



**UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA  
DE BIOTECNOLOGÍA**

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

**INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR  
EN LA MODALIDAD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Caracterización de la respuesta inmune  
celular inducida contra el epítipo NS3<sub>298-306</sub>  
del virus Dengue expresado en una  
*Salmonella* que posee un péptido fusogénico.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTA:  
LARA MARTÍNEZ LUIS ANDRÉS**

Director interno: **DR. EN C. GERMÁN GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ**

Director externo: **DR. EN C. ROSENDO LURÍA PÉREZ**

México, D.F. Mayo de 2008

<b>INDICE.</b>	<b>Pág.</b>
I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. ANTECEDENTES.....	5
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVO GENERAL.....	16
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
Cepas bacterianas.....	18
Plásmidos.....	18
Cultivo y condiciones de inducción.....	18
Ensayos de Inmunofluorescencia y citometría de flujo.....	19
Animales y Esquemas de inmunización.....	19
Ensayos de proliferación empleando CDCFDA-SE.....	20
Tinción de marcadores celulares y citocinas .....	21
Análisis estadístico .....	22
VIII. RESULTADOS .....	23
Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes en las diferentes cepas vacunales .....	23
Cinética de proliferación de linfocitos T empleando CDCFDA-SE.....	25
Cinética de inducción de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ .....	27
Proliferación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> antígenos específicos inducida contra el epitopo NS3 <sub>298-306</sub> del virus Dengue.....	27
Producción de IFN $\gamma$ por linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> antígenos específicos inducidos contra el epitopo NS3 <sub>298-306</sub> del virus Dengue.....	42
IX. DISCUSIÓN .....	48

X. CONCLUSIONES.....	51
XII. PERSPECTIVAS.....	52
XI. REFERENCIAS.....	53
INDICE DE TABLAS	
Tabla 1. Cepas bacterianas.....	18
Tabla 2. Plásmidos.....	18

## I. INTRODUCCIÓN.

*Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ha sido empleada como acarreador de antígenos heterólogos en diversos protocolos con fines vacunales por su gran capacidad de inducir respuesta inmune de mucosas y sistémica; considerando que *Salmonella enterica* es de residencia fagolisosomal, es interesante el diseño de mecanismos que permitan a sus antígenos ser llevados hacia el citosol para inducir una mejor respuesta de Linfocitos T Citotóxicos (CTLs) [1, 29-41].

En este contexto, en nuestro laboratorio se ha evaluado un sistema que induce respuesta de CTLs, que consiste en una bacteria atenuada, *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium SL3261; que expresa en su superficie mediante el uso del autotransportador MisL, una proteína de fusión que contiene un péptido fusogénico sintético, el epitopo 298-306 de la proteína NS3 del virus Dengue, y una secuencia de corte que es reconocida por la proteasa OmpT. Después de la inmunización de ratones BALB/c con las *Salmonellas* recombinantes, se observó la inducción de una respuesta inmune antígeno específica contra el epitopo de Dengue [79]. Los ensayos de citotoxicidad *in vivo* e *in vitro* mostraron que la presencia del péptido fusogénico en el sistema, indujo una respuesta citotóxica contra el epitopo de Dengue. Sin embargo, aún resulta necesario caracterizar adecuadamente qué tipo de poblaciones celulares responden al estímulo con el antígeno específico y si éstas son productoras de citocinas, como el Interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) [82].

Este trabajo propone contestar esta interrogante, cuyo abordaje se hará de la siguiente manera: posterior a la inmunización de los ratones BALB/c con las *Salmonellas* recombinantes, se realizarán ensayos de proliferación antígeno específicos empleando el éster de succinimidil 5,6 carboxi, 2',7' diacetato diclorofluoresceína (CDCFDA-SE) [80] y anticuerpos que nos permitan identificar por citometría de flujo las diferentes poblaciones celulares de linfocitos T (CD4 y CD8) que están proliferando al estímulo con el antígeno específico y mediante la misma metodología se determinará a las poblaciones celulares que una vez activadas por el antígeno de Dengue produzcan IFN  $\gamma$ . Los resultados obtenidos, sugieren que los ratones inmunizados con la cepa recombinante que expresa el péptido fusogénico acoplado al epitopo del virus Dengue y que son liberados por el sitio de corte, muestran mayor población celular ya sea de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  en respuesta al estímulo con el epitopo del virus Dengue.

## **II. ANTECEDENTES.**

La vacunación constituye la principal herramienta para la profilaxis de diversas enfermedades, el desarrollo racional de ellas es uno de los principales retos de la biomedicina molecular. El conocimiento del antígeno en particular y su subsecuente expresión y liberación en un medio apropiado para inducir una respuesta inmune eficiente, así como el conocimiento de los avances sobre la funcionalidad del sistema inmunológico y las células involucradas en la generación de un tipo de respuesta, han permitido diseñar estrategias de vacunación. Sin embargo existen enfermedades para las cuales no se disponen de vacunas o no son completamente satisfactorias con respecto a la seguridad, eficacia y costos; por lo que es esencial desarrollar mejores vacunas, seguras y baratas capaces de inducir una respuesta protectora por largo tiempo [1].

### **Importancia de los vectores atenuados vivos.**

Dentro del campo de las vacunas atenuadas vivas, se usan bacterias atenuadas que son incapaces de inducir una enfermedad clínica, pero que inducen una infección natural autolimitada, por lo que conducen a la estimulación de inmunidad protectora por su habilidad de replicarse dentro del huésped y representan una alternativa para el desarrollo de vacunas que expresen antígenos heterólogos. De ésta forma, establece una respuesta inmune celular que es de vital importancia para la eliminación de patógenos intracelulares (sólo expresados *in vivo*). Otra ventaja además de la inducción de una respuesta inmune sistémica es su costo, facilidad de producción y la administración de las mismas por vía oral [2]. Recientemente se han desarrollado estrategias para expresar antígenos heterólogos en bacterias atenuadas, especialmente en mutantes atenuadas de *Salmonella enterica*.

### ***Salmonella enterica*.**

*Salmonella enterica* es un patógeno facultativo intracelular [3], que posterior a su administración oral, penetra hacia las placas de Peyer a través de las células M e ingresa a las células presentadoras de antígeno, entre ellas las células dendríticas, macrófagos y

linfocitos B. Estas células infectadas se diseminan hacia los ganglios mesentéricos, bazo e hígado. De esta manera, las cepas de *Salmonella* atenuadas constituyen un vehículo excelente para llevar antígenos hacia las células presentadoras de antígenos profesionales, y así inducir una respuesta inmune sistémica incluyendo la de mucosas [4].

### ***Salmonella enterica* y la inducción de respuesta inmune.**

Es importante señalar que *Salmonella* spp modifica la vacuola fagocítica de su célula hospedera, en donde se encuentra para evitar ser degradada y tiene la capacidad de inducir apoptosis a través de la caspasa 1 de las células infectadas. Cuando la célula hospedera no es llevada a apoptosis, las células dendríticas (DC) fagocitan y presentan antígenos derivados de *Salmonella* en el contexto de moléculas de MHC clase I y clase II a los linfocitos CD4 y CD8 respectivamente. Es decir, cuando *Salmonella* ingresa a las células presentadoras de antígenos profesionales (pAPC), se comporta como un antígeno exógeno que ingresa a la vía de procesamiento y de presentación de antígenos por Clase II (vía exógena), en donde son degradadas en los compartimentos endosomales por las enzimas proteolíticas que se activan a pH ácido. Posteriormente, los péptidos resultantes son acoplados con la ayuda de moléculas accesorias como HLA-DM a las moléculas de MHC clase II que provienen del retículo endoplásmico. Finalmente el complejo formado por la cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  y péptido son transportados hacia la superficie celular para la presentación de péptidos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> condicionando su activación [5-7]. Al mismo tiempo, *Salmonella enterica* a través de su sistema de secreción tipo III (codificado por la isla de patogenicidad 1) tiene la capacidad para entrar a células no fagocíticas y dar un fenotipo invasivo a la bacteria, comportándose como antígeno endógeno, que ingresa a la vía de procesamiento y presentación de antígenos por MHC clase I (vía endógena), en donde son degradados por complejos multienzimáticos, como el proteasoma, para dar origen a péptidos pequeños (entre 8-10 aminoácidos) que de esta manera se asocian a la molécula MHC clase I. Los péptidos son transportados del citoplasma al retículo endoplásmico (RE) por un transportador dependiente de ATP llamado TAP (transportador asociado a presentación), una vez dentro del RE el péptido estabiliza a las moléculas de clase I, las cuales son

transportados fuera del RE, pasando por el complejo de Golgi hasta llegar a la superficie celular para ser presentados a las células T CD8<sup>+</sup> [8-10].

### ***Salmonella enterica* como vector de antígenos heterólogos.**

Diversos trabajos han demostrado que *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium cepa SL3261 [11] y *Salmonella enterica* serovariedad Typhi cepa CVD908 [12, 13] son vectores vacunales eficientes al acarrear proteínas antigénicas provenientes de otras bacterias, virus y protozoarios, empleando plásmidos de expresión procarióticos multicopia [14]. En este contexto se han empleado varias estrategias para mejorar la inmunogenicidad de las cepas recombinantes de *Salmonella*, lo que ha permitido aumentar la expresión de los antígenos heterólogos y mejorar la translocación del antígeno hacia el medio extracelular del vector bacteriano. Estas estrategias se han enfocado en diseñar vacunas recombinantes con *Salmonellas* capaces de: a) modular los niveles de expresión del antígeno, b) incrementar la estabilidad del vector, y c) expresar el antígeno en diversos sitios.

Los estudios realizados para controlar la expresión del antígeno heterólogo han demostrado que los promotores inducibles *in vivo* como *nirB*, permiten la expresión del antígeno en compartimentos celulares apropiados, reduciendo la toxicidad del acarreador bacteriano. Normalmente la inserción de plásmidos recombinantes provoca inestabilidad genética; al éste respecto, se ha tratado de solucionar este problema integrando el gen heterólogo dentro del cromosoma ó empleando sistemas estabilizadores de plásmidos, y, recientemente, se usa la tecnología de titulación del represor-operador.

Finalmente, la localización del antígeno también ha sido analizado en función de la capacidad de incrementar la inmunogenicidad de los antígenos expresados en *Salmonella enterica* [15], al respecto, se han empleado los sistemas de secreción de las bacterias gram negativas, ejemplo de ello son las proteínas autotransportadoras.

## **Autotransportadores.**

En las bacterias Gram negativas se conocen, hasta el momento, cinco sistemas de secreción [16]. El sistema de secreción tipo V, denominado también como Autotransportadores consta de: a) un péptido líder en el amino terminal (que lo dirige a la membrana interna), b) una proteína madura que se secreta (dominio pasajero, dominio  $\alpha$ ) y c) un dominio carboxilo terminal (dominio  $\beta$ ). Este último forma un poro en la membrana externa a través del cual pasa el dominio  $\alpha$  a la superficie celular bacteriana [17], ó lo hace a través de un anillo de aproximadamente 2 nm de diámetro formado por un multímero de dominios carboxilos terminales del autotransportador [18].

Los dominios pasajeros de los autotransportadores (dominio  $\alpha$ ) pueden quedar anclados a la superficie de la membrana externa como una gran multiproteína o pueden ser procesados del dominio  $\beta$  y liberarse al medio externo. No obstante que el dominio  $\beta$  generalmente muestra un grado de conservación consistente con su función altamente conservada, el dominio pasajero es ampliamente divergente reflejando sus diferentes papeles fisiológicos para la bacteria. Como ejemplos de dominios pasajeros se conocen: adhesinas, elastasas, toxinas proteolíticas, proteasas, estearasas, mucinasas, mediadores en la motilidad intracelular y lipasas [19].

Diversos reportes han demostrado que los autotransportadores translocan dominios  $\alpha$  heterólogos de manera eficiente. Por ejemplo, se ha logrado la expresión de la subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera y de la  $\beta$  lactamasa a la superficie de *Escherichia coli* empleando el dominio  $\beta$  de la adhesina AIDA-I de *E. coli* [20, 21]. También se ha translocado a la toxina colérica a través de dominio  $\beta$  de la proteasa de IgA 1 de *Neisseria gonorrhoeae* [22]. Recientemente Ruiz –Pérez F y cols., caracterizaron a las proteínas MisL [23] y ShdA [24] de *Salmonella enterica* como autotransportadores, al acoplar los dominios  $\beta$  de estas proteínas con el péptido (NANP)<sub>4</sub> y la proteína CSP de *Plasmodium falciparum*, obteniendo una expresión eficiente en la superficie bacteriana, además la adición de una secuencia de corte para la proteasa Omp T que permitió liberar estos antígenos de la superficie bacteriana [25].

En cuanto a la respuesta inmunológica inducida por los antígenos heterólogos translocados a través del sistema de autotransportadores se conoce que la expresión de epitopos funcionales de células B como el péptido NANP de la CSP de *Plasmodium falciparum* y epitopos de *Trichinella spiralis* [26] en el autotransportador MisL y SdhA respectivamente han demostrado la inducción de respuesta humoral eficiente en modelos murinos. De igual modo, la incorporación de epitopos de células T como los aminoácidos 28-51, 74-90 y 209-225 de la ureasa A de *Helicobacter pylori* [27] y los aminoácidos 74-86 de la proteína Hsp60 de *Yersina enterocolitica* a través del autotransportador AIDA [28] han demostrado inducir una respuesta de células T CD4<sup>+</sup> eficiente en modelos murinos.

### **Respuesta de linfocitos T citotóxicos empleando a *Salmonella* como vector de antígenos heterólogos.**

No se conocen con exactitud los mecanismos de estimulación de las células CD8<sup>+</sup> empleando a *Salmonella enterica* como vector de antígenos heterólogos, si se considera que esta bacteria es un patógeno facultativo intracelular, que permanece y se replica en los compartimentos endosomales y teóricamente, no le es posible que alcance la vía de presentación por MHC clase I. Sin embargo, se ha demostrado que algunos antígenos expresados en sistemas procariotas [29-31] ó eucariotas [33-35] empleando como acarreador a *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, han inducido respuesta de CTLs, sin el empleo de algún mecanismo alternativo que permita al antígeno ser transferido a la vía de MHC clase I. Además, se ha demostrado que la inducción de la respuesta inmune citotóxica, empleando a *Salmonella enterica* como vector de antígenos heterólogos, es más eficiente si el antígeno es secretado por la bacteria [36]. El sistema de secreción tipo III de las bacterias Gram negativas también ha sido extensivamente empleado para la secreción de antígenos hacia el citosol de la célula hospedera. Ejemplo de ello es la proteína E de Yersina (YopE) fusionada al epitopo inmunodominante de *Listeria monocytogenes*, la cual indujo una respuesta eficiente de células T, produciendo IFN  $\gamma$  y protegiendo a los ratones contra un reto con *L. monocytogenes* [37, 38].

