugado, indicando la presencia de cohe-VP6 B) Western Blot (gel SDS-PAGE al 10%) revelado con el anticuerpo policlonal primario anti RV y usando como secundario un anti conejo-Peroxidasa hecho en cabra, para evaluar la conjugación de Cohe-VP6 a Anti- Langerina-dock. En la muestra de Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6 y en el control positivo cohesina: VP6 se observa una banda de 100 kDa indicando la presencia de VP6. Anti Lang-dock como control negativo.

6.1.2 *Anti-Lang-VP6*₂₈₉₋₃₀₂

Una estrategia alternativa de vacunación fue fusionar la cadena pesada del Acm Anti-Langerina con un péptido de VP6 que corresponde a los aa 289-302, que representa un epítipo de células T CD4+ presentado en el contexto de la molécula de clase II IE^d. El Acm Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ se analizó por medio de un gel de acrilamida en condiciones tanto reducidas como no reducidas. Aunque el peso molecular esperado en condiciones no reducidas era de 154 kDa, se encontró un barrido de proteína entre 141.25 kDa y 230 kDa. Esto se pudo deber a las diferentes conformaciones que pueden adquirir una macromolécula que resulta en un rango de pesos moleculares aparentes. Por otro lado, como se esperaba, se

encontraron dos bandas, una de aproximadamente 50 kDa, tamaño cercano al peso esperado de 52 kDa de la cadena pesada fusionada a VP6₂₈₉₋₃₀₂, y otra de 25 kDa correspondiente a la cadena ligera (**Figura 9**). De esta manera, se corroboró la identidad del Acm Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂.

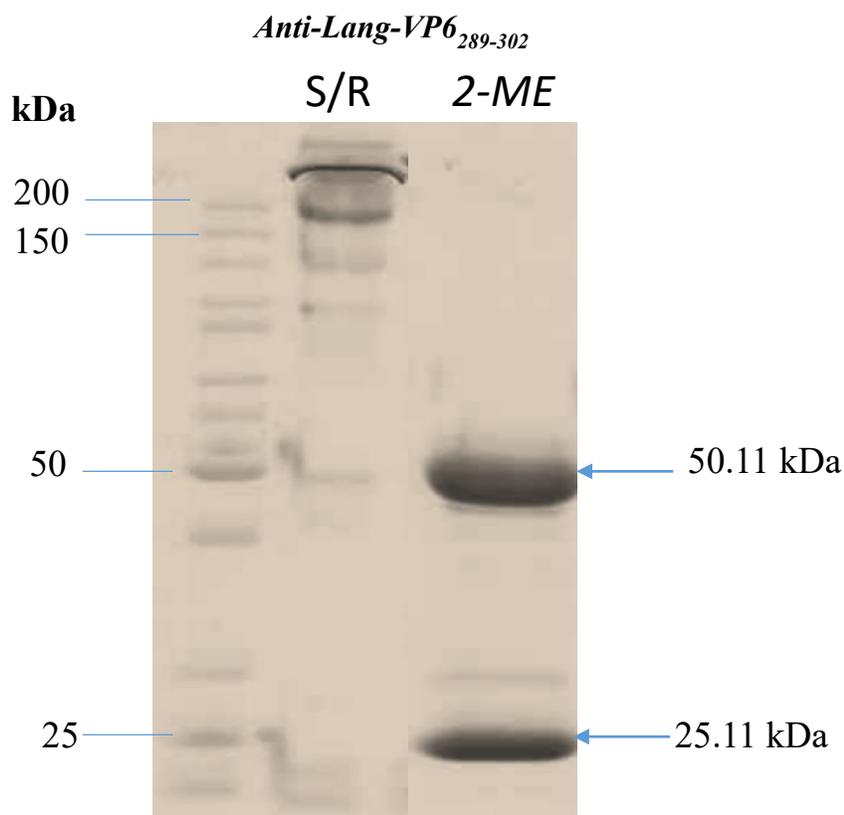


Figura 9. Evaluación de la integridad de la vacuna *Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂*. Se determinó en un gel SDS-PAGE al 11% tanto en condiciones sin reducir (S/R) y reducidas (2-ME) la integridad de la vacuna Acm Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂, la cual contiene un epítoto de VP6 que es reconocido por células T CD4⁺ en el contexto de la molécula de clase II IE^d. Bajo condiciones sin reducir, se observa que la construcción adopta diferentes conformaciones lo cual se refleja en un bandeado, mientras que en condiciones reductoras, se obtienen las cadenas pesadas y ligeras, con los pesos de 50.11 y 25.11 kDa respectivamente.

6.2 Inmunogenicidad del conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6

Estos experimentos se llevaron a cabo con la colaboración del Dr. Oscar Badillo del CISEI, INSP. Se realizó un primer experimento para determinar si el conjugado anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 era inmunogénico a través de la evaluación de anticuerpos séricos. Grupos de 5 ratones fueron inoculados s.c. con conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 equivalente a 3.5 µg de VP6, en presencia de 50 µg de Poly I:C como adyuvante. Como control, un grupo

de ratones fue inoculado con el Isotipo-Dock-Cohe-VP6 equivalente a 5 μg de VP6. Después de 21 días los ratones fueron re-inoculados de la misma manera. Se obtuvo suero de los ratones a los días 0, 21 y 37 y se determinaron los niveles de anticuerpos totales contra VP6. Se encontró que en el grupo vacunado con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 hubo un pequeño incremento de anticuerpos anti-VP6 al día 21 (**Figura 10**), aumentándose drásticamente para el día 37. El grupo control inoculado con el Isotipo-Dock-Cohe-VP6, solamente presentó bajos niveles de anticuerpos al día 37. Este resultado demostró que el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 es inmunogénico ya que puede inducir anticuerpos séricos contra VP6 y la conjugación de VP6 con el Acm Anti-Langerina es indispensable para este efecto.

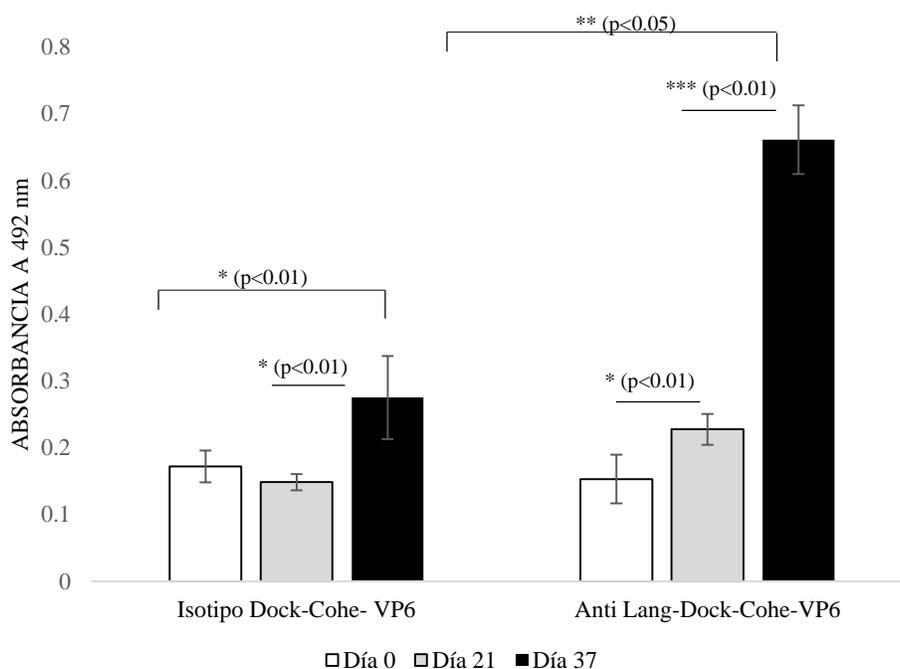


Figura 10: Inducción de anticuerpos séricos contra RV por la vacunación con diferentes conjugados con VP6. Se vacunaron ratones de manera s.c con 2 dosis de los conjugados Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 o Isotipo-Dock-Cohe-VP6 y a los 0, 21 y 37 después de la 1era dosis, se sangraron a los ratones de la cola para obtener suero. Se midieron los anticuerpos totales mediante un ELISA, para ello, se diluyeron los sueros 1:50 y se usó como antígeno lisado de células MA 104 infectadas con RRV. Las comparaciones de la producción anticuerpos entre los diferentes conjugados y del aumento de anticuerpos a través del tiempo dentro del grupo experimental se realizaron mediante ANOVA. Las diferencias con significancia estadística se indican con asteriscos. Las desviaciones estándar \pm son la media de 5 cinco ratones.

Con la finalidad de determinar si el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 podía inducir una respuesta inmune contra la infección por rotavirus a nivel intestinal, se realizó un segundo experimento en el cual 4 ratones fueron inoculados s.c. con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 equivalente a 1.5 μg de VP6, en presencia de adyuvante. Como controles se inocularon ratones con 3 μg de VP6 purificado o Anti-Lang-Dock, también en presencia de adyuvante. Después de 21 días se dio un refuerzo bajo las mismas condiciones y 21 días después los ratones fueron retados oralmente con el rotavirus murino EDIM_{wt}. Los niveles de RV excretado en las heces durante 8 días post-reto, fueron evaluados por ensayos de ELISA de captura. Se encontró que el grupo control inoculado con Anti-Lang-Dock presentó una curva clásica de excreción viral en las heces, esto es, se presentó una fuerte señal de antígeno al día 2 que se mantuvo hasta el día 5 y que comenzó a descender al día 6, para desaparecer por completo al día 8 (**Figura 11**). Los ratones vacunados con VP6 purificado, solamente presentaron una disminución de la señal con respecto al control al día 6. En contraste, los ratones inoculados con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 presentaron una clara reducción en la carga viral en las heces al día para desaparecer por completo al día 6. Para poder obtener el porcentaje de protección por la vacunación con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 o con VP6 en comparación con el control Anti-Langerina-Dock, se obtuvo el área bajo la curva obtenida en el ELISA de carga viral de cada grupo, considerando como referencia el 100% de infección por la vacunación con el control Anti-Langerina-Dock. De esta manera, los resultados de la reducción de la infección por las diferentes vacunas indican que los ratones inoculados con VP6 purificado presentaron una protección contra la infección de un 10% y los ratones inoculados con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 de un 60%. Este resultado indica, como se esperaba, que VP6 administrado parenteralmente induce una respuesta inmune protectora contra rotavirus a nivel intestinal muy pobre, sin embargo, cuando es direccionado a Langerina, presente en las CD's, esta protección se potencia significativamente. Por experimentos previos del laboratorio, sabemos que esta protección no es dependiente de anticuerpos IgA's intestinales, por lo que muy probablemente depende de células T⁴⁴.