También una cepa de *Salmonella* que expresa la proteína de fusión entre SopE y la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia en Simios (SIV), fue capaz de activar

respuesta de mucosas mediada por CTLs virus específico en *Macacus rhesus* [39]. Finalmente, se ha fusionado la proteína SptP de *S. enterica* serovar Typhimurium a un epitopo de la nucleoproteína del virus de influenza, la cual fue liberada al citosol. Así las células RMA infectadas con la *Salmonella* que expresaban al epitopo de la nucleoproteína fusionada a la proteína SptP, indujeron la estimulación de clonas específicas de células T contra la nucleoproteína viral [40].

La inducción de linfocitos T citotóxicos (CTLs) contra *Salmonella enterica*, ó contra los antígenos heterólogos que son expresados en su superficie ó que son secretados de ella, se pueden explicar por la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través del procesamiento y presentación de antígenos por la vía endógena (mecanismo que hemos descrito previamente) o por un mecanismo descrito recientemente, denominado “Presentación cruzada”.

### **Presentación cruzada (Cross-presentation).**

Presentación cruzada (cross-presentation) es el proceso por el cual los antígenos extracelulares, que normalmente son presentados en asociación con moléculas MHC clase II, pueden ser presentados en asociación con las moléculas de MHC clase I. De esta manera, los antígenos exógenos inducen una activación cruzada (cross-priming), al estimular una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Esto difiere de la vía clásica de procesamiento y presentación de antígenos endógenos en la cual las moléculas de MHC clase I presentan antígenos sintetizados *de novo* en el interior de la células [41]. A la fecha se han descrito diversos mecanismos a través de los cuales se explica el evento de presentación cruzada: A) Una de las vías podría ser el intercambio de péptidos intracelulares a través de las uniones adherentes (*gap junctions*)[42]. B) Otra posibilidad recae en la observación de que las moléculas de MHC clase I pueden ser recicladas de la superficie celular hacia los compartimentos de la vía exógena e intercambiar péptidos endógenos por exógenos [43]. C) Por medio de los eventos de fagocitosis mediada por el retículo endoplásmico [44-47]. D) Otros trabajos han demostrado que los antígenos exógenos, una vez procesados en los compartimentos fagolisosomales, pueden ser regurgitados a la superficie celular en donde son acoplados a las moléculas de MHC clase I que se encuentran vacías [48]. E) Finalmente, la inyección directa de antígenos hacia el citosol mediado por algunos virus y bacterias

(como el caso de *Listeria monocytogenes* a través de su listeriolisina ó de *Salmonella enterica* por medio de su sistema de secreción tipo III) representan una vía alterna del paso de antígenos del endosoma hacia el citosol.

### **Desarrollo de vacunas con fundamento en la presentación cruzada.**

Los mecanismos de presentación cruzada han impactado directamente a las estrategias de vacunación que tienen como finalidad inducir una respuesta eficiente de CTLs y muchas de ellas han mostrado resultados muy prometedores. De manera general estas estrategias se pueden dividir en dos grupos: El primer grupo requiere que el antígeno sea liberado al citosol de las células presentadora de antígeno o que sea sintetizado por ella. Ejemplo de este grupo son *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*. En *Salmonella*, la fusión de epitopos específicos de células CD8<sup>+</sup> con el sistema de Secreción tipo III de *Salmonella enterica* han inducido respuesta de CTLs antígeno específica *in vivo* [49].

El segundo grupo de estrategias se fundamenta en el entendimiento de las diferentes vías que conducen a un evento de activación cruzada, además de que ha sido demostrado que ésta induce una respuesta inmunológica similar a una activación normal [50, 51]. Diversos trabajos con células tumorales apoptóticas, exosomas de células tumorales, proteínas de choque térmico, complejos inmuno estimulantes, partículas pseudovirales (VLPs) y con péptidos fusogénicos han demostrado inducir una respuesta eficiente de CTLs *in vitro* e *in vivo* [8, 10, 52, 53, 54].

### **Estrategias con péptidos fusogénicos.**

Los péptidos fusogénicos están constituidos por aminoácidos con características anfipáticas, localizados comúnmente en la porción amino terminal de la proteína implicada en la fusión de la envoltura viral a la membrana endosomal. Entre los péptidos fusogénicos caracterizados figuran los virus de la Influenza [55-58], del VIH-1 y 2 [59-63], de la hepatitis B [64, 65], de la Inmunodeficiencia de los Simios [66-69] y el Sendai [70]. El péptido fusogénico del virus de la influenza está localizado en la proteína fusogénica hemaglutinina, cuya estructura glicoproteica homotrimérica de superficie consiste de un

dominio de unión al receptor (HA1) y un dominio que interactúa con la membrana (HA2). Éste último alberga al péptido fusogénico de no más de 25 aminoácidos que a un pH bajo estabiliza una estructura de  $\alpha$  hélice que hace posible la desestabilización de la membrana fagolisosomal de la célula hospedera [71, 72, 73].

Trabajos reportados por Partidos CD y cols., muestran una respuesta de CTLs específica contra el virus del Sarampión (VS) después de la inmunización intraperitoneal con un epitopo de nucleoproteína del VS unido a la porción fusogénica del mismo virus [74]. Posteriormente, experimentos hechos por Jean-Pierre Bongartz et al., demostraron que el acoplamiento del péptido fusogénico del virus de la influenza a un oligonucleótido antisentido contra VIH inhibe la retrotranscripción del virus en linfocitos T infectados y aumenta la respuesta citotóxica contra este virus [75]. Otros estudios realizados por Reiner Laus et al., reportaron el aumento de la presentación de antígenos solubles como la ovalbumina a través de la vía dependiente de MHC clase I después de haberlos acoplados a péptidos policationicos y péptidos fusogénicos, generando CTLs específicos *in vivo* [76]. En el mismo contexto se ha reportado que la unión del péptido fusogénico del virus de influenza, con el dominio de transducción de la proteína TAT (proteína asociada con la elongación de los transcritos virales) del VIH incrementó la salida del micropinosoma hacia el citosol de la proteína TAT [77].

#### **Expresión de péptidos fusogénicos del virus Dengue en la superficie de *Salmonella enterica* para producir respuesta citotóxica.**

Recientemente Luria-Pérez y cols., demostraron que la expresión de un péptido fusogénico sintético acoplado al péptido NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue y liberado de superficie celular de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium a través del autotransportador MisL indujo una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra el epitopo del virus Dengue, sugiriendo que el péptido fusogénico fue capaz de llevar el antígeno de Dengue hacia la vía de presentación del MHC I. Sin embargo, aun son necesarios otros

estudios para concluir la evaluación de este sistema, ejemplo de ello es determinar si la los linfocitos T CD8<sup>+</sup> inducidos son productores de IFN  $\gamma$ .

### **Importancia del Interferón $\gamma$ (IFN $\gamma$ ) en la respuesta inmune celular inducida por vacunas.**

El IFN  $\gamma$  es una citosina que pertenece al tipo II de Interferones; su presencia induce mecanismos directos antivirales e interviene en la sobre regulación de las vías procesamiento y presentación de antígeno; atracción de leucocitos y dirige el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares; es secretada por CTLs, linfocitos cooperadores, Natural Killers y APCs[81].

La determinación de las poblaciones celulares secretoras de IFN  $\gamma$  representan un ensayo confiable en la determinación de la actividad citotóxica inducida contra un antígeno específico, según lo muestra Hellen Horton y cols., al evaluar la respuesta inmune inducida contra una vacuna de VIH en donde observa que los ensayos de medición de la producción del IFN  $\gamma$  por citometría de flujo, tiene una correlación directa con la actividad citolítica en los ensayos de citotoxicidad por liberación de Cromo [82].

Otro ejemplo, fue reportado recientemente por Carlota Dobaño y cols., que evaluó la respuesta inmune inducida por una vacuna de ADN, que codifica para antígenos de la fase pre-eritrocítica de *Plasmodium yoelii*; cuyos ensayos de citometría de flujo para identificar las células productoras de IFN  $\gamma$  fueron reflejo de la actividad citolítica inducida por esta vacuna [83].

Por lo tanto, resulta interesante evaluar la producción de IFN  $\gamma$  en el sistema de péptidos fusogénicos acoplados al epitopo del virus Dengue, para caracterizar mejor la función efectora de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados al estímulo antígeno específico.

### III. JUSTIFICACIÓN.

La respuesta inmune celular inducida contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus dengue, expresado en una *Salmonella* que posee un péptido fusogénico, fue mediada por los linfocitos T Citotóxicos, sin embargo, es necesario determinar que población de linfocitos T fue la efectora y si ellas son productoras de interferón  $\gamma$ .

#### **IV. HIPÓTESIS.**

La respuesta inmune celular inducida contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus dengue expresado en una *Salmonella* que posee un péptido fusogénico, es mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$ .

## **V. OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar la respuesta inmune celular inducida contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus dengue expresado en una *Salmonella* que posee un péptido fusogénico.

## VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Transformar la cepa vacunal (*Salmonella*) con los diferentes plásmidos que codifican para las diferentes proteínas recombinantes.
2. Analizar la expresión y la translocación a la superficie de las diferentes proteínas recombinantes en *Salmonella* por medio de inmunofluorescencia y citometría de flujo.
3. Inmunizar de grupos de ratones BALB/c con las diferentes cepas recombinantes.
4. Evaluar la respuesta inmune celular inducida contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue mediante ensayos de proliferación con CDCFDA-SE.
5. Analizar las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

### Cultivo y condiciones de inducción.

Las cepas de *Salmonella enterica* (Tabla 1), fueron transformadas por electroporación con los plásmidos pL-TN, pL-STN, pL-TP, pL-TPN, pL-STNP (Tabla 2) y fueron cultivadas en agar de Infusión Cerebro Corazón (BHI, difco) a 37 °C con 100 µg/mL de ampicilina suplementado con 0.01% de ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB; Sigma, St. Louis, MO). Posteriormente se inoculó una colonia en medio BHI caldo suplementado con ampicilina y DHB, el cultivo se realiza a 37 °C en agitación a 200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad de 1.0 a 600 nm, se tomaron 150 µL de cada cultivo y se inoculó a 50 mL de caldo de tioglicolato (Difco Laboratories, Detroit, MI) para favorecer un ambiente microaerófilico e inducir el promotor *pnirB*. Las bacterias fueron cosechadas entre 8 y 10 horas de inducción.

**Tabla 1. Cepas bacterianas.**

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Salmonella enterica</i> serovariedad Typhimurium SL3261	Aro a <sup>-</sup>	11

**Tabla 2. Plásmidos.**

NOMBRE	TAMAÑO	PROTEINA	REFERENCIA
pL-TN	4084 pb	L-TN	78
pL-STN	4156 pb	L-STN	79
pL-TP	4069 pb	L-TP	78
pL-TPN	4138 pb	L-TNP	78
pL-STNP	4210 pb	L-SNP	79

### **Evaluación de la expresión y la translocación de las proteínas de fusión en la superficie de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, mediante ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo.**

*Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium fue transformada con los plásmidos previamente descritos (Tabla 2). La expresión de las proteínas se indujo en presencia de Tioglicolato durante 8 horas, se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS 1X y se ajustaron a  $1 \times 10^6$  bacterias. Las bacterias que contienen las construcciones con la bandera FLAG se incubaron con 100  $\mu$ L del anticuerpo monoclonal Anti-FLAG biotinilado (Sigma) diluido 1:50 en PBS 1X, para las bacterias que contienen las construcciones con la bandera NANP se incubaron con una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal anti NANP en PBS 1X – BSA al 1%. En ambos casos la incubación fue de 30 minutos a 37 °C a 100 rpm. Después de esta incubación, las bacterias se lavaron dos veces con 1 mL de PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario; para las construcciones que tienen FLAG se adicionaron 100  $\mu$ L de Streptavidina-FITC (Zymed) dilución 1:100 en PBS 1X, las construcciones con NANP se incubaron con 100  $\mu$ L de anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a FITC (Zymed) durante 30 minutos a 37 °C a 100 rpm en oscuridad. Se lavaron dos veces con PBS 1X y las bacterias se resuspendieron en 50  $\mu$ L de PBS 1X, posteriormente se depositaron 5  $\mu$ L de esta suspensión bacteriana en laminillas para ser observadas en un microscopio con sistema de epifluorescencia (BX-40, Olympus) ó se analizaron por citometría de flujo (Becton Dickinson, Bedford, Mass).

### **Animales y esquemas de inmunización.**

Los experimentos *in vivo* se realizaron con ratones hembras BALB/c (H2<sup>d</sup>) de 6 a 8 semanas de edad los cuales se criaron y se mantuvieron en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN) de acuerdo a las regulaciones locales y federales. Grupos de seis ratones se inmunizaron con *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium cepas SL3261 (control del vector) ó transformadas con los plásmidos pL-TN (L-TN), pL-STN (L-STN), pL-TP (L-TP), pL-TNP (L-TNP), y pL-STPN (L-STPN). Todas las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo de tioglicolato durante 8 horas para inducir la expresión de las proteínas, al final de esta incubación las bacterias se cosecharon y se ajustaron a  $1 \times 10^{10}$  cels/mL. Estas suspensiones bacterianas se administraron inmediatamente a los ratones por vía intragástrica empleando una sonda calibre 22 (Popper and Sons, USA). Todos los animales recibieron cuatro dosis con

intervalos de 15 días, durante todo el tiempo se administró 0.6 mg de ampicilina/mL en el agua de beber. Como controles positivos se inocularon un grupo de 6 ratones por vía intravenosa con 200  $\mu$ L de sobrenadante de células C6/36 ( $2 \times 10^7$  UFP/mL) infectadas con virus Dengue serotipo 2.

### **Ensayos de proliferación empleando CDCFDA-SE.**

Ratones de cada grupo fueron sacrificados y esplenectomizados 10 días después de la última inmunización con la bacteria recombinante correspondiente. Se obtuvieron las suspensiones celulares de cada bazo. Posteriormente,  $1 \times 10^7$  esplenocitos resuspendidos en 1 mL de RPMI 1640 base, fueron teñidos con CDCFDA-SE 10  $\mu$ M (éster de succinimidil 5,6 carboxi, 2',7' diacetato diclorofluoresceína. Molecular Probes Invitrogen. Eugene, Oregon, USA. Molécula que difunde a través de la membrana plasmática y que una vez en el citosol forma aductos con las proteínas), esta tinción se realizó a 37 °C durante 10 minutos y posteriormente la incorporación de CDCFDA-SE fue detenida por la adición de 100  $\mu$ L de Suero Fetal Bovino (SFB) descompletado frío; después se realizaron dos lavados con RPMI con 10% de SFB frío y finalmente  $2 \times 10^6$  esplenocitos teñidos fueron incubados en un volumen de 200  $\mu$ L en medio RPMI 1640 suplementado con 100 U de penicilina/mL, 10  $\mu$ g de estreptomina /mL, 7.5% de bicarbonato de sodio,  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\beta$ -mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 1% de aminoácidos no esenciales (vol/vol) y 5 % de SFB, en presencia del antígeno, en placas de microcultivo de 24 pozos de fondo plano. Como estímulos se emplea el péptido antigénico de la proteína NS3 del virus Dengue tipo 2 (NS3<sub>298-306</sub>) a concentración de 100  $\mu$ g/mL; virus Dengue serotipo 2 ( $2 \times 10^7$  UFP) a una dilución 1:100 y Concanavalina A a una concentración de 2  $\mu$ g/mL. Después de 2 días de cultivo las células fueron cosechadas y colectadas en tubos para citometría de flujo; las células fueron lavadas al menos una vez con PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de medio (1500 rpm 5 min.). Después de decantar se resuspendió gentilmente el botón celular y se adicionaron aproximadamente 0.3  $\mu$ L de los anticuerpos anti-CD8-PE 0.3  $\mu$ L (BD Pharmigen), anti-CD3-PE-Cy5, anti-CD4-PE y se incuban en oscuridad por 30 minutos. Una vez concluido el tiempo de incubación las tinciones se lavaron con 1 mL de PBA ( PBS 1X pH 7.4 y 0.5 % de BSA). Se decantaron y se fijaron con una solución de Formaldehído al 1 % en PBS IX (Fix-Facs). Finalmente las tinciones fueron procesadas inmediatamente o guardadas a 4°C para su análisis por citometría de flujo (Becton

Dickinson, Bedford, Mass). La proliferación celular antígeno específica fue interpretada como la dilución de la señal de fluorescencia emitida por el CDCFDA-SE según se describe en referencia [80].

### **Tinción de marcadores celulares y citocinas**

Dos ratones de cada grupo fueron sacrificados y esplenectomizados 10 días después de la última inmunización con la bacteria recombinante correspondiente. Posterior a la obtención de las suspensiones celulares de cada bazo, se tomaron  $1 \times 10^6$  esplenocitos y fueron incubados en un volumen de 1 mL en medio RPMI 1640 suplementado (100 U de penicilina/mL, 10  $\mu$ g de estreptomicina /mL, 7.5% de bicarbonato de sodio,  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\beta$ -mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina, 1Mm de piruvato de sodio, 1% de aminoácidos no esenciales (vol/vol) y 5 % de SFB) en presencia del antígeno específico en placas de microcultivo de 24 pozos de fondo plano. Como estímulos se empleó el péptido antigénico de la proteína NS3 del virus Dengue tipo 2 (NS3<sub>298-306</sub>) a concentración de 100  $\mu$ g/mL; virus Dengue serotipo 2 ( $2 \times 10^7$  UFP) a una dilución 1:100 y Concanavalina A (Con A) a una concentración de 2  $\mu$ g/mL. Después de 2 días de cultivo las células fueron cosechadas y colectadas en tubos para citometría de flujo; las células fueron lavadas al menos una vez con PBS 1X pH 7.4 para eliminar el exceso de medio (1500 rpm 5 min.). Después de decantar se resuspendió gentilmente el botón celular y se adicionaron aproximadamente 0.3 uL de los anticuerpos anti-CD8-PE 0.3  $\mu$ L (BD Pharmigen), anti-CD3-PE-Cy5(BD Pharmigen), anti-CD4-PE (BD Pharmigen), y se incubaron en oscuridad por 30 minutos. Una vez concluido el tiempo de incubación las tinciones se lavaron con 1 mL de PBA ( PBS 1X pH 7.4 y 0.5 % de BSA). Se decantaron y se fijaron con una solución de Formaldehído al 1 % en PBS IX (Fix-Facs) durante 15 minutos. Al término del tiempo de fijación, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos y decantadas. Posteriormente fueron permeabilizadas durante 15 minutos con 250 uL de una solución de Saponina al 0.1 % en PBA. Al concluir la permeabilización las células fueron centrifugadas, decantadas y tenidas con 0.4 uL del anticuerpo anti-IFN  $\gamma$ -APC (BD Pharmigen) durante 30 minutos en oscuridad, al termino de este tiempo las células fueron lavadas nuevamente con 1 mL de solución de PBA y finalmente fueron fijadas con 250 uL Fix-Facs. Finalmente las tinciones fueron analizadas inmediatamente o guardadas a 4°C para su análisis por citometría de flujo (Becton

Dickinson, Bedford, Mass) para identificar la población celular productora de interferón  $\gamma$  en respuesta de los diferentes estímulos.

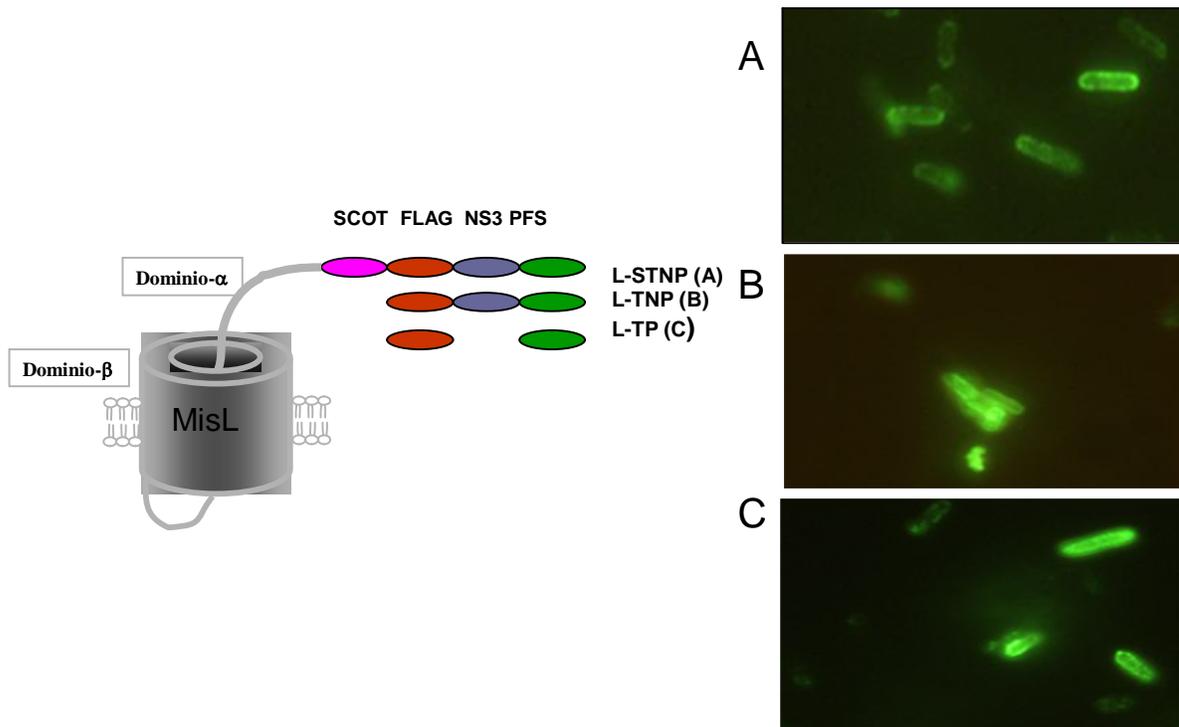
### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism® 4; usando un análisis de varianza de tipo no paramétrico de una vía para todos los resultados obtenidos de los ensayos que determinan el porcentaje de células productoras de IFN  $\gamma$  y para la caracterización de las poblaciones de linfocitos a diferentes a las 48 y 96 horas.

## VIII. RESULTADOS.

### Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes en las diferentes cepas vacunales.

*Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium SL3261 fue transformada por electroporación con los diferentes plásmidos y posteriormente se realizó la inducción de las proteínas en medio microaerófilico tal como se describió previamente. El ensayo de Inmunofluorescencia buscando al epítipo FLAG en la superficie de las *Salmonellas* recombinantes que expresan a las proteínas L-TP, L-TNP y L-STNP fue positiva en los tres casos según se muestra en la figura 1. La figura 2 muestra la expresión de las proteínas pL-TN y pL-STN, la inmunofluorescencia dirigida contra el epítipo NANP fue positiva en los dos casos, indicando que las proteínas se encontraban en la superficie de *Salmonella enterica* (Figura 2). Por otra parte, se realizaron tinciones de superficie para citometrías en las diferentes cepas vacunales tal como fue descrito anteriormente; en la figura 3 se muestran las citometrías realizadas a las diferentes cepas vacunales.

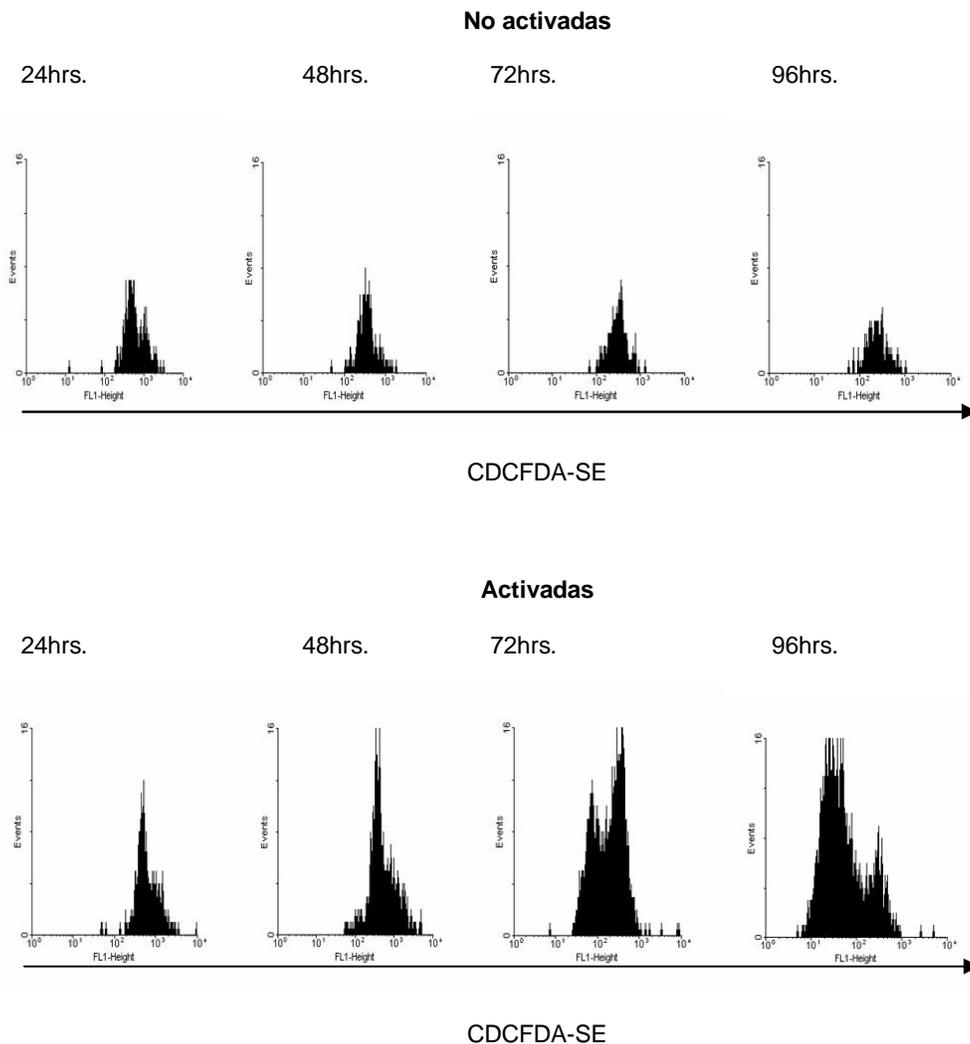


**Figura 1. Análisis de la expresión de las diferentes proteínas recombinantes en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium por inmunofluorescencia.** Se indujo la expresión de las proteínas en medio microaerófilico e inmediatamente fueron analizadas por inmunofluorescencia; para las proteínas L-STNP, L-TNP, y L-TP, se empleó el anticuerpo anti-FLAG.

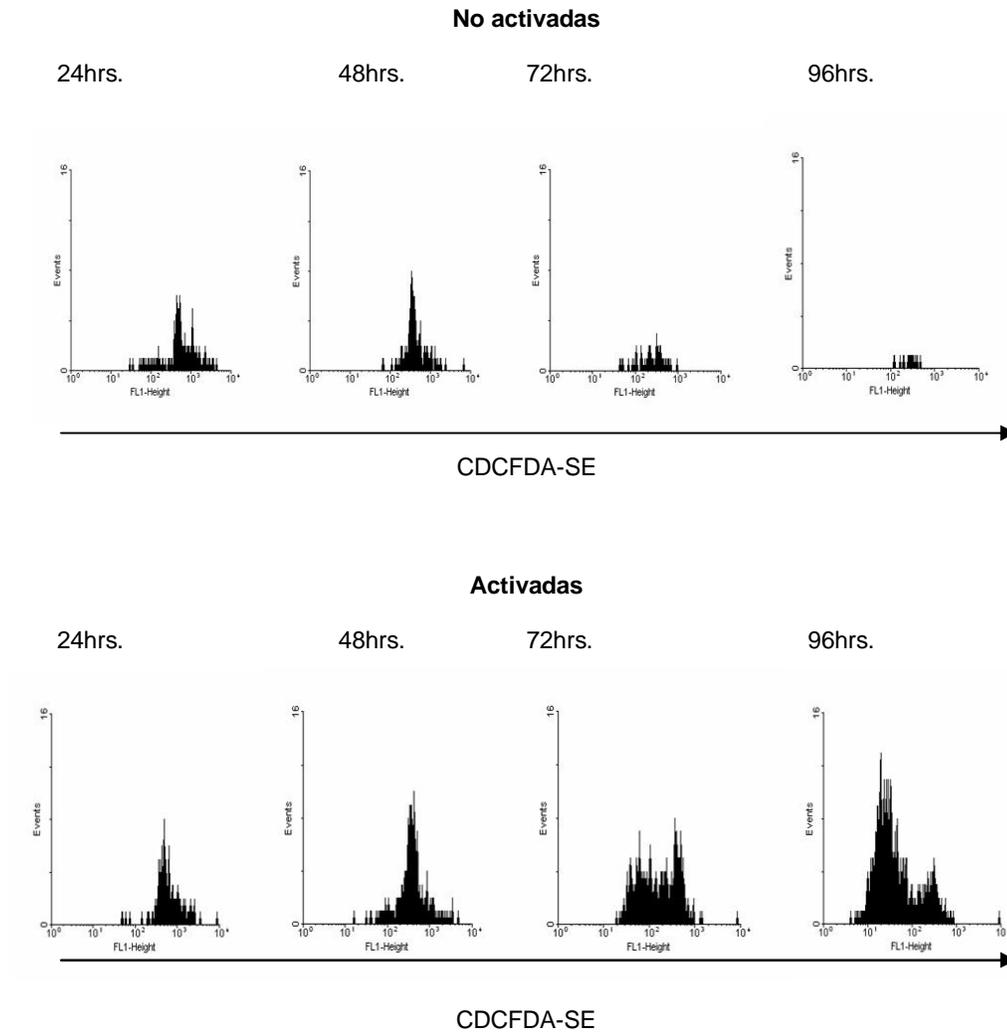


### Cinética de proliferación de linfocitos T empleando CDCFDA-SE.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones de la cepa BALB/c (H2<sup>d</sup>),  $1 \times 10^7$  células se tiñeron con CDCFDA-SE  $10 \mu\text{M}$  y  $1 \times 10^6$  se plaquearon en placas de microcultivo de 24 pozos en fondo plano. Las células fueron estimuladas con Concanavalina A (Con A) a una concentración de  $2 \mu\text{g/mL}$ . Para la cinética de proliferación se realizaron tinciones de superficie con los marcadores CD3, CD4 y CD8 a las 24, 48, 72 y 96 horas. En las figuras 4 y 5 se muestran los resultados de ésta cinética de proliferación. La proliferación celular fue interpretada como la dilución de la señal de fluorescencia emitida por el CDCFDA-SE según se describe en referencia [80].