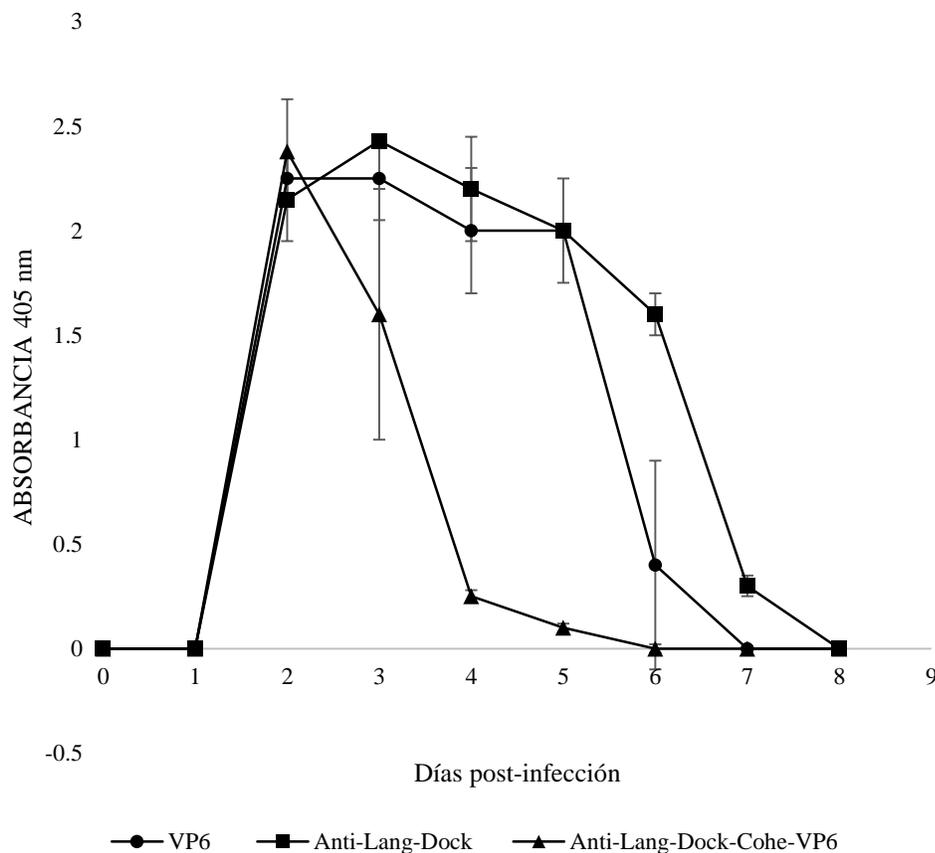


Figura 11. Carga viral en heces de ratones vacunados con los conjugados con VP6. Se vacunaron ratones con Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6 con dos dosis y a los 21 días de la última dosis se retiraron con EDIM_{wt} y se colectaron las heces por los siguientes 8 días para ser evaluadas en su carga de EDIM mediante un ELISA de carga viral usando como anticuerpo primario un anti-RV de conejo. Como control se vacunó un grupo de ratones con Anti-Lang-Dock. Las desviaciones estándar \pm son la media de grupos de 5 ratones.

6.3 Inmunogenicidad de la fusión anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂.

Mediante ELISA se analizó tanto la capacidad de la fusión Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ para inducir la producción de anticuerpos contra RV, como la capacidad de proteger contra la infección por rotavirus a nivel intestinal. Como se mencionó anteriormente, en este caso el Acm Anti-Langerina se fusionó con un epítipo de células T CD4⁺ de la proteína VP6, por lo que la posible protección sería dependiente de células T CD4⁺. Grupos de 5 ratones fueron inmunizados s.c. con la fusión Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ equivalente a 500 ng de VP6₂₈₉₋₃₀₂ en presencia de 50 μ g de Poly I:C como adyuvante. Como controles se inocularon 5 ratones con PBS o con 1 μ g del péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂, en presencia de adyuvante. A 3 ratones se les dio un solo refuerzo y a los otros 2 se les dio dos refuerzos, separados por 21 días entre ellos.

Veintiún días después del último refuerzo los ratones fueron infectados oralmente con el rotavirus murino EDIM_{wt} y la carga viral en las heces evaluadas por un ensayo de ELISA de captura como se describió arriba (**Figura 12 A y B**). Cabe mencionar que los ratones que recibieron tres dosis de vacunación solo pudieron ser evaluarlos en su carga viral en heces hasta el día 4to post-infección (**Figura 12 B**) debido a cuestiones de seguridad derivadas tras el sismo.

Se encontró que después de 2 o 3 inoculaciones no hubo claras diferencias entre la replicación viral de los ratones inoculados con Anti-Lang-VP₆₂₈₉₋₃₀₂ en comparación con los controles. Este resultado nos indica, que bajo nuestras condiciones experimentales la secuencia peptídica VP₆₂₈₉₋₃₀₂ fusionada a la cadena pesada del Acm Anti-Langerina no induce una respuesta inmune protectora contra la infección a nivel intestinal.

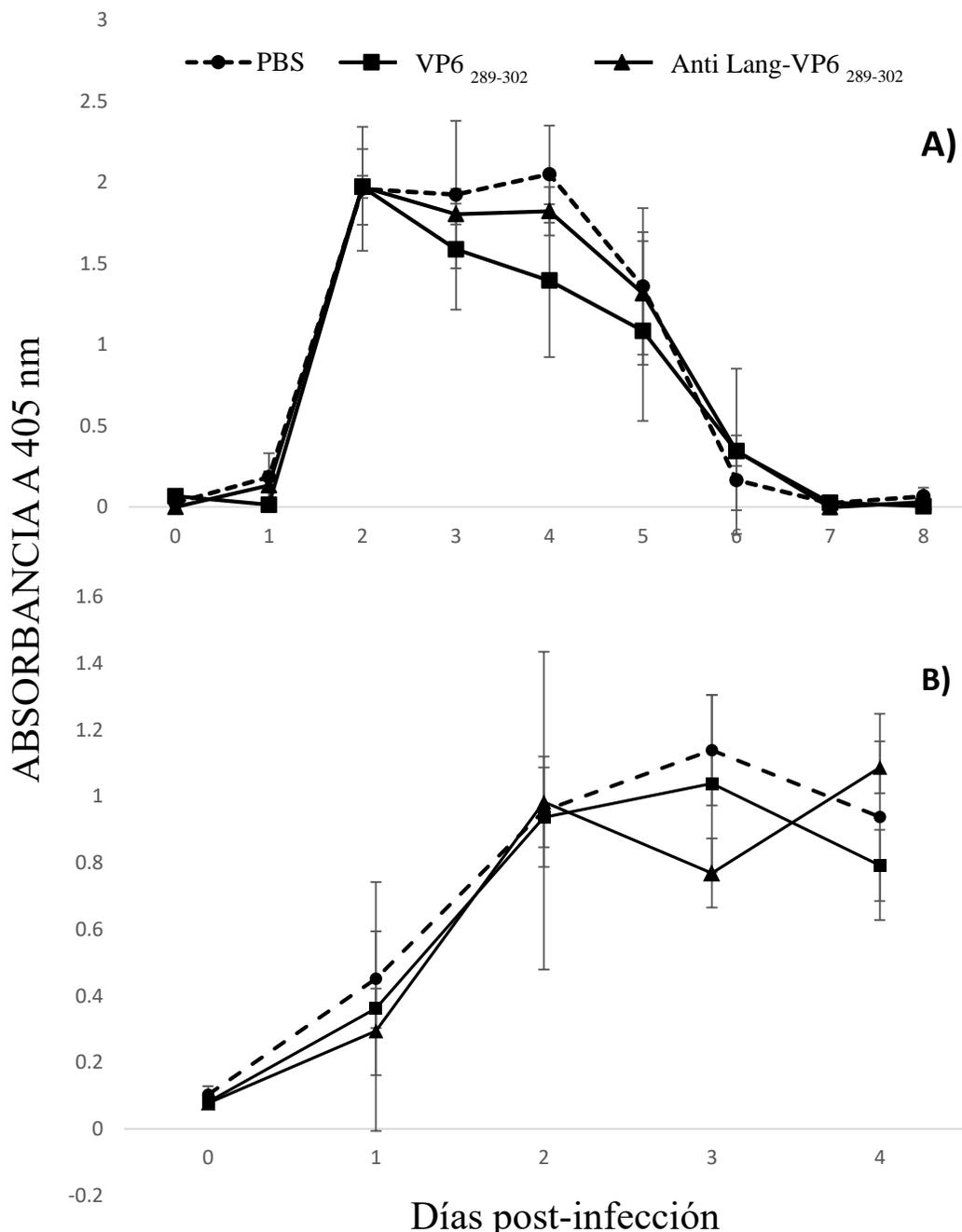


Figura 12: Carga viral en heces de ratones vacunados con fusiones de péptido de VP6. Se vacunaron ratones con Anti- Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ con dos dosis (**A**) o con 3 dosis (**B**) y a los 21 días de la última dosis se retaron con EDIM_{wt} y se colectaron las heces por los siguientes 8 o 4 días para ser evaluadas en su carga viral mediante un ELISA usando como anticuerpo primario un anti-RV de conejo. Como controles se vacunaron ratones con péptido VP6₂₈₉₋₃₀₂ y con PBS. Las desviaciones estándar \pm son la media de grupos de 3 (**A**) o de 2 ratones (**B**).