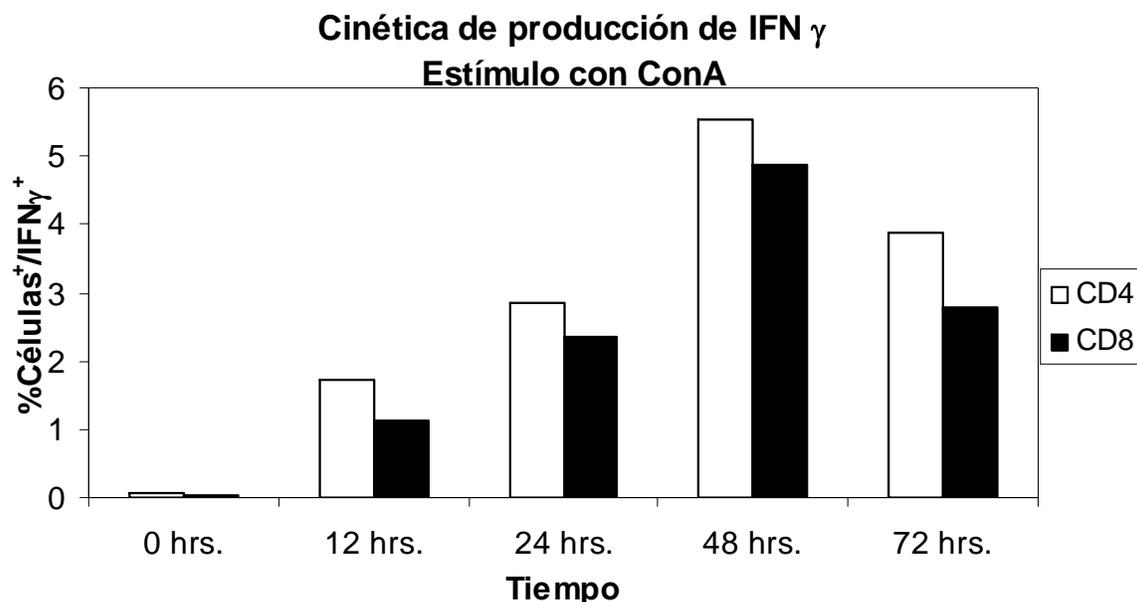
**Figura 4. Cinética de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD4<sup>+</sup>.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a las células totales del bazo de un ratón; cada día se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>.



**Figura 5. Cinética de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD8<sup>+</sup>.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a las células totales del bazo de un ratón; cada día se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>.

### Cinética de inducción de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ .

Ratones de la cepa BALB/c (H2<sup>d</sup>) fueron sacrificados y se recuperaron las células totales del bazo. Las células fueron estimuladas con Concanavalina A en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. A las 12, 24, 48 y 72 horas se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8; y la tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En la figura 6 se muestra una gráfica con los valores obtenidos en este ensayo.

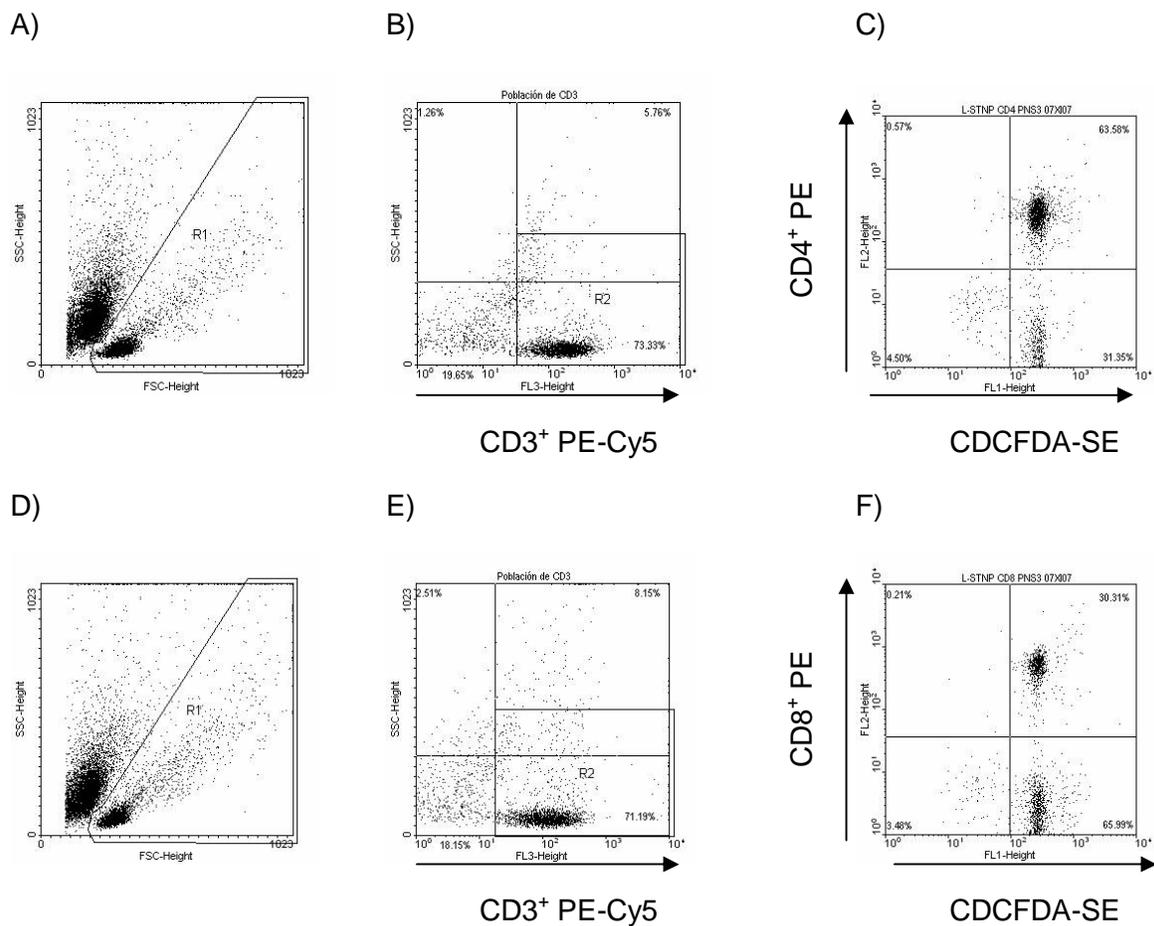


**Figura 6. Cinética de producción de IFN  $\gamma$ .** Se realizó una cinética de producción de IFN  $\gamma$  a diferentes tiempos; en la figura se muestran los resultados de ésta cinética de producción de la molécula de interés. Se emplea concanavalina A a 2 ug/mL.

### Proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> antígenos específicos inducida contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue.

Grupos de 6 ratones de la cepa BALB/c (H2<sup>d</sup>) fueron inmunizados por vía oral con una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium cepa SL3261 que expresaban o no a las proteínas L-TN, L-STN, L-TP, L-TNP y L-STNP. Se empleó como control positivo un grupo que fue inmunizado vía intravenosa con virus Dengue serotipo 2 (100  $\mu$ L  $2 \times 10^7$  UFP); los refuerzos para este grupo se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund en una relación 1:1 (v/v) en una dosis de 100  $\mu$ L. Al décimo día de la última inmunización se sacrificaron 2 ratones por grupo para cada experimento y los esplenocitos obtenidos fueron sometidos al protocolo de

proliferación celular antígeno específico empleando CDCFDA-SE. Como estímulos se emplearon el péptido PNS3, Virus Dengue (1:100) y Concanavalina. A las 48 horas se realizó un análisis de las poblaciones celulares activadas y los ensayos de proliferación con CDCFDA-SE fueron procesados a las 96 horas. La figura 7 muestra las poblaciones analizadas por citometría de flujo que previamente fueron sometidas a las tinciones superficiales con CD3, CD4 y CD8. La proliferación celular antígeno específica fue interpretada como la dilución de la señal de fluorescencia emitida por el CDCFDA-SE según se describe en referencia [80].



**Figura 7. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida contra el epítipo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue mediante ensayos de proliferación con CDCFDA-SE.** Después de haber obtenido las células totales del bazo y ser estimuladas con el péptido PNS3, se realizaron tinciones de superficie para CD3, CD4 y CD8. a y d) Representan la población total de la citometría; se hace una región de acuerdo al tamaño y granularidad con respecto a la población esperada. b y e) Representan la población teñida con  $\alpha$ CD3 para separar la población de linfocitos T de los linfocitos B. c y f) Representan la población teñida con  $\alpha$ CD4 ó  $\alpha$ CD8 respectivamente que además está teñidas con CDCFDA-SE.

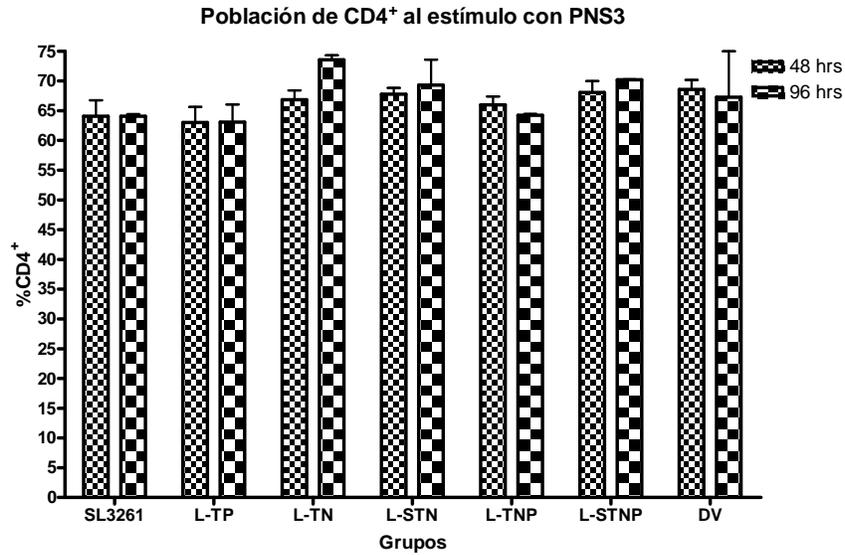
La figura 8 muestra los porcentajes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con el epitopo PNS3 a las 48 y 96 horas. Como se puede observar, las poblaciones para el grupo L-STNP (68.05%±3.84% a las 48 horas y 70.19%±0.09% 96 horas) presenta un ligero incremento en la población al igual que los demás grupos inmunizados con las cepas que contienen el epitopo PNS3, el grupo L-STN (67.77%±2.1% y 69.32%±6.03%), el grupo L-TN (66.84%±3.16% y 73.54%±1.11%) a excepción del grupo L-TNP (66.00%±2.76% y 64.00%±0.3%); pero los grupos L-TP (63.02%±5.22% y 63.07%±4.19%) y SL3261 (64.07%±5.33% y 64.08%±0.5%) no muestran cambios aparentes, el control positivo con virus Dengue mostró valores de 68.55±3.24% a las 48 horas y 67.29%±10.92%. La figura 9 muestra los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> estimulados con el epitopo PNS3 a las 48 y 96 horas. Como se puede apreciar la mayoría de los grupos mostraron una ligera disminución de la población a las 96 horas: grupo L-STNP (28.65%±3.75% a las 48 horas y 28.74%±2.52%), grupo L-TNP (32.12%±1.72% y 29.3%±2.31%), grupo L-STN (29.57%±3.87% y 25.56%±1.76%), grupo L-TN (29.45%±3,87% y 26.47%±0.11%), grupo L-TP (32.74%±4.70% y 31.15%±3.52%), los controles SL3261 mostraron valores de 30.78%±5.71% a las 48 horas y 32.02%±1.1% a las 96 horas, para el grupo control positivo de virus Dengue se observaron 30.48%±2.25% a las 48 horas y 29.52%±1.91%. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

Cuando las células se estimularon con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100, se observó un ligero incremento en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el grupo de L-STNP a las 48 horas (68.01%±2.87%) pero esta población no incrementó a las 96 horas (67.82%±0.95%); sin embargo, los grupos L-TNP (65.21%±2.09% y 61.97%±1.22%), L-STN (67.35%±2.13% y 59.85%±6.63%), L-TN (66.1%±3.1% y 59.51%±1.03%) y L-TP (63.99±4.15% y 62.96%±0.47) mostraron una ligera disminución de la población CD4<sup>+</sup>, el grupo control SL3261 mostró valores de (62.46%±4.13% y 62.46%±6.54%) y el grupo control positivo inmunizado con DV mostró valores de 65.91%±4.48% a las 48 horas y de 65.28%±6.98% a las 96 horas. Ver Figura 10. Cuando se analizaron los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con el virus Dengue se observó que los grupos L-TNP (29.84%±0.39% y 28.8%±0.58%) grupo L-STN (28.27%±3.68% y 23.76%±3.31%), grupo L-TN (28.06%±3.17% y 25.35%±1.96%) y L-TP (32.2%±4.74% y 28.14%±2.18%) disminuyeron ligeramente la población a las 96 horas, sin embargo, el grupo L-STNP mostró valores de 27.13%±2.47% a las 48 horas y un ligero incremento en su población a las 96 horas (27.95%±4.92%). Los controles mostraron los siguientes porcentajes de células CD8<sup>+</sup>: control negativo SL3261 (31.43%±4.51% y 29.15%±1.93%) y control positivo inmunizado

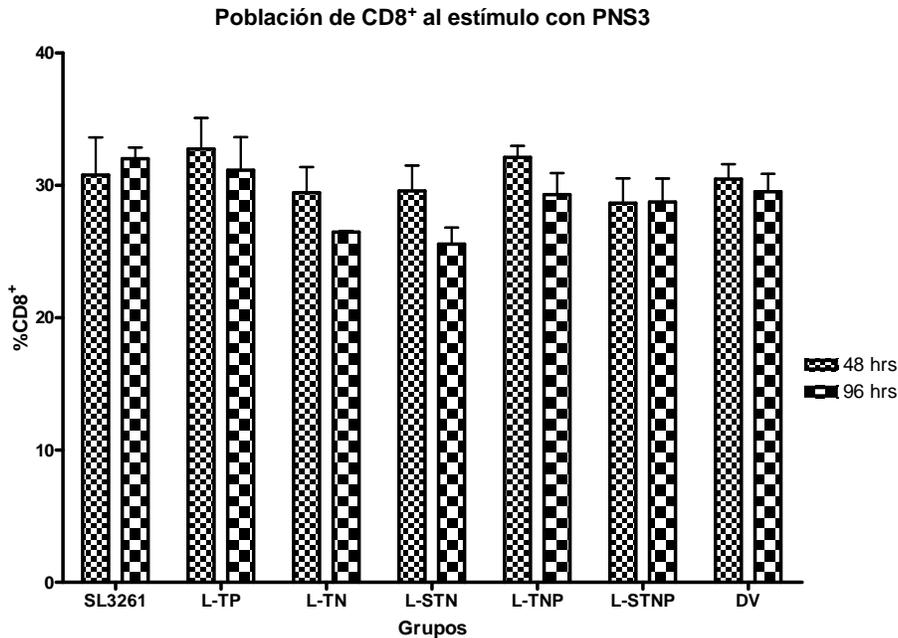
con virus Dengue ( $30.22\% \pm 1.5\%$  y  $26.56\% \pm 3.79\%$ ). Ver figura 11. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

Al analizar la población estimulada con Concanavalina A se observó que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 12) en casi todos los grupos disminuyeron ligeramente tal como lo muestran los siguientes valores: grupo L-STNP ( $63.04\% \pm 10.02\%$  a las 48 horas y  $60.37\% \pm 3.63\%$  a las 96 horas), L-TNP ( $62.77\% \pm 7.97\%$  y  $56.30\% \pm 5.94\%$ ), L-STN ( $67.22\% \pm 7.33\%$  y  $65.49\% \pm 8.8\%$ ), L-TN ( $64.06\% \pm 5.09\%$  y  $60.91\% \pm 5.03\%$ ), L-TP ( $60.69\% \pm 8.35\%$  y  $53.45\% \pm 4.6\%$ ) y SL3261 ( $62.86\% \pm 7.11\%$  y  $56.26\% \pm 0.32\%$ ); solo en el grupo control positivo inmunizado con virus Dengue se observó un ligero incremento a las 96 horas ( $64.2\% \pm 9.42\%$  y  $67.17\% \pm 11.48\%$ ). En cuanto a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con Concanavalina A (Figura 13), todos los grupos mostraron un ligero incremento según se observa en los siguientes valores: grupo L-STNP ( $28.79\% \pm 9.98\%$  a las 48 horas y  $36.55\% \pm 7.1\%$  a las 96 horas), grupo L-TNP ( $30.42\% \pm 8.43\%$  y  $40.46\% \pm 12.51\%$ ), grupo L-STN ( $29.35\% \pm 8.87\%$  y  $32.60\% \pm 9.62\%$ ), grupo L-TN ( $30.3\% \pm 6.5\%$  y  $39.37\% \pm 4.86\%$ ) grupo L-TP ( $34.6\% \pm 10.44\%$  y  $43.44\% \pm 9.62\%$ ) y el grupo SL3261 ( $28.11\% \pm 8.71\%$  y  $31.74\% \pm 13.26\%$ ), el grupo control positivo inmunizado con virus Dengue presentó valores de  $27.85\% \pm 9.33\%$  a las 48 horas y  $32.03\% \pm 6.55\%$  a las 96 horas. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

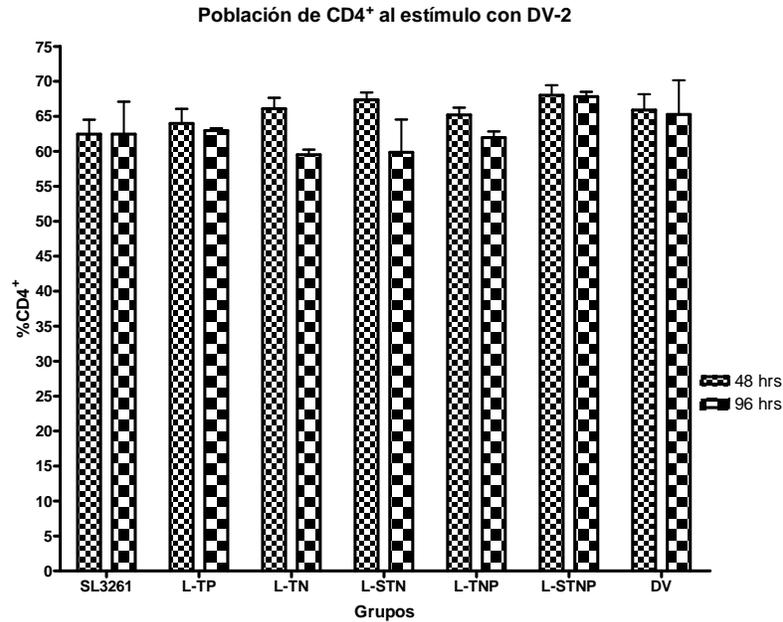
En las figuras 14 y 15, se muestran los histogramas correspondientes a las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que fueron cultivadas teñidas con CDCFDA-SE, no estimuladas y finalmente cosechadas a las 96 horas. El análisis de proliferación realizado a las 96 horas empleando CDCFDA-SE en todos los grupos al estímulo con el epítipo PNS3, no presentó evidencia de una ronda de proliferación extra en las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 16) ni en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 17) en ninguno de los grupos. Al estímulo con el virus Dengue tampoco fue posible observar la presencia de rondas extras de proliferación en ningún grupo según se muestra en la figura 18 para linfocitos T CD4<sup>+</sup> y en la figura 19 para linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Todos los grupos mostraron una gran proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 20) y de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 21) cuando fueron estimulados con Concanavalina. Sin embargo, cabe resaltar que el grupo inmunizado con virus Dengue (Control positivo) mostró una ligera ronda de proliferación extra tanto en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> pero solo cuando son estimulados con virus Dengue y en comparación contra sus basales; para CD4<sup>+</sup>  $14.23\%$  vs.  $10.71\%$  y para CD8<sup>+</sup>  $9.27\%$  vs.  $11.4\%$ .



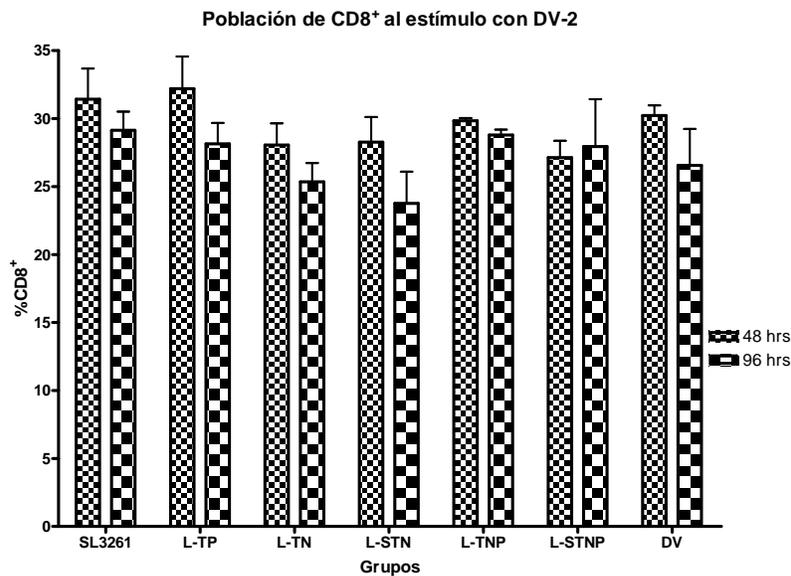
**Figura 8. Análisis de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en respuesta al estímulo con el epítipo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue.** Aquí se muestran las poblaciones celulares correspondientes a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que provienen de 4 experimentos independientes a las 48 horas y a las 96 horas. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con el Péptido PNS3; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni entre tiempos.



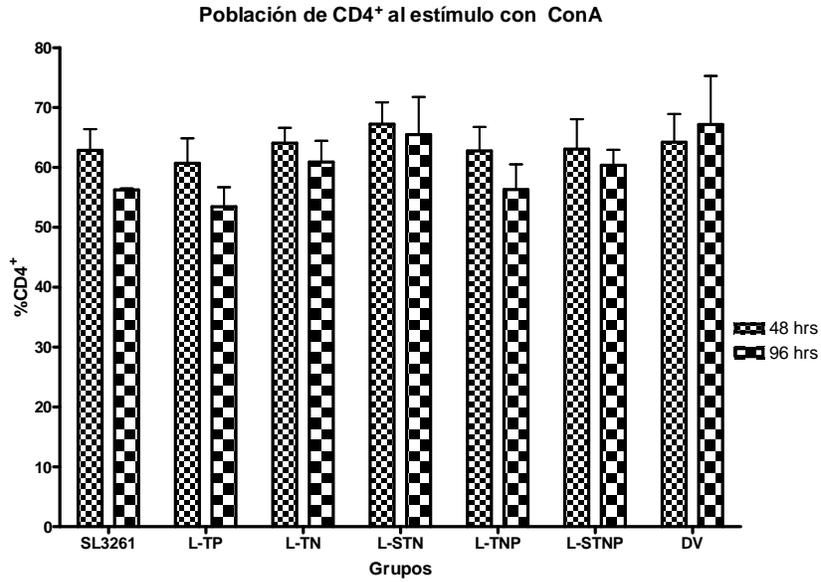
**Figura 9. Análisis de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta al estímulo con el epítipo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue.** Aquí se muestran las poblaciones celulares correspondientes a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que provienen de 4 experimentos independientes a las 48 horas y a las 96 horas. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con el Péptido PNS3; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni entre tiempos.



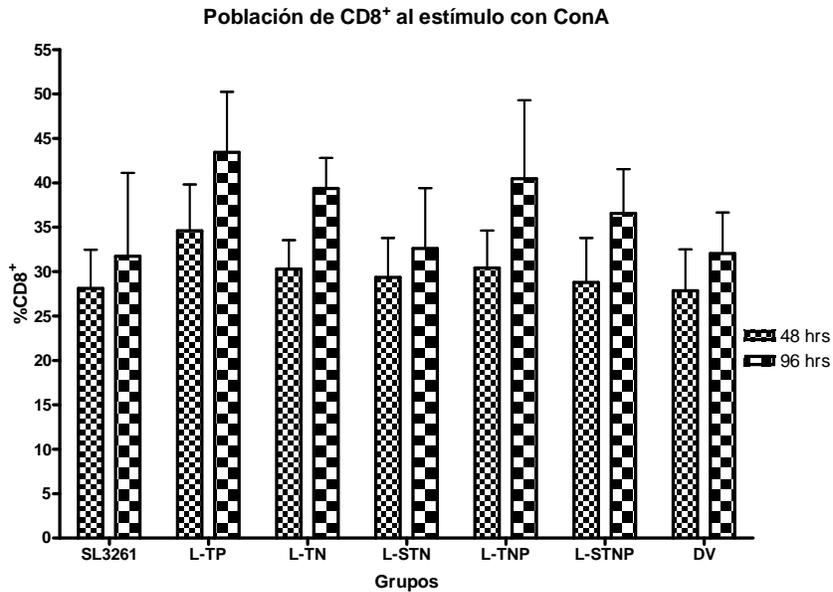
**Figura 10. Análisis de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en respuesta al estímulo con virus Dengue serotipo 2.** Aquí se muestran las poblaciones celulares correspondientes a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que provienen de 4 experimentos independientes a las 48 horas y a las 96 horas. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni entre tiempos.



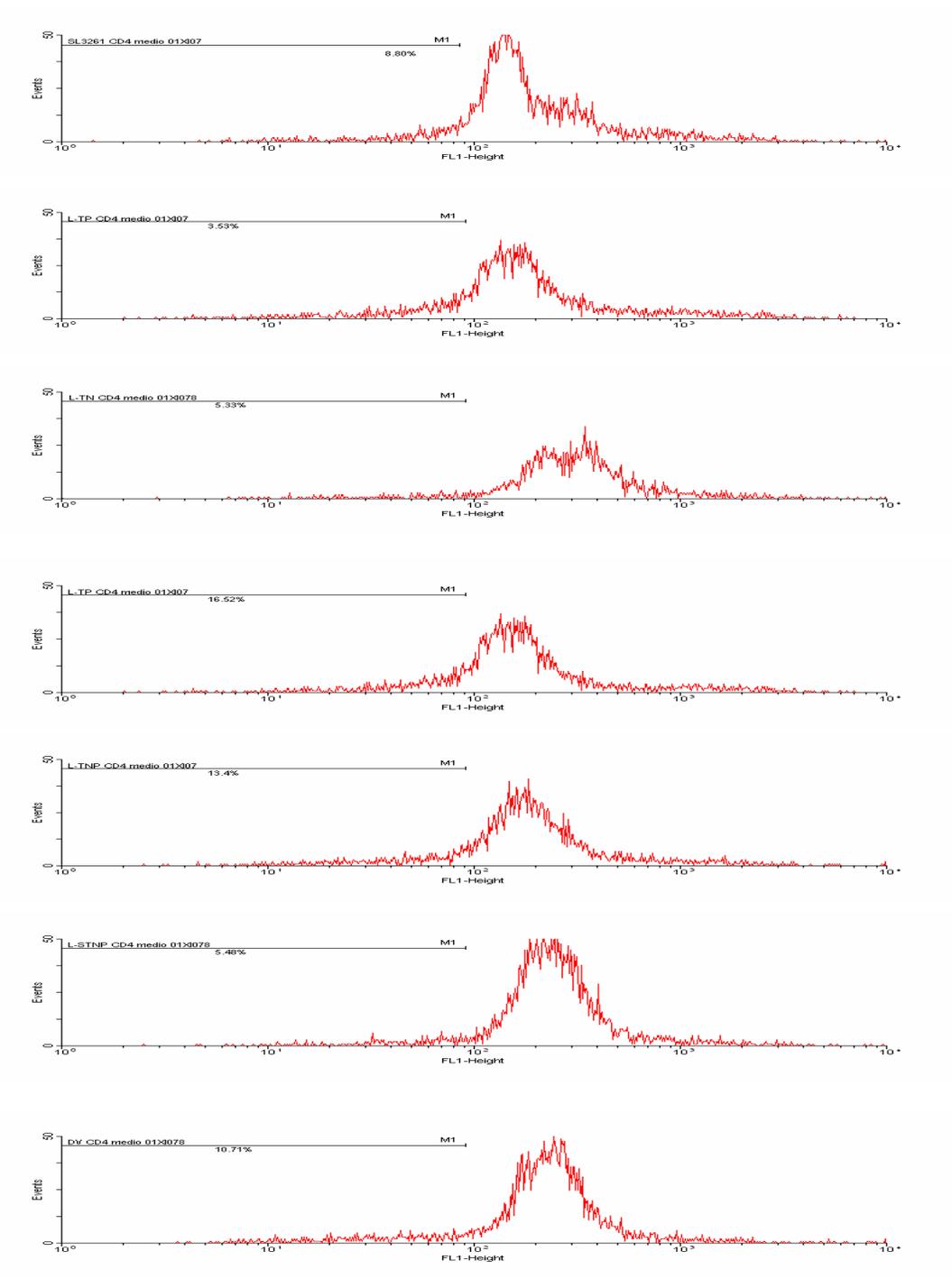
**Figura 11. Análisis de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta al estímulo con virus Dengue serotipo 2.** Aquí se muestran las poblaciones celulares correspondientes a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que provienen de 4 experimentos independientes a las 48 horas y a las 96 horas. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni entre tiempos.