6.4 Papel de las células T en la protección contra la infección por rotavirus inducida por el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 .

Se procedió a analizar el papel de las células T en protección solamente en el modelo de vacunación con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6, ya que la fusión Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ no indujo niveles significativos de protección. Esto se abordó por dos tipos de metodologías (1) eliminación *in vivo* de las poblaciones de células T y (2) transferencia de células T específicas para VP6 a ratones sin inmunizar y retados con rotavirus.

6.4.1 Eliminación de células T CD4⁺ y CD8⁺ *in vivo* usando Acm específicos.

Se generaron ascites en ratones desnudos de los hibridomas que producen los Acm anti-CD4 GK1.5 y anti-CD8 53.67.2. Las cantidades óptimas de ascites para eliminar las poblaciones se determinaron inoculando 1, 2.5 o 5 mg de ascites en PBS de anti-CD4 o anti-CD8 i.p. tres veces con una separación de 3 días. Como control se inocularon ratones con PBS solo. Después de 24 horas de la última inoculación se obtuvo el bazo y el porcentaje de células CD4⁺ y de CD8⁺ se evaluó por citometría de flujo. Para ello, las células se tiñeron con un Acm anti-CD4-APC clona RM4-5 para evaluar la población de células CD4⁺ o con anti-TCRβ-FITC clona H57-597 y anti-CD8α-APC clona 53-6.7 para evaluar la población de células CD8⁺. Se encontró que los ratones tratados con 2.5 y 5 mg de ascites anti-CD4 eliminaron un 99 % de las células T CD4⁺ y el tratamiento con 1 mg solamente eliminó el 76 % de estas células (**Figura 13**).

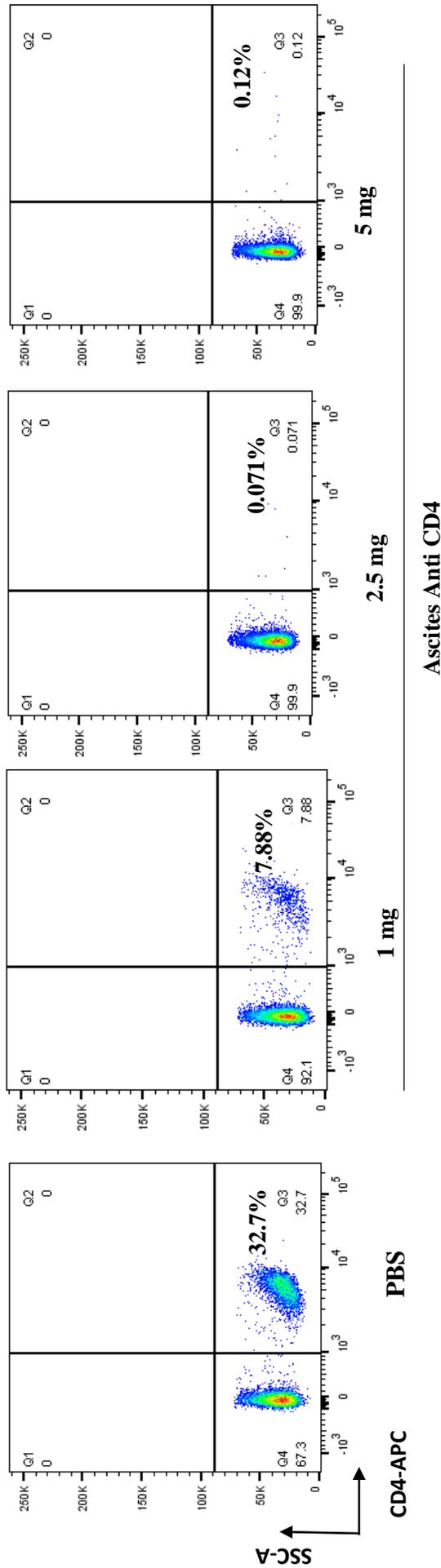


Figura 13. Eliminación de células CD4+ mediante la inoculación de Ascites anti-CD4 provenientes de ratones *nu/nu*. Para probar la capacidad del Ascites anti-CD4 para eliminar células CD4, se inocularon en ratones normales vía i.p diferentes concentraciones que van desde 1 mg a 5mg en tres dosis separadas por tres días. Una vez que culminó el tratamiento con Ascites Anti-CD4, se extrajo el bazo de los ratones y se evaluó por citometría la presencia de células CD4. PBS es el bazo de ratón sin tratamiento.

Por otro lado, para la eliminación de las células T CD8⁺, solamente se evaluaron 2.5 y 5 mg de ascites anti-CD8, encontrándose que ambas cantidades de Acm eliminaban hasta un 90 % de esta población (**Figura 14**). De esta manera, para los ensayos subsecuentes se utilizaron 2.5 mg de ascites de anti-CD4 o anti-CD8.

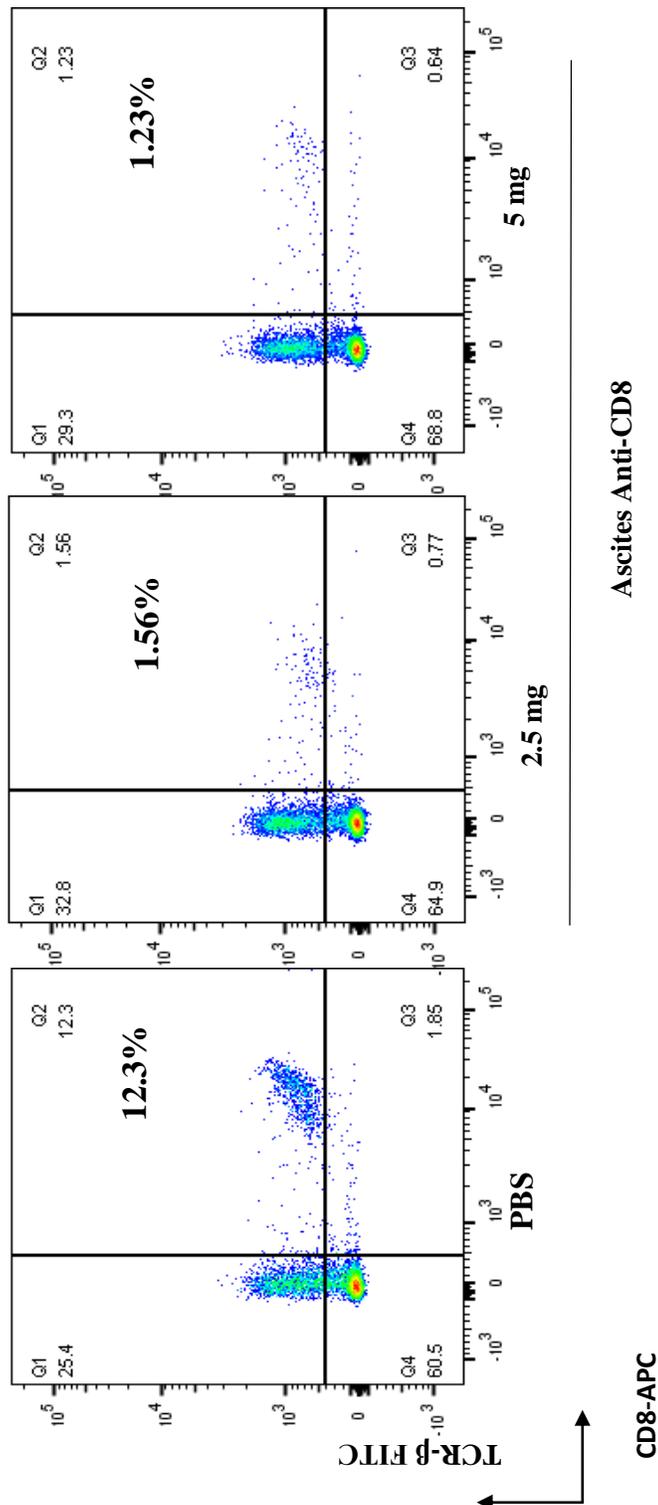


Figura 14. Eliminación de células CD8⁺ mediante la inoculación de Ascites anti-CD8 provenientes de ratones *nu/nu*. Se inocularon i.p diferentes concentraciones de Ascites Anti-CD8 en ratones normales. Una vez que culminó el tratamiento con Ascites Anti-CD8, se extrajo el bazo de los ratones y se evaluó por citometría la presencia de células T CD8⁺, tiñendo con anti-CD8-APC y con anti-TCRβ-FITC. PBS es el bazo de ratón sin tratamiento.

Para determinar el papel de las células T CD4⁺ y CD8⁺ en la protección inducida por el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 se realizaron dos ensayos. En el primero, 7 ratones se vacunaron con el conjugado como se describe en las secciones previas. A los 21 días de la segunda inmunización, 5 ratones fueron retados con el rotavirus murino EDIM_{wt} y dos fueron tratados con ascites anti-CD4 a los días -3,0 y 3 con respecto al reto con rotavirus. Como control se inocularon dos ratones con PBS y se retaron con rotavirus. Los ratones vacunados y retados con el rotavirus presentaron un 50 % de protección con respecto al control de PBS (**Figura 15 A**), pero los ratones vacunados, tratados con anti-CD4 y retados con rotavirus perdieron la protección inducida por la vacuna. Al término de la colecta de heces (8 días) se analizaron las células de bazo por citometría de flujo para determinar los niveles de células T CD4⁺ y, como se esperaba, los ratones control presentaron un 18% de células TCD4⁺ y los ratones tratados con Anti-CD4 un 0.1% de células positivas, corroborando la eliminación de esta población (**Figura 15 B**). Este resultado claramente indica que la población de células T CD4⁺ juega un papel determinante en la protección contra la infección por rotavirus.