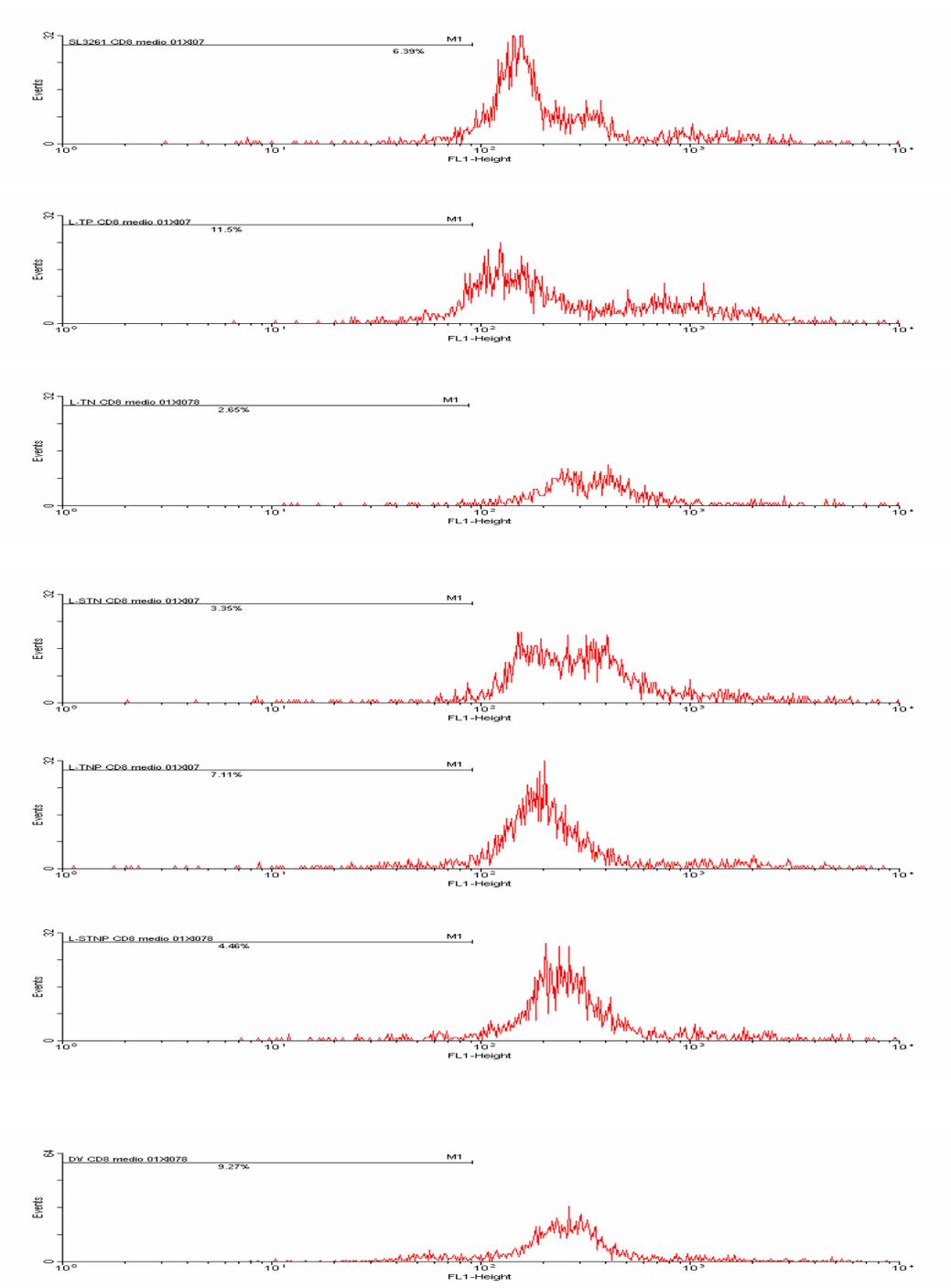
**Figura 12. Análisis de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en respuesta al estímulo con ConA.** Aquí se muestran las poblaciones celulares correspondientes a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que provienen de 4 experimentos independientes a las 48 horas y a las 96 horas. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con ConA; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni entre tiempos.



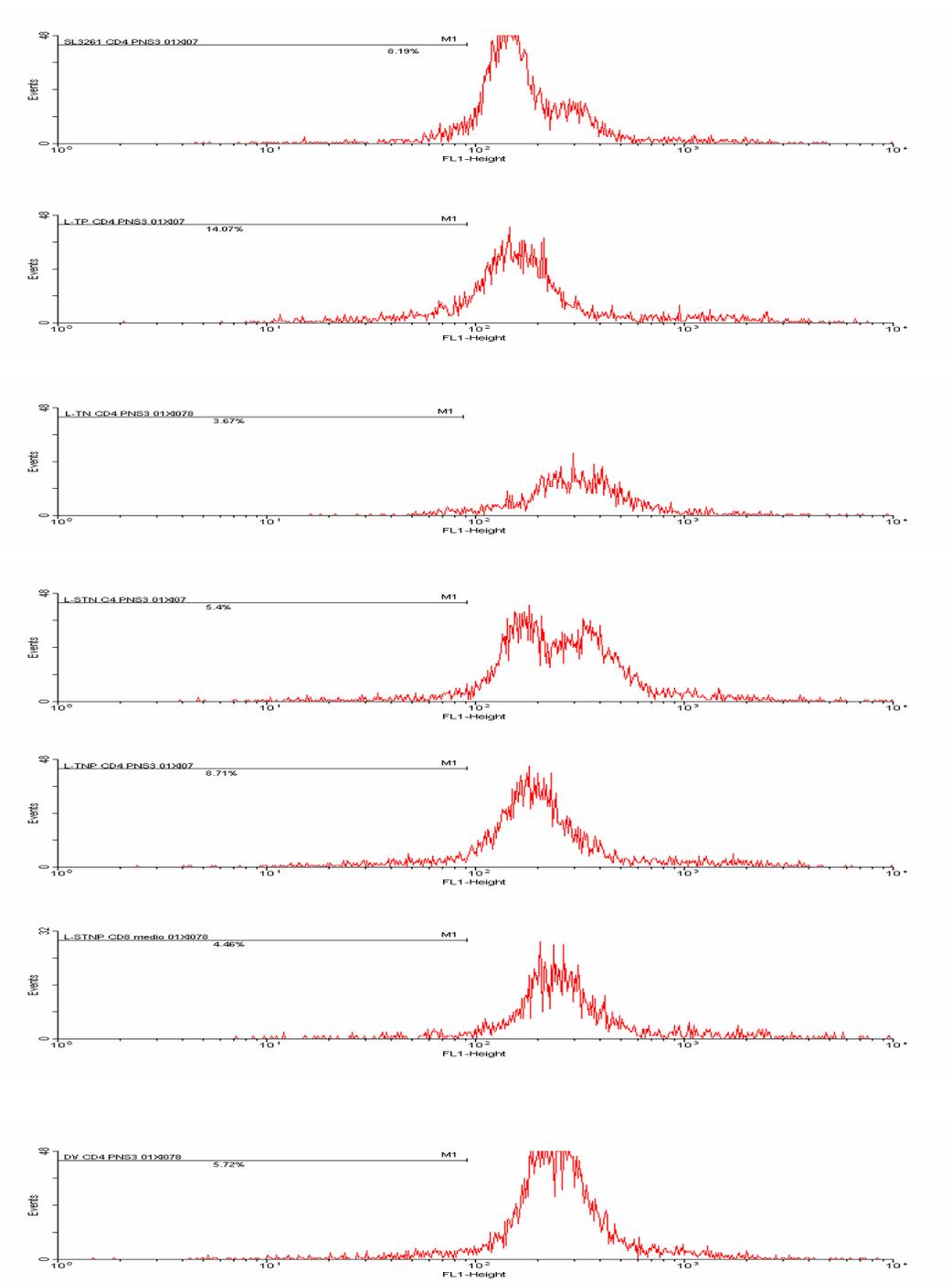
**Figura 13. Análisis de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta al estímulo con ConA.** Aquí se muestran las poblaciones celulares correspondientes a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que provienen de 4 experimentos independientes a las 48 horas y a las 96 horas. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con ConA; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ni entre tiempos.



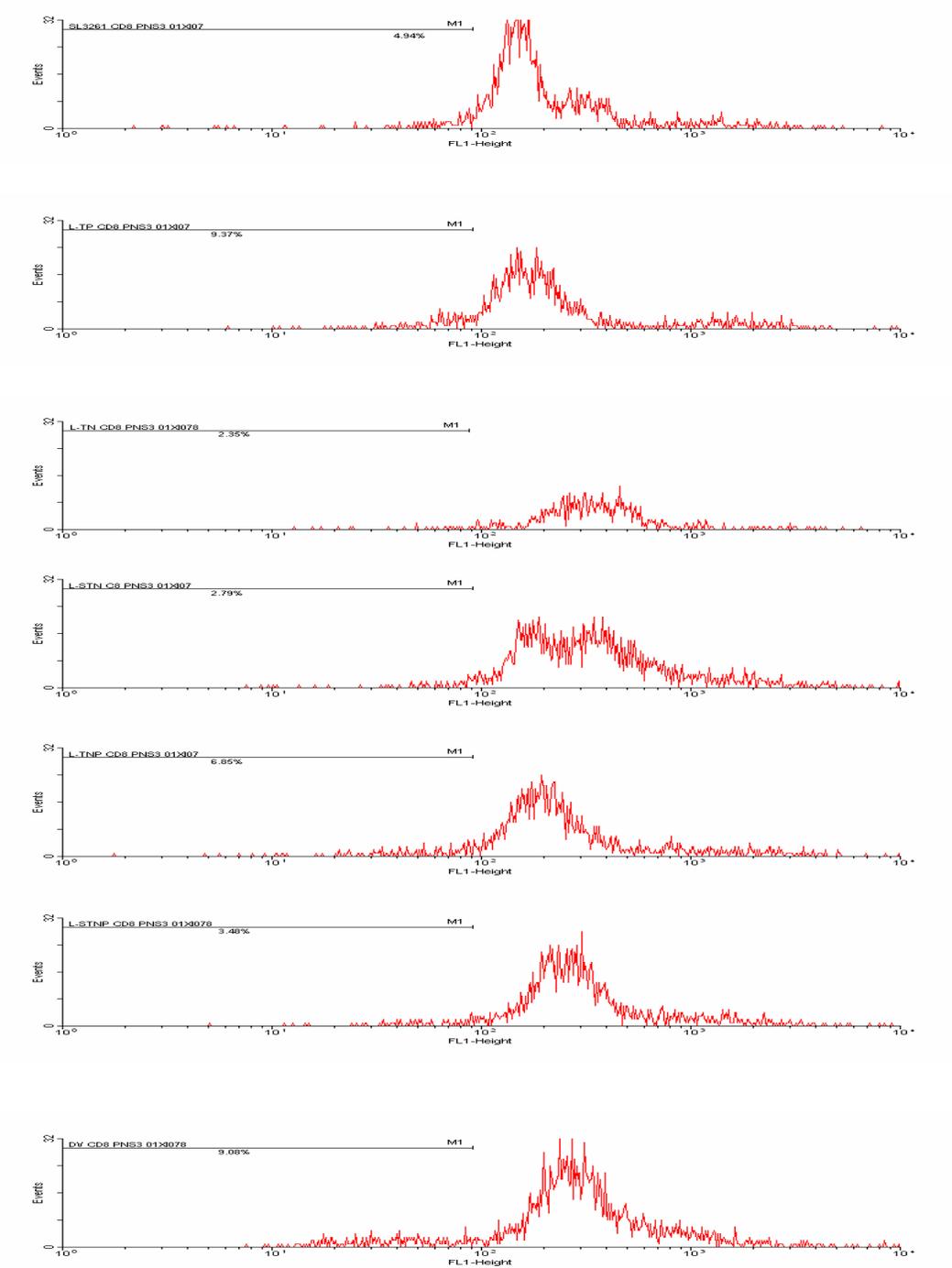
**Figura 14. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD4<sup>+</sup> sin estímulo.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos; se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Los histogramas mostrados representan células sin estimular.



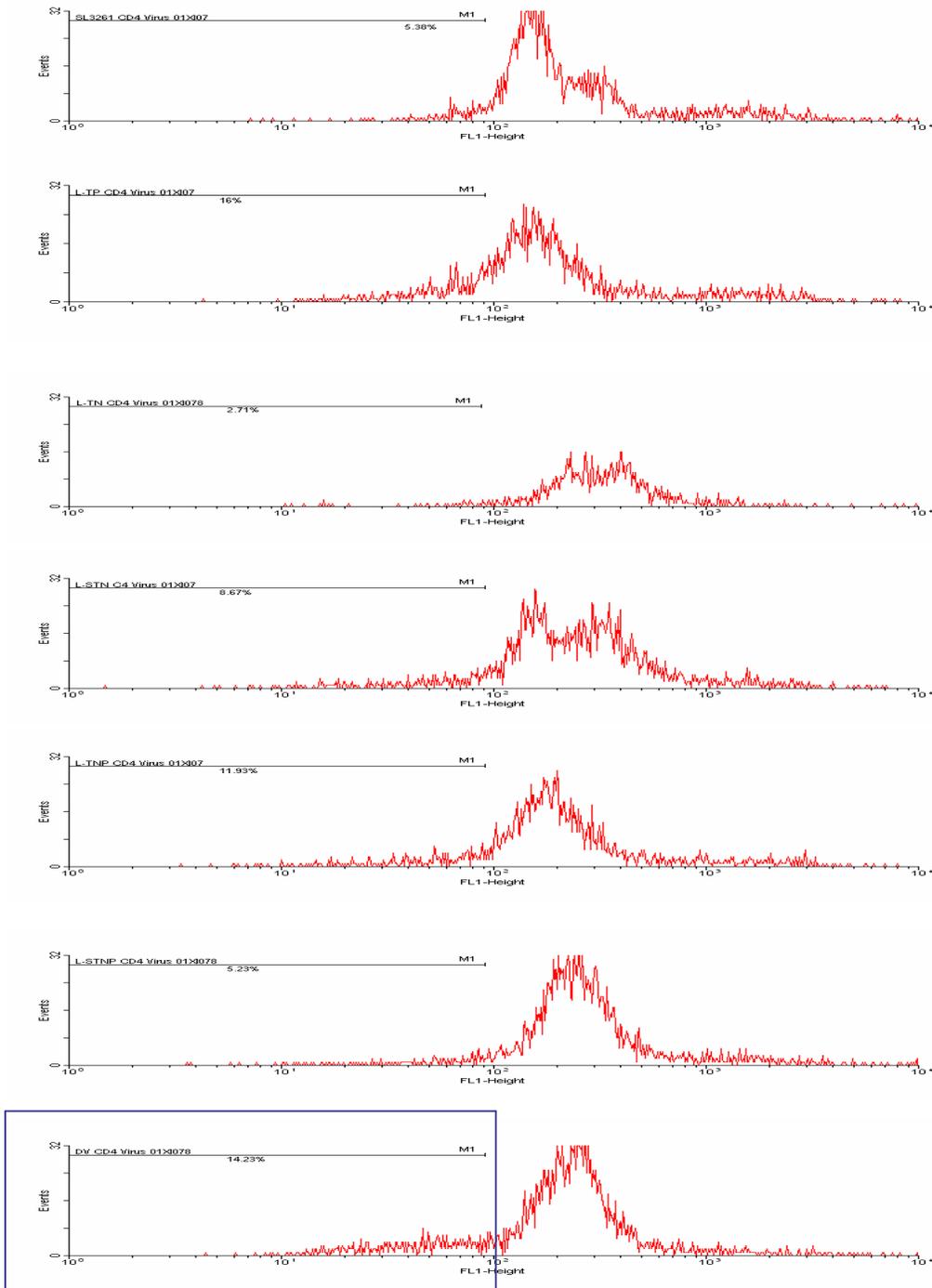
**Figura 15. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD8<sup>+</sup> sin estímulo.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos; se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Los histogramas mostrados representan células sin estimular.