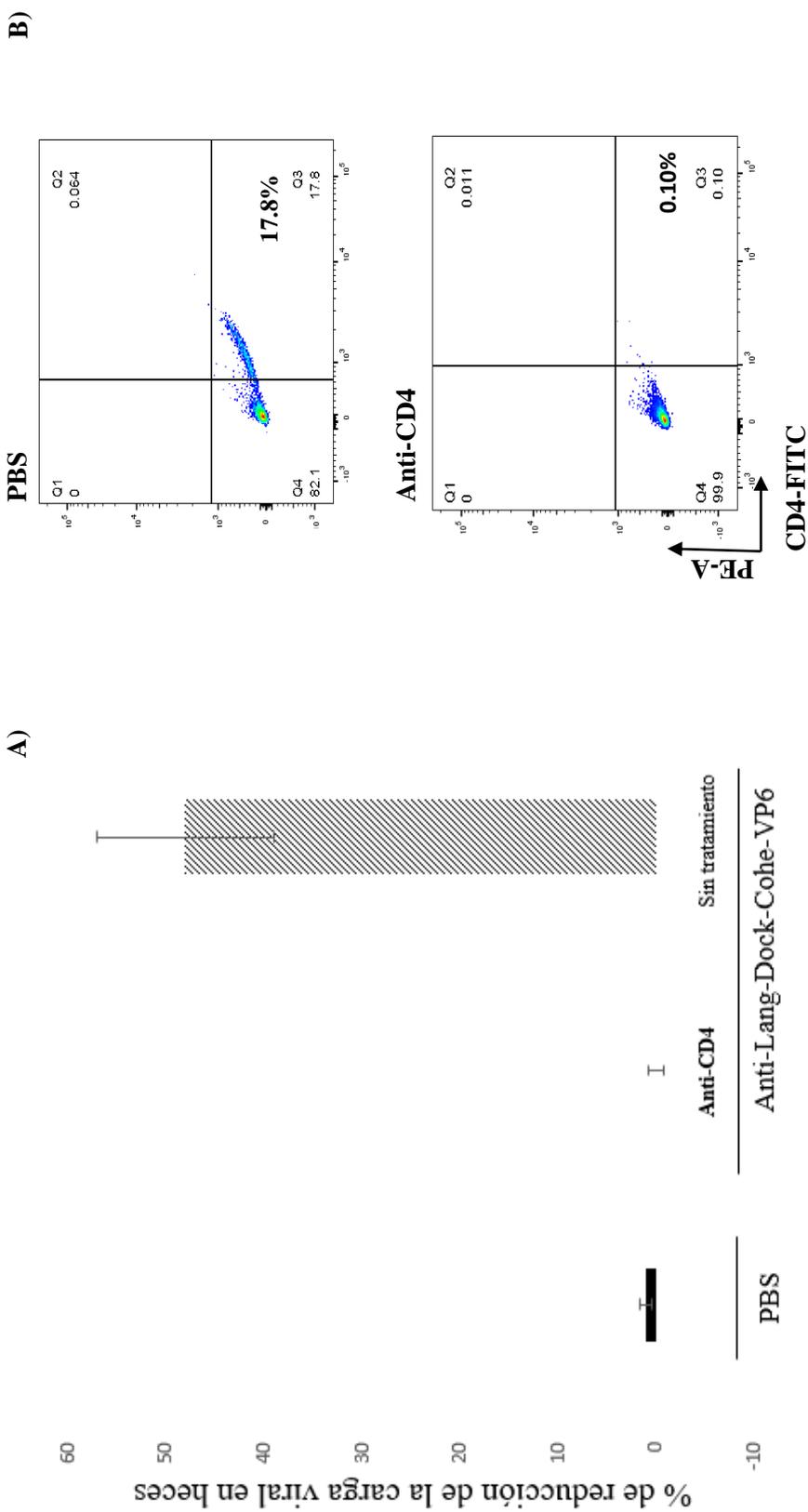


Figura 15. Ratones vacunados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 y tratados con el Abm Anti-CD4 GK1.5. A) ELISA de carga de viral en heces de ratones vacunados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 tratados con o sin Anti-CD4. El resultado se muestra como el % de reducción de la infección de EDIM en comparación con los ratones sin vacunar que no recibieron tratamiento (barra negra $n=2$ ratones) y los ratones vacunados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 sin tratamiento (barra con diagonales $n=5$ ratones). B) Resultado citométrico de células CD4+ de bajo de ratones vacunados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 después de ser tratados con 3 dosis de Anti-CD4 (Anti-CD4) o ratón vacunado tratado con PBS como control.

En un segundo experimento 12 ratones fueron vacunados con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6. Después de 21 días de la segunda inmunización, grupos de 3 ratones fueron inoculados i.p. con PBS, anti-CD4, anti-CD8 o anti-CD4/CD8 en los días -3,0 y 3 con respecto al reto con rotavirus. Como control, 3 ratones se habían inoculado con PBS para retarse con RV, desafortunadamente, por problemas en el bioterio, estos ratones fallecieron antes de ser retados, por lo que no se tuvo una referencia para calcular el porcentaje de protección. De esta manera, los resultados se reportaron como el promedio de las absorbancias (cantidad de virus excretado en las heces) en el ensayo de ELISA a lo largo de los 8 días post-reto (**Figura 16**). Se encontró que el tratamiento con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD4/CD8 indujeron un aumento entre 100 a 120 % en la carga viral con respecto a los ratones vacunados pero no tratados con anticuerpo. Este resultado indica que al igual que las células T CD4⁺, las T CD8⁺ juegan un papel importante en la protección contra la infección inducida por el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6.

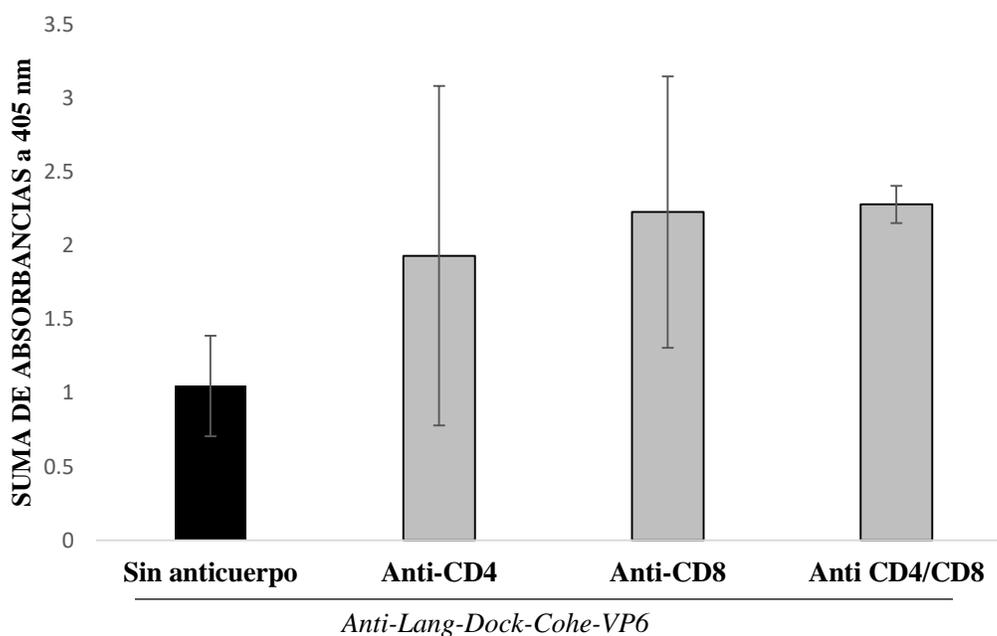


Figura 16. Carga viral en ratones vacunados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 y tratados con Anti-CD8 y Anti-CD4. Ratones inmunizados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 fueron tratados con anticuerpos para eliminar células CD4⁺ y/o CD8⁺ e infectados con EDIM. Enseguida se colectaron las heces por 8 días consecutivos y se evaluó la excreción de carga viral mediante un ELISA. Las absorbancias obtenidas por cada día se sumaron por cada grupo experimental y se compararon con el grupo vacunados sin anticuerpo. Las desviaciones estándar \pm son la media de 2 ratones para el grupo sin anticuerpo y de 3 ratones para los grupos tratados con anticuerpos.

6.4.2 *Transferencia adoptiva de células T de memoria específicas para VP6 de rotavirus*

Un método alternativo para determinar el papel de las células T en la protección contra la infección en ratones vacunados con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 es la purificación de las células T de memoria y transferirlas a ratones no inmunizados para posteriormente retarlos con el RV. De esta manera, se inocularon dos ratones con el conjugado anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 s.c. dos veces como se describe en las secciones previas. Como controles se inocularon ratones con el conjugado Isotipo-Dock-Cohe-VP6, que no induce protección, o con PBS. Tres meses después de la última inoculación se obtuvieron los bazo de los ratones y se purificaron las células T CD4⁺ por el método de “panning”, usando el Acm anti-CD4 GK1.5. De esta manera, se obtendrían células T CD4⁺ enriquecidas y células de bazo deficientes en esta población (bazo T CD4⁻). Se inocularon 3.5x10⁵ células T CD4⁺ o células de bazo T CD4⁻ i.p. en PBS en dos ratones sin inmunizar y se retaron con el rotavirus murino EDIM_{wt}. Se colectaron las heces por 8 días y se determinó la carga viral por un ensayo de ELISA de captura. Como se puede observar en la **Figura 17**, los resultados obtenidos tuvieron una gran variación en cada día analizado. Debido al número de ratones por cada grupo experimental (n=2), no se lograron calcular las diferencias mediante pruebas estadísticas y solo se obtuvieron los errores estándar, sin embargo, solamente en los ratones transferidos con células de bazo T CD4⁻ provenientes de ratones vacunados con el conjugado anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 se vio una clara tendencia a reducir la carga viral en comparación con los controles. Una posible explicación para este resultado es que las células T CD4⁺ de memoria solas no pueden transferir protección sino que se requiere también de las células TCD8⁺ de memoria. De esta manera, es muy probable que en las células de bazo T CD4⁻ todavía exista un número residual de células T CD4⁺. Esto se tendría que determinar en futuros experimentos. Sin embargo, este último resultado apoya la idea de que la protección contra la infección inducida por el conjugado depende tanto de las células T CD4⁺ como CD8⁺, como lo sugiere el resultado anterior de eliminación de estas poblaciones *in vivo*.