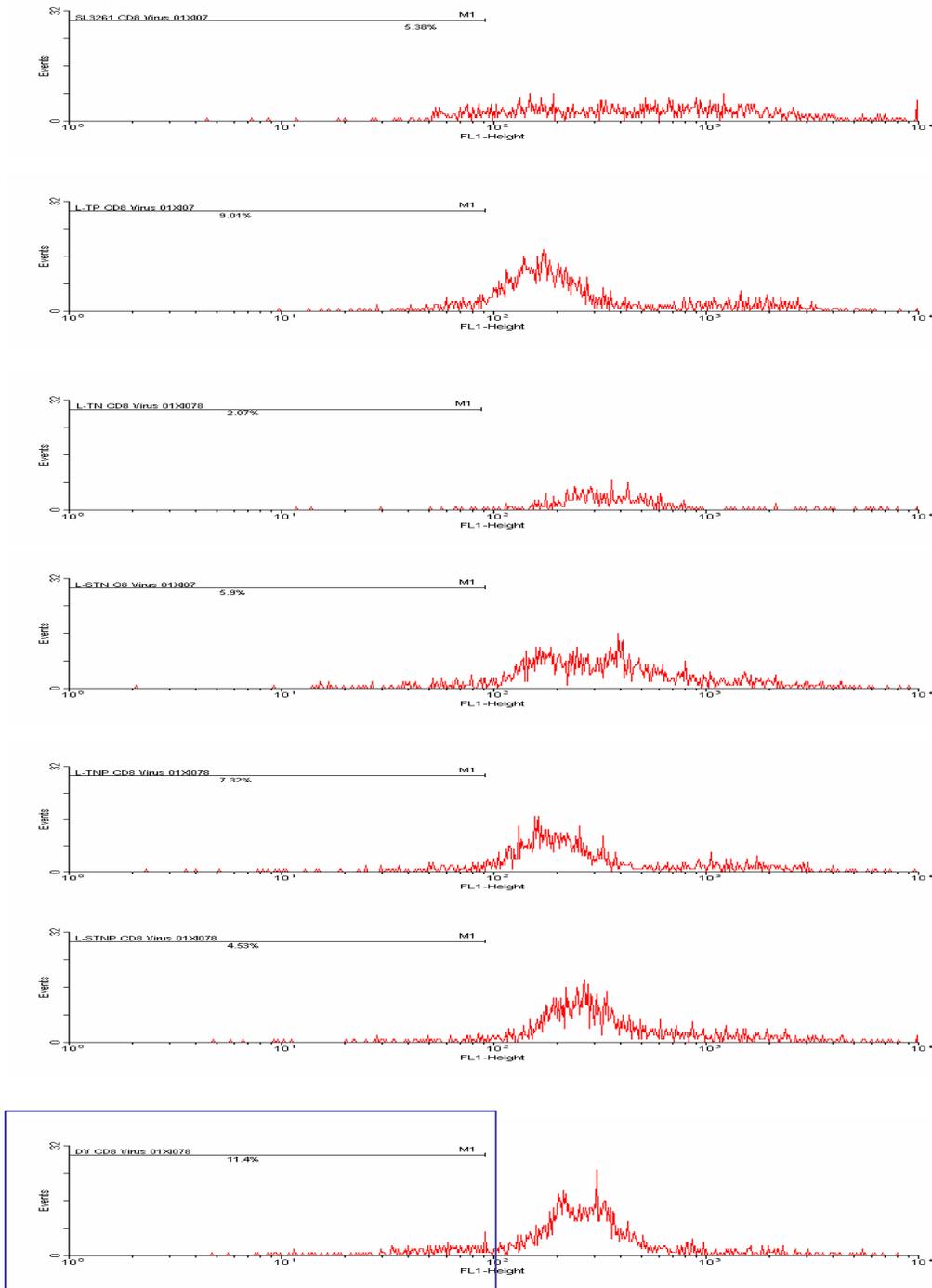
**Figura 16. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD4<sup>+</sup> al estímulo con el péptido PNS3.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos que fueron estimulados con el péptido PNS3 por 96 horas. Al finalizar el tiempo se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>.



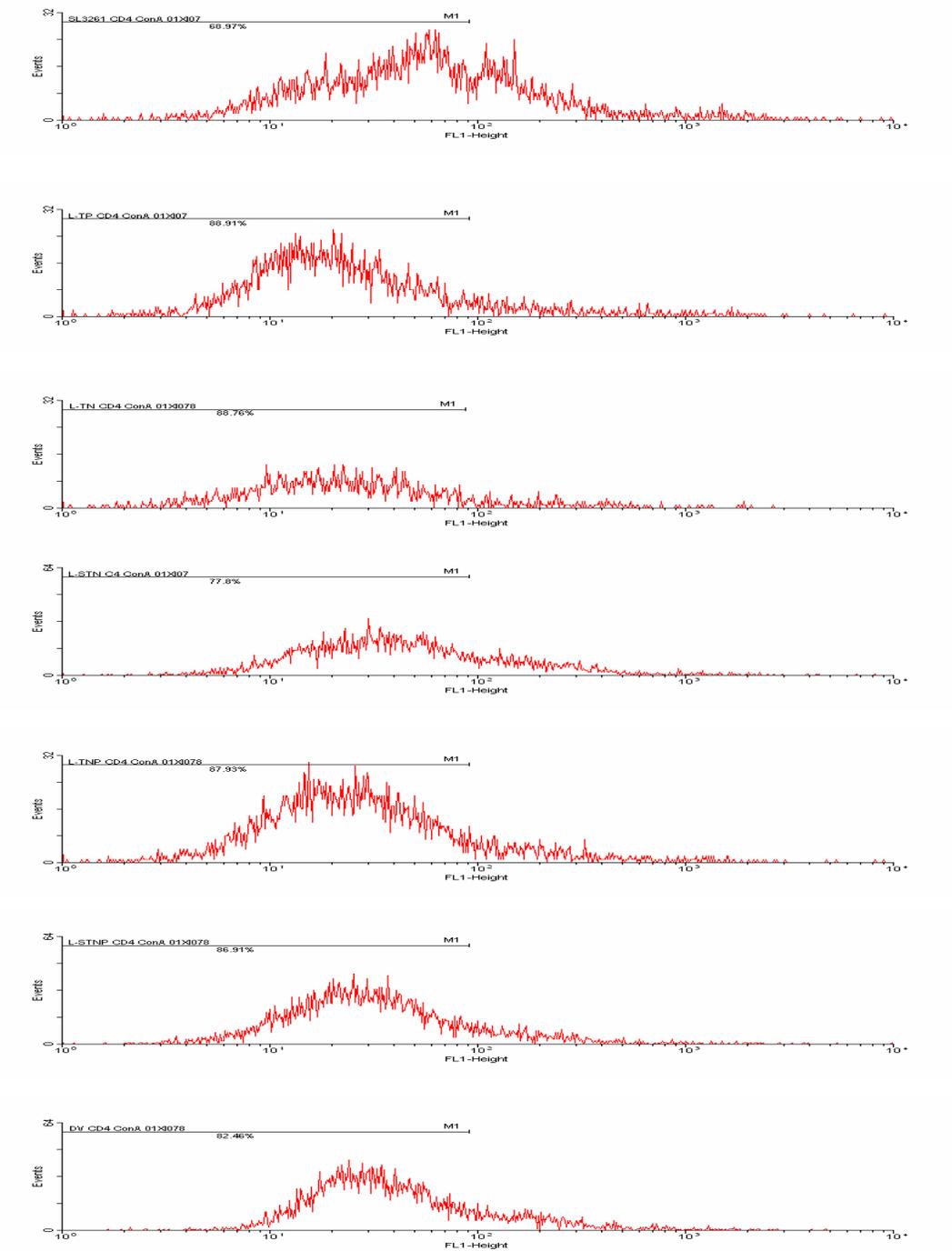
**Figura 17. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con el péptido PNS3.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos que fueron estimulados con el péptido PNS3 por 96 horas. Al finalizar el tiempo se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>.



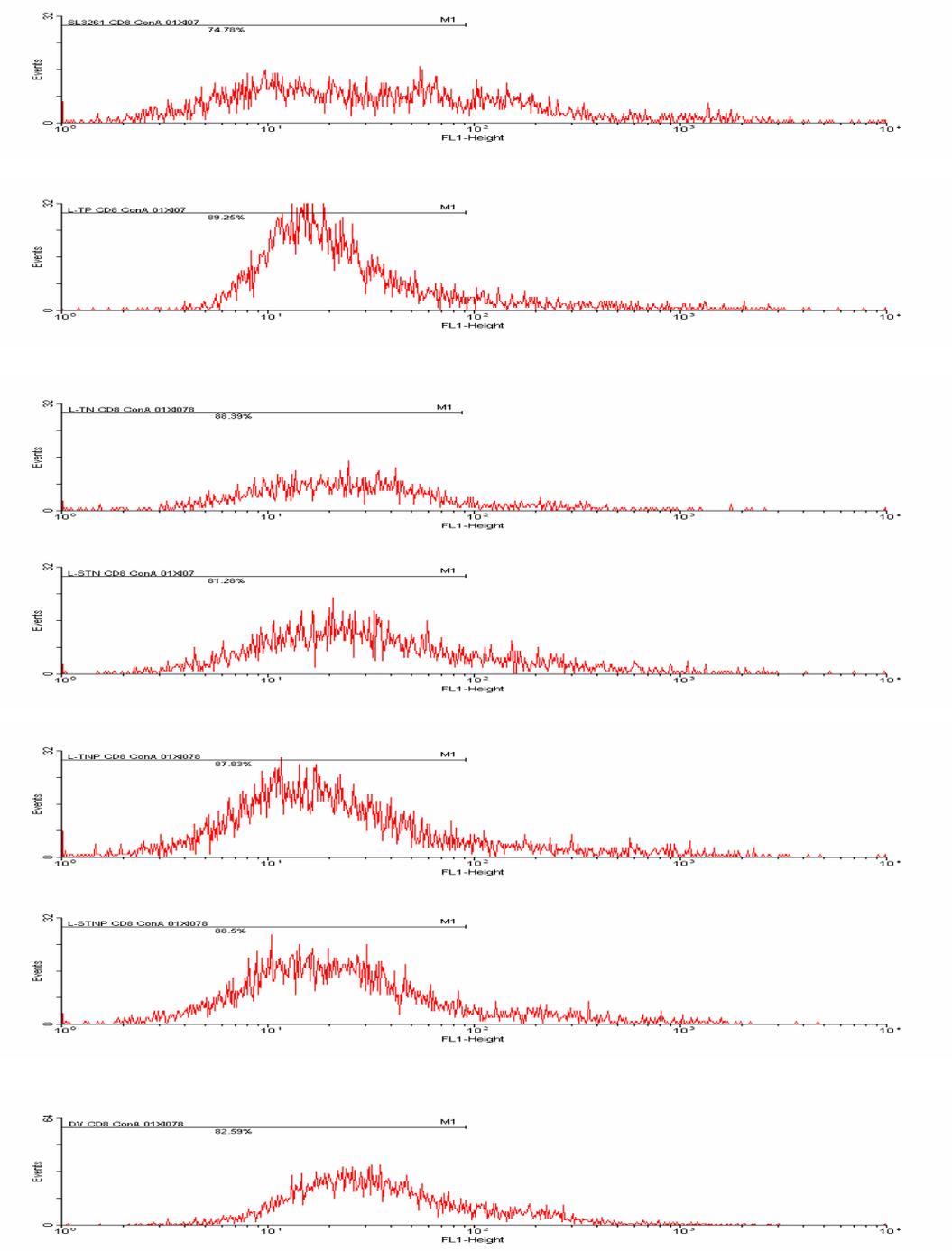
**Figura 18. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD4<sup>+</sup> al estímulo con virus Dengue serotipo 2.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos que fueron estimulados con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100 por 96 horas. Al finalizar el tiempo se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>. El recuadro azul muestra un aumento en la población proliferante perteneciente al grupo DV.



**Figura 19. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con virus Dengue serotipo 2.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos que fueron estimulados con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100 por 96 horas. Al finalizar el tiempo se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>. El recuadro azul muestra un aumento en la población proliferante perteneciente al grupo DV.



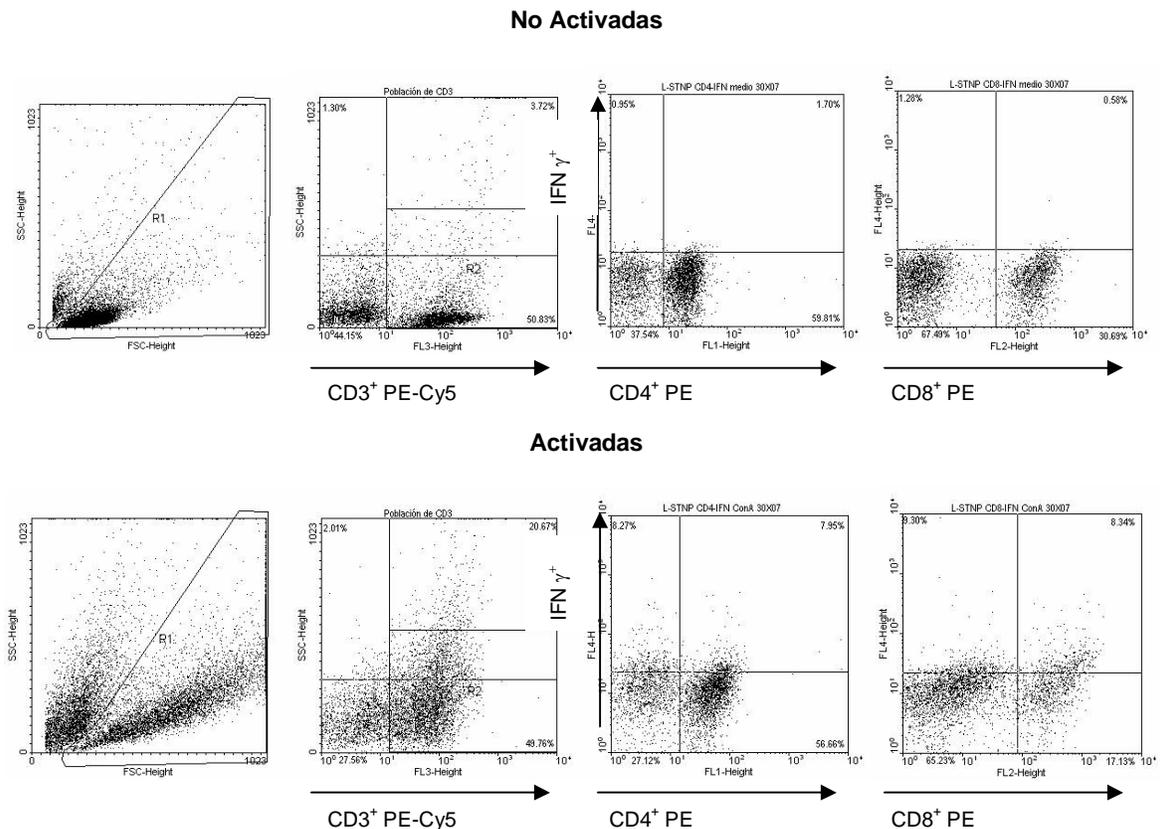
**Figura 20. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD4<sup>+</sup> al estímulo con ConA.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos que fueron estimulados con ConA por 96 horas. Al finalizar el tiempo se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD4. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>.