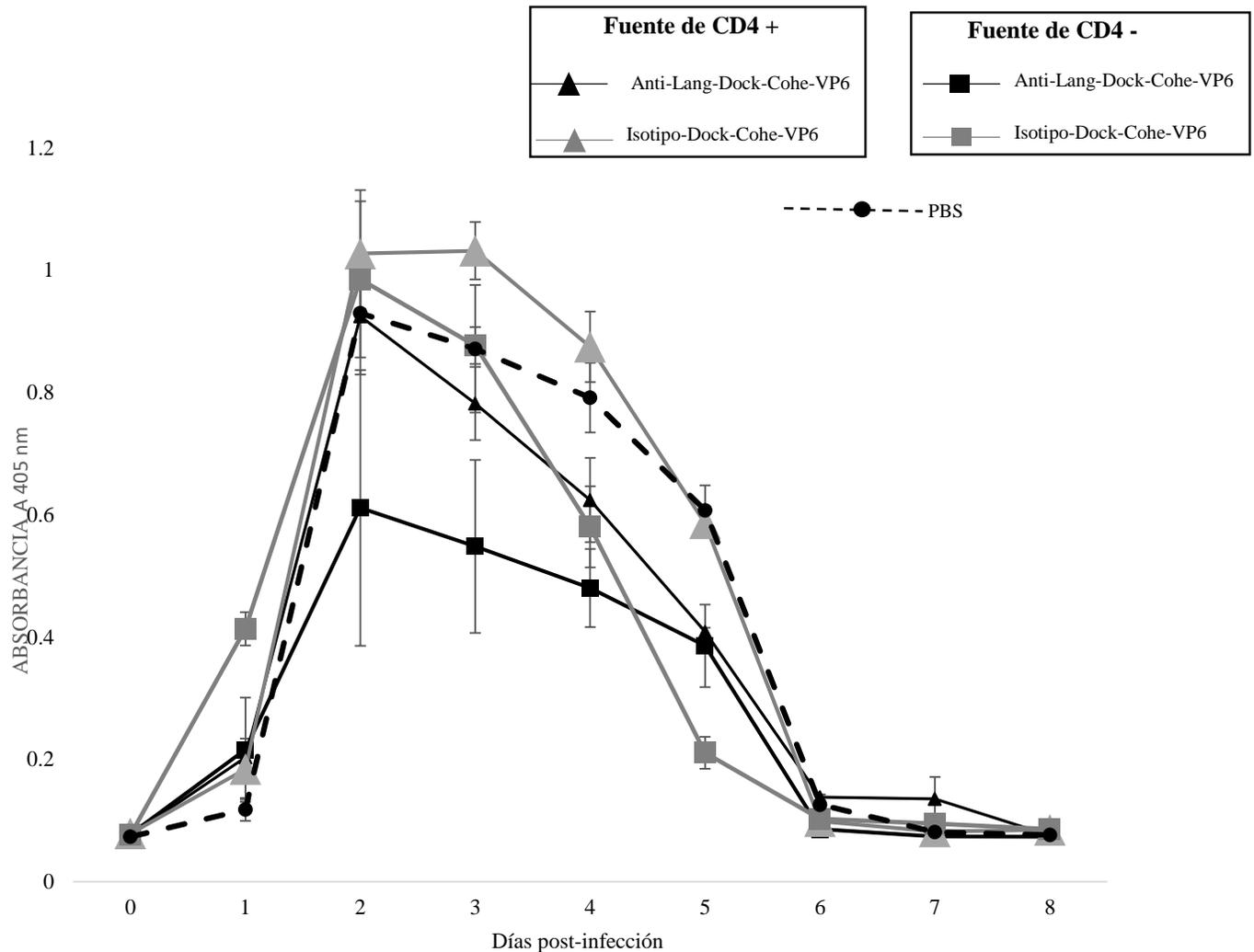


Figura 17: Carga viral en heces de ratones con transferencia de células T CD4+ y CD4- de bazo provenientes de ratones vacunados con diferentes conjugados de VP6. Se aislaron células CD4+ y CD4- de bazo de ratones vacunados con Anti-Lang-Cohe-VP6 y de Isotipo-Dock-Cohe-VP6 y se transfirieron 3.5×10^5 células por la vía i.p a ratones normales. Enseguida estos ratones con transferencia fueron retados con EDIM y se cosecharon las heces para evaluar por ELISA la excreción de antígeno viral. Los errores estándar \pm son la media de grupos de 2 ratones.

6.5 Transferencia adoptiva de líneas de células T específicas para VP6

Aunque por medio de la transferencia adoptiva de células T de la sección anterior se sugiere que tanto células T CD4⁺ como CD8⁺ pueden estar jugando un papel importante en la protección inducida por el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6, los resultados experimentales no fueron muy claros. Esto se pudo haber debido a la baja frecuencia de las células T de memoria contra VP6. Una manera de aumentar la población de las células T específicas es generando líneas celulares por ciclos de amplificación con antígeno y expansión con IL-2 *in vitro*. De esta manera, se inmunizaron ratones dos veces con el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6, como se describe anteriormente, y 15 días después de la última inoculación se obtuvieron las células de bazo y se re-estimularon *in vitro* con VP6 purificado por 3 días, seguido por una expansión celular en presencia de IL-2 por 4 días. El ciclo estimulación-expansión se realizó hasta 5 veces. Dado que las células se estimularon con antígeno exógeno no infeccioso, se indujo el enriquecimiento de células T CD4⁺.

Grupos de dos ratones se inocularon i.p. entre 2 y 3x10⁶ células T CD4⁺ específicas para VP6 después de 1, 4 o 5 ciclos de estimulación. Por cada experimento se incluyeron dos ratones controles inoculados solamente con PBS. Dos horas después, los ratones se retaron con el RV murino EDIM_{wt}. Se colectaron las heces por 8 días y se determinó la carga viral por un ensayo de ELISA de captura. Como se puede ver en la **Figura 18**, los ratones inoculados con células provenientes de 4 y 5 ciclos presentaron curvas de replicación viral similares al control, solamente los ratones inoculados con células provenientes de 1 ciclo presentaron un incremento en la curva de replicación en comparación con el control. Estos resultados indican, que al menos en nuestras condiciones, las líneas celulares T CD4⁺ para VP6 no transfirieron la protección contra la infección a ratones no inmunizados.

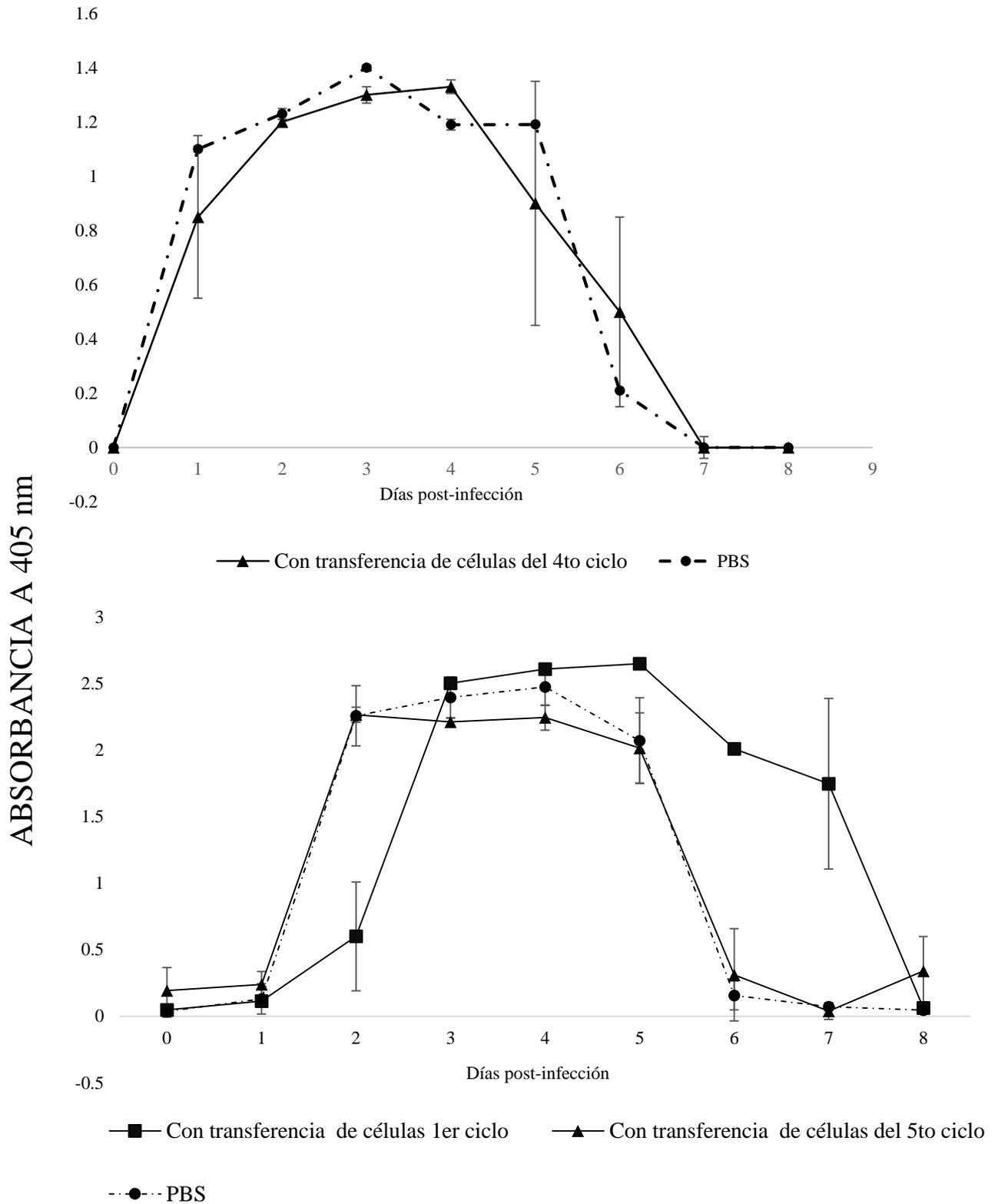


Figura 18: Efecto de la transferencia adoptiva de células de bazo Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 estimuladas “in vitro” por varios ciclos. ELISA de carga viral en heces de ratones que recibieron la transferencia de 2.5×10^6 a 3×10^6 células de bazo provenientes de ratones vacunados con Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 estimuladas previamente *in vitro* por uno, cuatro y cinco ciclos. Las desviaciones estándar \pm son la media de grupos de 2 ratones.

7 DISCUSIÓN

En los últimos años el direccionamiento de antígeno a CD's para la inducción de respuestas inmunes más eficientes ha tenido un gran auge. La molécula DEC-205, presente principalmente en la membrana plasmática de las CD's, se ha usado como blanco para dirigir antígenos entrecruzados o fusionados por medio de Acm's y de esta manera inducir respuestas potentes de células T *in vivo* ^{65,68 y 75}. Esta propiedad se debe principalmente a que la molécula blanco en las CD's es capaz de enviar el antígeno capturado a endosomas para su procesamiento y posterior asociación a moléculas del MHC clase I y II ^{76 y 77}. En un trabajo previo del laboratorio ⁴⁴, se encontró que ratones inoculados s.c. con dos dosis de 1.5 µg de VP6 entrecruzado bioquímicamente a un anticuerpo de rata anti-DEC-205 de ratón, en presencia de Poly I:C como adyuvante, indujo hasta un 45 % de protección contra la infección por rotavirus. Esta protección fue independiente de anticuerpos intestinales anti-rotavirus y correlacionó con una respuesta Th1 a nivel sistémico e intestinal. Posteriormente, se demostró que la protección inducida era dependiente tanto de células T CD4⁺ como CD8⁺ ⁷⁰.

Con la finalidad de profundizar en los mecanismos de protección contra la infección por RV generados por el direccionamiento de VP6 a CD's, en este trabajo se implementó, en colaboración con el Dr. Zurawsky (Baylor Institute of Immunology, Dallas, Texas) una plataforma de vacunación basada en el direccionamiento de VP6 a CD's a través de un Acm contra Langerina presente en la superficie de las CD's y con propiedades de internalización de antígeno similares a DEC-205. Esta plataforma se basa en la interacción con alta afinidad de las moléculas Cohesina- Dockerina que de manera natural conforman el celulosoma bacteriano ⁷⁴. De esta manera, y con una simple incubación en PBS, se generaron los conjugados Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6. Este sistema es mucho más eficiente que la conjugación de antígeno al Acm por medios bioquímicos, como el que se usó en la conjugación de DEC-206 y VP6 previamente, que tiene poca eficiencia, ya que en promedio solamente un 20-40 % del Acm se enlaza a una molécula de VP6. Esta baja eficiencia de conjugación limitaba de manera importante la disponibilidad de material suficiente para realizar el número de experimentos requeridos para determinar el papel de las células T en la protección inducida.

Se encontró que el conjugado Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6, con VP6 equivalente a 1.5-5 µg de VP6, inoculado s.c. en presencia de Poly I:C como adyuvante indujo Ac's séricos contra la proteína muy superiores a los inducidos con el control de Isotipo-Dock-Cohe-VP6. Esta respuesta fue analizada simplemente para determinar la inmunogenicidad del conjugado Anti- Lang-Dock-Cohe-VP6, ya que es sabido que los Ac's séricos no están involucrados en la protección contra RV. Para determinar la capacidad del conjugado para inducir protección, éste fue inoculado dos veces s.c. con VP6 equivalente a 1.5 µg en presencia de adyuvante, encontrándose que este protocolo de vacunación pudo inducir hasta un 60% de protección contra la infección intestinal por RV. Ratones vacunados con VP6 purificado no presentaron protección contra la infección, por lo que el direccionamiento hacia las CD's a través de Langerina fue determinante para esta protección. De esta manera, el direccionamiento de VP6 a Langerina presente en las CD's mostró ser más eficiente en la inducción de protección que el reportado con DEC-205, ya que cantidades de VP6 equivalentes generaron mayor protección cuando se dirigieron a Langerina que a DEC-205 (60 % vs 45 %). Asimismo, al igual que la protección inducida por VP6 direccionado a DEC-205, la protección por el direccionamiento a Langerina sugería una dependencia de células T.

Se exploró una segunda estrategia para inducir protección contra la infección, también en colaboración con el grupo del Dr. Zurawsky, que consistió en generar el Ac Anti-Langerina fusionado al péptido de 14 aa correspondiente a la secuencia 289-302 de VP6 del RV murino Ew. Esta secuencia fue reportada por nuestro grupo como un epítipo de células T CD4⁺ reconocido en el contexto de la molécula del MHC II IE^d⁴⁷. Estudios posteriores demostraron que ratones inoculados i.n. con el péptido sintético en presencia de un potente adyuvante como toxina de cólera presentaban un 97 % de protección contra la infección por RV y que esta protección dependía totalmente de las células T CD4⁺^{43 y 48}. Desafortunadamente, 2 o 3 inoculaciones s.c. de Anti-Lang-VP6₂₈₉₋₃₀₂ equivalentes a 500 ng del péptido no indujeron protección alguna contra la infección. Una posibilidad para explicar este resultado negativo, es que la cantidad de péptido inoculado sea muy baja, ya que en los trabajos previos mencionados se inocularon hasta 50 µg de péptido i.n. Por otro lado, es posible que el procesamiento del Acm fusionado al péptido en el endosoma de las CD's, genere fragmentos que no correspondan a los 14 aa que constituyen el epítipo de las células T CD4⁺. Más experimentos son necesarios para establecer cuál de estas posibilidades es la correcta.

Para determinar el papel de las células T en la protección inducida por el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 se emplearon dos tipos de estrategias: (1) eliminación *in vivo* de células T CD4⁺ y CD8⁺ con Acm y (2) transferencia de células T específicas provenientes de ratones inmunizados en ratones no inmunizados y retados con RV. Para la primera estrategia, se realizaron dos experimentos; en la primera se demostró que la eliminación de células T CD4⁺ en ratones vacunados con el conjugado abrogaban por completo la protección inducida. En la segunda estrategia, aunque no se determinó el porcentaje de la protección inducida por el conjugado, si se encontró que tanto la eliminación de células T CD4⁺ como CD8⁺ aumentó los títulos virales en comparación con el control vacunado. Estos resultados sugieren que la protección inducida por el conjugado Anti-Lang-Dock-Cohe-VP6 depende totalmente de células T, al igual que la protección inducida en trabajos previos por VP6 direccionado a DEC-205⁷⁰.

La transferencia de células T CD4⁺ de memoria o líneas celulares de esta población específicas para VP6 a ratones no inmunizados y retados con RV no indujeron protección. Interesantemente, solamente la transferencia de células de bazo teóricamente deficientes de T CD4⁺ indujeron una reducción de los títulos virales en ratones retados con RV. Una posibilidad es que, como se vio en los experimentos de eliminación de células T *in vivo* con Acm, las células de bazo tuvieran un número residual de T CD4⁺ de memoria que en conjunto con las células CD8⁺ estuvieran induciendo la protección, sin embargo, más experimentos son necesarios para corroborar esta idea.

Un problema al que nos enfrentamos con la transferencia celular, es que esta fue realizada por la vía i.p y no se demostró que las células estuvieran llegando a los órganos linfoides de la mucosa intestinal donde tendrían que ejercer su función protectora. Sin embargo, se utilizó esta vía por reportes previos de transferencia de células T CD4⁺ de memoria específicas para VP6 que indujeron protección contra la infección²⁷. En experimentos futuros sería importante transferir las células por la vía intravenosa⁷⁸, ya que esta vía facilitaría la distribución sistémica de las células. Las células se podrían marcar con CFSE para poder seguir su migración a los órganos linfoides intestinales y correlacionar esta migración con la protección obtenida.

Por lo anterior, basado principalmente en la eliminación de las células T *in vivo* con Acm, se puede afirmar que la protección inducida por VP6 direccionado a Langerina está determinada por la acción conjunta de las células T CD4⁺ y CD8⁺. Una posibilidad es que las células CD4⁺ coadyuven en la proliferación y diferenciación de las células CD8⁺ para que estas actúen como células efectoras que eliminan la infección, como se ha demostrado previamente en otros modelos ⁷⁹. Por otro lado, las células T CD4⁺ también podrían estar participando en parte como células efectoras a través de la producción de citocinas antivirales como IFN- γ , TNF- α y IL-17 ⁸⁰, o inclusive como efectoras directas actuando en las células epiteliales infectadas que pudieran estar expresando MHC clase II ^{81 y 82}.

Un aspecto interesante de este modelo, es que cantidades muy bajas de VP6 a Langerina por una vía parenteral como la s.c inducen altos niveles de protección contra la infección a nivel intestinal, ya que es bien sabido que aún en presencia de adyuvante, el antígeno solo no genera una respuesta inmune a nivel intestinal ⁹⁶. Esto se vio claramente en nuestros experimentos donde 3 μ g de VP6 en presencia de Poli I:C no indujo protección intestinal contra la infección. Esta compartimentalización de la respuesta inmune se debe principalmente a que las CD's de la mucosa intestinal secretan ácido retinoico, que a su vez induce la expresión de las moléculas de direccionalidad a intestino α 4 β 7 y CCR9 en las células T y B ⁹⁷. Las CD's periféricas no inducen ácido retinoico, por lo tanto las células T y B activadas parenteralmente no migran a los órganos linfoides intestinales para poder combatir la infección por RV. Sin embargo, el direccionamiento de VP6 a Langerina al igual que a DEC-205 rompe esta restricción, muy probablemente debido a que los conjugados alcanzan los órganos linfoides de la mucosa intestinal, como PP y ganglio linfático mesentérico (GLM), donde estimulan a las células T. Esto ha sido demostrado por previamente con OVA, como antígeno modelo, direccionada a DEC-205 ⁶⁸. En apoyo a esta idea, se ha demostrado que Langerina no está expresada exclusivamente en las CL de la piel, sino que se distribuye ampliamente, incluyendo a las CD's de los órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal ⁹⁸.

Finalmente, estos resultados no solamente podrían ser importantes para el desarrollo de una vacuna contra RV basada solamente en VP6, sino para el posible tratamiento de procesos tumorales y enfermedades crónicas inflamatorias del intestino.

8 CONCLUSION

La protección contra la infección por rotavirus en ratones vacunados parenteralmente con VP6 direccionado a CD's por medio de un Acm contra Langerina, depende de la acción dual de las células Th y Tc específicas para VP6.

9 PERSPECTIVAS

- 1.-Evaluar directamente el papel protector efector de las células T CD4+ y/o T CD8+ de ganglio linfático mesentérico provenientes de ratones vacunados mediante su transferencia a ratones sin vacunar por la vía intravenosa
- 2.- Evaluar principalmente en ganglio linfático mesentérico y en otros órganos linfáticos la proliferación de las células T CD4+ y CD8+ específicas a VP6 generadas por la vacunación de direccionamiento a células dendríticas y su correlación con la protección contra la infección de EDIM, mediante un modelo mejorado de marcaje con CFSE.
- 3.- Determinar los epítopes de VP6 responsables de la protección cuando se direcciona a Langerina, mediante fusiones de diferentes péptidos de VP6 al Acm anti-Langerina.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. **Ramig, R.F (2004).** Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *Journal of virology*. 78(19): 10213–10220.
2. **Dennehy, P. (2008).** Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clinical Microbiology Reviews* 21(1) p.198-208.
3. **Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network, Agocs, M., & Ranjan Wijesinghe, P. (2016).** Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62(suppl_2), S96-S105.
4. **Richardson, V., Hernandez-Pichardo, J., Quintanar-Solares, M., Esparza-Aguilar, M., Johnson, B., Gomez-Altamirano, C. M., ... & Patel, M. (2010).** Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 299-305.
5. **Angel, J., Franco, M.A., Greenberg, H.B (2007).** Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature reviews microbiology*. 5:529-540.
6. **Jiang, V., Jiang, B., Tate, J., Parashar, U., Patel. (2010)** Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Human Vaccine*;6(7):532–42.
- 7: **Fields BN (1996)** The Reoviridae. In: Fields BN, Knipe RM, Chanock MS *et al* (eds) *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 1553–1555.
- 8: **Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., Prasad, Venkataram (2006).** Rotavirus Proteins: Structure and Assembly *Current Topics in Microbiology and Immunology* 309:189–219.
- 9: **Estes MK, Kapikian AZ. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (2007).** Rotaviruses, Fields virology fifth edition Philadelphia Lippincott, Williams & Wilkins pp 1917-1974
- 10: **Arias, CF., Silva-Ayala, D., López, S. (2015).** Rotavirus Entry: a Deep Journey into the Cell with Several Exits. *Journal of Virology* 89: 890-893
- 11: **Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, Santegoets K, Kiefel MJ, Blanchard H, Coulson BS, von Itzstein M (2009).** Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature chemical biology*. ;5:91–93
- 12: **Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, Estes MK, Prasad BV (2012).** Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A type histo blood group antigen. *Nature*. 485:256–259
- 13: **Lopez, S., & Arias, C. F. (2006).** Early steps in rotavirus cell entry. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (pp. 39-66). Springer Berlin Heidelberg.

- 14: Hu, L., Crawford, S.E., Hyse, J.M., Estes, M.K., Prasad, B.V. (2012)** Rotavirus non-structural proteins: Structure and Function. *Current opinion in Virology* 2(4): 380–388.
- 15: Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C. F., Courousse, N., Chwetzoff, S., ... & Desselberger, U. (2010).** Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *Journal of virology*, 84(13), 6782-6798.
- 16: Estes, M. K. (2003).** The rotavirus NSP4 enterotoxin: current status and challenges, p. 207224. In U. Desselberger and J. Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.
- 17: Gershon, M. D. (1999).** The enteric nervous system: a second brain. *Hospital Practice*, 34(7), 31-52.
- 18: Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (1999).** Immunity to rotavirus infection in mice. *The Journal of infectious diseases*, 179(Supplement_3), S466-S469.
- 19: Blutt, S. E., Miller, A. D., Salmon, S. L., Metzger, D. W., & Conner, M. E. (20).** IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal immunology*, 5(6), 712.
- 20: Feng, N., Lawton, J. A., Gilbert, J., Kuklin, N., Vo, P., Prasad, B. V., & Greenberg, H. B. (2002).** Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1203-1213.
- 21: Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J (2002).** Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *Journal of Virology*. 76(16):8110-7.
- 22: VanCott, J. L., Prada, A. E., McNeal, M. M., Stone, S. C., Basu, M., Huffer, B., ... & Choi, A. H. C. (2006).** Mice develop effective but delayed protective immune responses when immunized as neonates either intranasally with nonliving VP6/LT (R192G) or orally with live rhesus rotavirus vaccine candidates. *Journal of virology*, 80(10), 4949-4961.
- 23: Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoij M, Saif L, Surrey T, Parreño V. (2008).** Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *Journal of Virology*. 82(19):9753-64.
- 24: Franco MA, Greenberg HB. (1997).** Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology*. 238(2):169-79.
- 25: Esquivel, F.R. Lopez, S. Guitierrez, X. Arias, C. (2000).** The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response *Archives of Virology*, 145, 813-825.

- 26: Choi, AH., McNeal, MM., Basu, M.(2002).** Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. *Vaccine* 20:3310–3321.
- 27: McNeal, M. M., J. L. VanCott, A. H. C. Choi, M. Basu, J. A. Flint, S. C. Stone. J. D. C/ements, and R. L. Ward. (2002).** CD4 T Cells Are the Only Lymphocytes Needed To Protect Mice against Rotavirus Shedding after Intranasal Immunization with a Chimeric VP6 Protein and the Adjuvant LT(R192G). *Journal of Virology*. 76: 560-568.
- 28: Franco MA, Greenberg HB. (1995).** Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *Journal of Virology*. 69(12):7800-6.
- 29: Vancott JL, McNeal MM, Choi AH, Ward RL. (2003)** The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J Interferon Cytokine Res*. 23(3):163-70
- 30: López-Guerrero DV, Meza-Perez S, Ramirez-Pliego O, Santana-Calderon MA, Espino Solis P, Gutierrez-Xicotencatl L, Flores-Romo L, Esquivel-Guadarrama FR. (2010)** Rotavirus infection activates dendritic cells from Peyer's patches in adult mice. *Journal of Virology*.;84(4):1856-66
- 31: Pott J, Mahlaköiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, Staeheli P, Hornef MW (2011)** IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10;108(19):7944-9
- 32: Hernández PP, Mahlaköiv T, Yang I Schwierzeck V, Nguyen N, Guendel F, Gronke K, Ryffel B, Hölscher C, Dumoutier L, Renauld JC, Suerbaum S, Staeheli P, Diefenbach A. (2015).** Interferon- λ and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat Immunol* 16(7):698-707.
- 33: Zhu, Shu; Ding, Siyuan; Wang,Penghua; Wei,Zheng; Pan,Wen; Palm,Noah W; Yang,Yi; Yu,Hua; Li,Hua-Bing; Wang, Geng; Lei, Xuqiu; Zoete, Marcel R; Zhao,Jun; Zheng, Yunjiang; Chen,Haiwei; Zhao,Yujiao; Jurado, Kellie; Feng,Ningguo; Shan,Liang; Kluger, Yuval; Lu, Jun; Abraham,Clara; Fikrig,Erol; Greenberg, Harry B. & Flavell, Richard A. (2017)** Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells. *Nature* 546:667-670
- 34: Zhang, B. (2014).** Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* 346, 861–865
- 35: Ruiz-Palacios, G. M. (2006).** Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirusgastroenteritis. *N. Engl. J. Med*. 354, 11–22
- 36: Vesikari, T., Clark, H. F., Offit, P. A., Dallas, M. J., DiStefano, D. J., Goveia, M. G., ... & DiNubile, M. J. (2006).** Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine*, 24(22), 4821-4829.

- 37: Bernstein, D. I., Smith, V. E., Sherwood, J. R., Schiff, G. M., Sander, D. S., DeFeudis, D. & Ward, R. L. (1998).** Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine*, 16(4), 381-387.
- 38: Block, S.L., T. Vesikari, M.G. Goveia, S.B. Rivers, B.A. Adeyi, M.J. Dallas, J. Bauder, J. W. Boslego, and P. M. Heaton. (2007).** Efficacy, immunogenicity, and safety of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine at the end of shelf life. *Pediatrics* 119:11–18.
- 39: Perez-Schael, I., Guntiñas, M. J., Pérez, M., Pagone, V., Rojas, A. M., González, R., ... & Kapikian, A. Z. (1997).** Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *New England Journal of Medicine*, 337(17), 1181-1187.
- 40: Simonsen, L., Viboud, C., Elixhauser, A., Taylor, R. J. & Kapikian, A. Z (2005).** More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. *J. Infect. Dis.* 192, S36–S43.
- 41: Prasad BV, Chiu W. (1994).** Structure of rotavirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 185:9-29
- 42: Franco Manuel A, Angel J, Greenberg Harry B (2006).** Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*;24:2718–31.
- 43: Choi, A. H. C., M. Basu, Mcneal, M. M. ,J. Flint, J. I. Vancott, J. D. Clements, and R.I. Ward (2000).** Functional Mapping of Protective Domains and Epitopes in the Rotavirus VP6 Protein. *J. Clin.Microbiol.* 74:11574-11580
- 44: Badillo, O., Gutierrez, L. X., Plett, T., Pedroza, S.A., Gonzalez, A., Chihu, L., Maldonado, G., Espino, G., Bonifaz, L.C., Esquivel, G. (2015).** Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine* 33 4228–4237.
- 45: Choi, A. H., M. Basu, M. M. McNeal, J. D. Clements, and R. L. Ward. (1999).** Antibody independent protection against rotavirus infection of mice stimulated by intranasal immunization with chimeric VP4 or VP6 protein. *J.Virol.* 73:7574–7581.
- 46: Ward Richard L, McNeal Monica M. (2010).** VP6: a candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis*; 202(S1):S101.
- 47: Baños DM, Lopez S, Arias CF, Esquivel FR. (1997).** Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J Virol.* 71(1):419-26
- 48: McNeal, M. M., Basu, M., Bean, J. A., Clements, J. D., Choi, A. H. C., & Ward, R. L. (2007).** Identification of an immunodominant CD4+ T cell epitope in the VP6 protein of rotavirus following intranasal immunization of BALB/c mice. *Virology*, 363(2), 410-418.

- 49: Lappalainen, S.,** Pastor, A. R., Malm, M., López-Guerrero, V., Esquivel-Guadarrama, F., Palomares, L. A., ... & Blazevic, V. (2015). Protection against live rotavirus challenge in mice induced by parenteral and mucosal delivery of VP6 subunit rotavirus vaccine. *Archives of virology*, 160(8), 2075-2078.
- 50: Bachmann, MF.,** Rohrer, UH., Kundig, TM., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, RM. (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262:1448-1451.
- 51: McNeal, MM.,** Rae, MN., Conner, ME., Ward, RL. (1998). Stimulation of local immunity and protection in mice by intramuscular immunization with triple- or double-layered rotavirus particles and QS-21. *Virology* 243:158-166
- 52: Siadat-Pajouh, M.,** Cai, L. (2001) Protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles combined with CT-E29H, a detoxified cholera toxin adjuvant. *Viral Immunol* 14:31-47.
- 53: Seder, R.A.,** and J.R. Mascola. (2003). *Basic Immunology of Vaccine Development* Academic Press, Boston. 51-72.
- 54: McMichael, A.J.,** and T. Hanke. (2003). HIV vaccines 1983- 2003. *Nat. Med.* 9:874-880.
- 55: Reed, S.G.,** and A. Campos-Neto. (2003). Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 15:456-460.
- 56: Finn, O.J.** (2003). Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol.* 3:630-641.
- 57: Jung, S.,** Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K, Zavala F., E. G. Pamer, D. R. Littman and R.A. Lang. (2002). "In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens." *Immunity* 17 (2):211-220.
- 58: They, C.,** and S. Amigorena. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 45-51.
- 59: Janeway, C.A., Jr.,** and R. Medzhitov. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- 60: Takeda, K.,** T. Kaisho, and S. Akira. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376
- 61: Bendelac, A.,** and R. Medzhitov. (2002). Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 195:F19-F23.

-
- 62: Fujii, S., K. Shimizu, C. Smith, L. Bonifaz, and R.M. Steinman. (2003).** Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a co administered protein. *J. Exp. Med.* 198:267–279.
- 63: Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. (1994).** Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180:1263–1272
- 64: Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, K. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. (2001).** Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.* 194:769–780
- 65: Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M.C. Nussenzweig, and R.M. Steinman. (2002).** Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8 T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196:1627–1638.
- 66: Kooyk, Y. (2008).** C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 6):1478-1481
- 67: Figdor, C.G., Van Kooyk, Y., Adema, G.J.(2002)** C-type lectin receptor on dendritic cells and Langerhans. *Nature Reviews, Immunology.* 2, 77-88.
- 68: Bonifaz, L; Bonnyay,D; Charalambous, A; Darguste,D; Fujii,S; Soares,H; Brimnes, M; Moltedo, B;Moran,T y Steinman R. (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: 815-824.
- 69: Romani, N., Thurnher, M., Idoyaga, J., Steinman, M.R., Fla.cher, V. (2010).** Targeting of antigens to skin dendritic cells: possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunol Cell Biol* 88(4): 424– 430.
- 70: Velásquez-Hernández, F.E. (2016).** Tesis de Maestría "Papel de las células T en la protección inducida contra Rotavirus en ratones vacunados con VP6 direccionado a células dendríticas" Maestría en Medicina Molecular. Coordinación de Posgrado e Investigación. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- 71: Shaw, A. I., R. Rothnagel, C. Q.-Y. Zeng, J. A. Lawton, R. F. Raming, M. K. Estes, and B. V. V. Prasad. (1996)."** Rotavirus Structure: Interactions between the structural Proteins". *Arch. Virol.* 12:21-27
- 72: Reed LJ, Muench (1938).** H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg;* 27: 493-497.

- 73: Arias, C.F., Lizano, M. (1987).** Synthesis in *Escherichia Coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J Gen Virol* 68 (Pt):633-642.
- 74: Hernández,A; García, E y Rodríguez,A. (1999).** Celulosomas: sistemas multienzimáticos *Revista de la Sociedad Química de México*, Vol. 43, Núms. 3, 4 137-142
- 75: Do Yoonkyung, P. C. G., Kang Young-Sun, Park Sung Ho, Lynch Rebecca M., Lee Haekyung, Powell Bradford S., and Steinman Ralph M. (2008).** "Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC 205/CD205 positive mouse dendritic cells." *Eur. J. Immunol.* **38**(1): 20-29
- 76: Mahnke Karsten, G. M., Lee Sena, Sepulveda Homero, Swain Suzy L., Nussenzweig Michel, and Steinman Ralph M. (2000).** "The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, DEC-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Lysosomal Compartments." *The Journal of Cell Biology* **151**(3): 673-683.
- 77: Dudziak D, K. A., Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC., (2007).** "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." *Science* **315**(5808): 107-111.
- 78: Gautreaux, M; Gelder, F; Deitch, E;Berg, R.(1995)** Adoptive Transfer of T Lymphocytes to T-Cell-Depleted Mice Inhibits *Escherichia coli* Translocation from the Gastrointestinal Tract. *Infection and immunity*. Vol. 63p. 3827–3834
- 79: Castellino, F; and Germain R. (2006)** Cooperation between CD4+ and CD8+ T Cells: when, where, and how. *Annu. Rev. Immunol.* 24:519–40
- 80: Bass, D. M. 1997.** Interferon gamma and interleukin 1, but not interferon alfa,inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines.*Gastroenterology* 113:81–89.
- 81: Milligan, G. N., D. I. Bernstein, and N. Bourne. 1998.** T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2. *J. Immunol.* 160:6093–6100
- 82: Blumberg, R. S., W. I. Lencer, X. Zhu, H.-S. Kim, S. Claypool, S. P. Balk, L.J.Saubermann,and S.P.Colgan.1999.** Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol. Lett.* 69:7–11
- 83: Offit, P. A., and H. F. Clark. (2006).** RotaTeg: a pentavalent bovine-human reassortment rotavirus vaccine. *Pediatr. Ann.* 35:29–34.
- 84: Cohen, J., A. Charpilienne, S. Chilmonczyk, and M. K. Estes (1989).** Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus *Virology.* 171:131-140

-
- 85: Labbe, M., P. Baudoux, A. Charpilienne, D. Poncet, and J. Cohen (1994).** Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein *J Gen Virol.* 75:3423-3430
- 86: Estes, M. K., S. E. Crawford, M. E. Penaranda, B. L. Petrie, J. W. Burns, W. K. Chan, B. Ericson, G. E. Smith, and M. D. Summers (1987).** Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system *J Virol.* 61:1488-1494.
- 87. Estes, M. K. (1996).** Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
- 88: Koch, J., Harder, T., von Kries, R., & Wichmann, O. (2017).** Risk of Intussusception After Rotavirus Vaccination: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114(15), 255.
- 89: Romero-Palomo, F., Sánchez-Cordón, P. J., Risalde, M. A., Pedrera, M., Molina, V., Ruiz-Villamor, E., & Gómez-Villamandos, J. C. (2011).** Funciones y clasificación de las células dendríticas.
- 90: Knight, S. C., & Stagg, A. J. (1993).** Antigen-presenting cell types. *Current opinion in immunology*, 5(3), 374-382.
- 91: Vlist, M., & Geijtenbeek, T. B. (2010).** Langerin functions as an antiviral receptor on Langerhans cells. *Immunology & Cell Biology*, 88(4), 410-415.
- 92: Ruane, D., Do, Y., Brane, L., Garg, A., Bozzacco, L., Kraus, T., ... & Mehandru, S. (2016).** A dendritic cell targeted vaccine induces long-term HIV-specific immunity within the gastrointestinal tract. *Mucosal immunology*, 9(5), 1340.
- 93: Volckmar, J., Gereke, M., Ebensen, T., Riese, P., Philipsen, L., Lienenklaus, S., ... & Gruber, A. D. (2017).** Targeted antigen delivery to dendritic cells elicits robust antiviral T cell-mediated immunity in the liver. *Scientific reports*, 7, 43985.
- 94: Idoyaga, J., Cheong, C., Suda, K., Suda, N., Kim, J. Y., Lee, H., ... & Steinman, R. M. (2008).** Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products in vivo. *The Journal of Immunology*, 180(6), 3647-3650.
- 95: Moyle, P. M., & Toth, I. (2013).** Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem*, 8(3), 360-376.
- 96: Butcher, E. C., & Picker, L. J. (1996).** Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272(5258), 60-67.

97: Stock, A., Booth, S., & Cerundolo, V. (2011). Prostaglandin E2 suppresses the differentiation of retinoic acid-producing dendritic cells in mice and humans. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20101967.

98: Rochereau, N., Verrier, B., Pin, J. J., Genin, C., & Paul, S. (2011). Phenotypic localization of distinct DC subsets in mouse Peyer Patch. *Vaccine*, 29(20), 3655-3661.