**Figura 21. Ensayos de proliferación con CDCFDA-SE para linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con ConA.** Se realizó una tinción con CDCFDA-SE a esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de los diferentes grupos que fueron estimulados con ConA por 96 horas. Al finalizar el tiempo se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3 y CD8. En la figura se muestra un histograma de las tinciones; dónde la población mostrada pertenece a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fue analizada considerando la región positiva para linfocitos T CD3<sup>+</sup>.

## Producción de IFN $\gamma$ por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> antígenos específicos inducidos contra el epítopo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue.

Grupos de 6 ratones de la cepa BALB/c (H2<sup>d</sup>) fueron inmunizados por vía oral con una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium cepa SL3261 que expresaban o no a las proteínas L-TN, L-STN, L-TP, L-TNP y L-STNP. Como control positivo un grupo que fue inmunizado vía intravenosa con virus Dengue serotipo 2,  $100 \mu\text{L}$  ( $2 \times 10^7$  UFP); los refuerzos para este grupo se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund en una relación 1:1 (v/v) con una dosis de  $100 \mu\text{L}$ . Al décimo día de la última inmunización se sacrificaron 2 ratones por grupo para cada experimento y los esplenocitos obtenidos fueron sometidos a los protocolos de activación para la determinación de células productoras de IFN  $\gamma$  según se describió en materiales y métodos, empleando los anticuerpos anti CD3, CD4, CD8 para las tinciones superficiales y anti-IFN  $\gamma$  para la tinción intracelular. Las figura 22 muestra un ejemplo del análisis de población realizada con los esplenocitos activados o no con Concanavalina A.



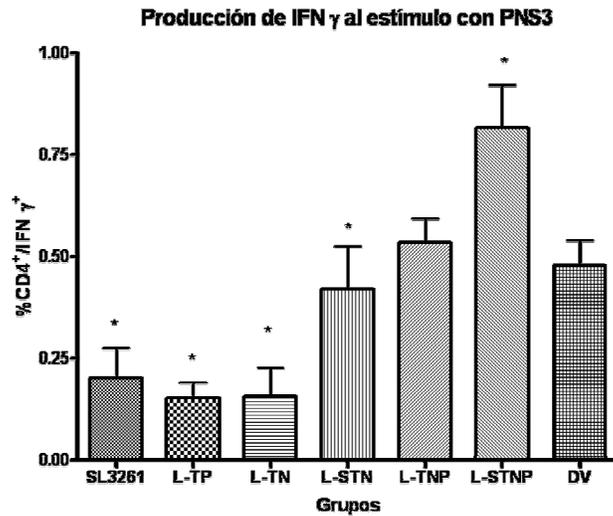
**Figura 21. Análisis de la población de esplenocitos activados y no activados.** Después de haber obtenido las células totales del bazo y ser estimuladas o no con Concanavalina A, se realizaron tinciones de superficie para CD3, CD4 y CD8 e IFN  $\gamma$ .

Al analizar las poblaciones celulares productoras de IFN  $\gamma$  al ser estimuladas con el péptido PNS3, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  fue mayor en el grupo L-STNP (0.82 $\pm$ 0.2) en comparación con los grupos SL3261 (0.20% $\pm$ 0.1%), L-TP (0.15%  $\pm$ 0.1%), L-TN (0.16% $\pm$ 0.1%), L-STN(0.42% $\pm$ 0.2%), L-TNP (0.53% $\pm$ 0.1%); los valores del control positivo DV observaron valores de 0.48 $\pm$ 0.1% (Figura 22). La figura 23 muestra el porcentaje de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  al estímulo con PNS3 y el grupo L-STNP (0.73 % $\pm$ 0.5%) indujo mayor respuesta en comparación con los grupos SL3261(0.05% $\pm$ 0.08%), L-TP(0.095% $\pm$ 0.08%), L-TN (0.02% $\pm$ 0.03%), L-STN (0.28% $\pm$ 0.1%), L-TNP (0.40% $\pm$ 0.2%), el grupo control positivo inmunizado con virus Dengue mostró valores de 0.37% $\pm$ 0.163%. En todos los casos se obtuvieron diferencias significativas entre L-STNP contra los grupos control desde p<0.001 hasta p<0.05.

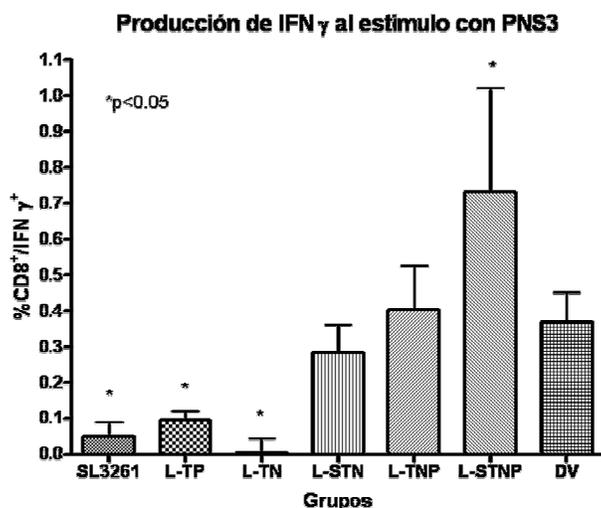
Cuando se estimularon las células de los diferentes grupos con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100 el grupo que indujo mayor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  fue L-STNP (1.13% $\pm$ 0.4%) en comparación con los grupos SL3261 (0.15% $\pm$ 0.2%), L-TP (0.21 $\pm$ 0.03%), L-TN (0.43% $\pm$ 0.08%), L-STN (0.59% $\pm$ 0.2%), L-TNP (0.90% $\pm$ 0.2%); el grupo control positivo inmunizado con DV mostró valores de 0.93% $\pm$ 0.43%(Figura 24). Un comportamiento similar se observó en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  al estímulo con el virus Dengue en donde el grupo L-STNP indujo mejor respuesta (1.01% $\pm$ 0.1%) en comparación con los grupos SL3261 (0.06% $\pm$ 0.1%), L-TP (0.20% $\pm$ 0.1%), L-TN (0.22% $\pm$ 0.08%), L-STN (0.42% $\pm$ 0.186%), L-TNP (0.7275% $\pm$ 0.291%); el grupo control positivo inmunizado con DV presentó valores de 0.73% $\pm$ 0.13%(Figura 25). En todos los casos se obtuvieron diferencias significativas entre L-STNP contra los grupos control desde p<0.001 hasta p<0.05.

Cuando se analizó la población de células productoras de IFN  $\gamma$  al estímulo con Concanavalina A nuestro control positivo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  (Figura 26) fueron ligeramente mayores para el grupo L-STNP (2.33% $\pm$ 0.79%) en comparación con los grupos SL3261 (1.84% $\pm$ 1.56%), L-TP (0.9 $\pm$ 0.24%), L-TN (1.56% $\pm$ 1.24%), L-STN (2.21% $\pm$ 1.5%), L-TNP (2.86% $\pm$ 1.86%); el grupo control positivo inmunizado con DV mostró valores de 2.23% $\pm$ 0.89%. En la figura 27 se muestra el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  al estímulo con Concanavalina A; el grupo L-STNP muestra un ligero incremento en la población de 3.19% $\pm$ 2.53% en comparación con los grupos SL3261 (1.41% $\pm$ 0.83%), L-TP (1.16% $\pm$ 0.64), L-TN (1.64 $\pm$ 0.97%), L-STN (2.7% $\pm$ 3.21%), L-TNP (3.5% $\pm$ 4%); el grupo control positivo

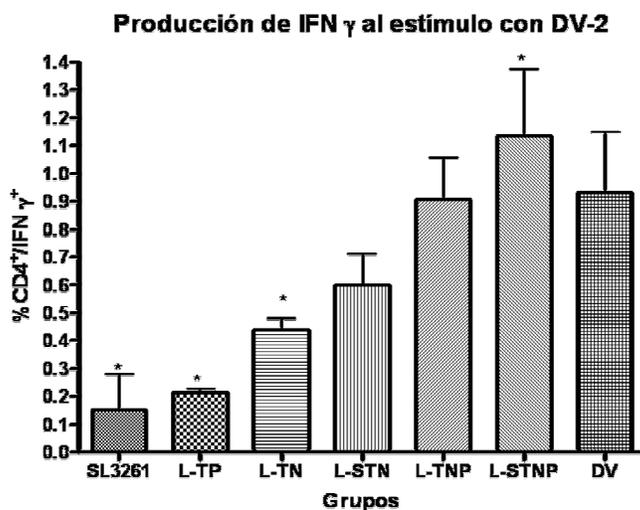
inmunizado con DV presentó valores de  $2.08\% \pm 1.68\%$ . Sin embargo, las diferencias entre los diferentes grupos no fueron significativas.



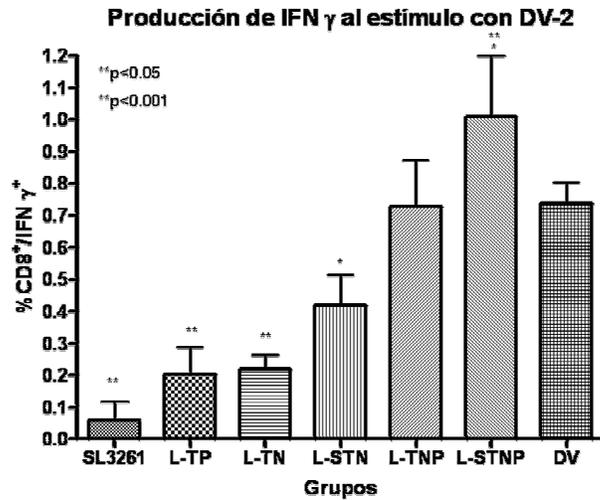
**Figura 22.** Análisis de las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra el epítipo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue. Aquí se muestra el análisis estadístico de cuatro experimentos independientes; se analiza la producción de IFN  $\gamma$  a las 48hrs. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con el Péptido PNS3; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8, seguida de una tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En ésta figura se observa el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$ , en cada grupo de ratones. Se realizó un análisis de varianza de una vía tipo no paramétrica; encontrándose diferencias significativas de  $p < 0.01$  entre L-STNP vs. SL3261, L-TP y L-TN y con una  $p < 0.05$  vs. L-STN.



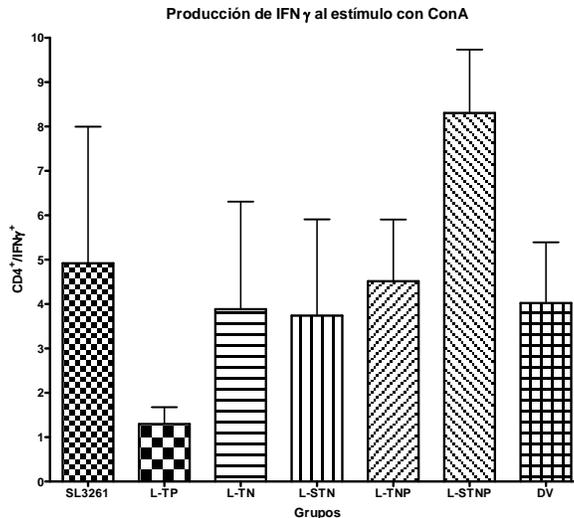
**Figura 23.** Análisis de las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra el epítipo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue. Aquí se muestra el análisis estadístico de cuatro experimentos independientes; se analiza la producción de IFN  $\gamma$  a las 48hrs. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con el Péptido PNS3; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8, seguida de una tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En ésta figura se observa el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$ , en cada grupo de ratones. Se realizó un análisis de varianza de una vía tipo no paramétrica; encontrándose diferencias significativas de  $p < 0.05$  entre L-STNP vs. SL3261, L-TP y L-TN.



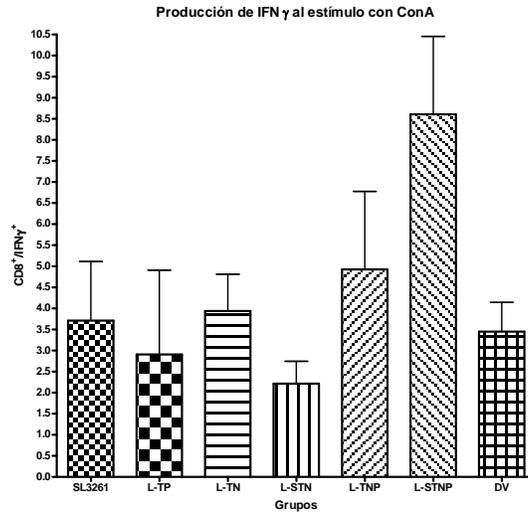
**Figura 24.** Análisis de las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra virus Dengue serotipo 2. Aquí se muestra el análisis estadístico de cuatro experimentos independientes; se analiza la producción de IFN  $\gamma$  a las 48hrs. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8, seguida de una tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En ésta figura se observa el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$ , en cada grupo de ratones. Se realizó un análisis de varianza de una vía tipo no paramétrica; encontrándose diferencias significativas de  $p < 0.01$  entre L-STNP vs. SL3261 y L-TP; y con  $p < 0.05$  vs. L-TN.



**Figura 25. Análisis de las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra virus Dengue serotipo 2.** Aquí se muestra el análisis estadístico de cuatro experimentos independientes; se analiza la producción de IFN  $\gamma$  a las 48hrs. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con virus Dengue serotipo 2 dilución 1:100; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8, seguida de una tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En ésta figura se observa el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN  $\gamma$ , en cada grupo de ratones. Se realizó un análisis de varianza de una vía tipo no paramétrica; encontrándose diferencias significativas de  $p < 0.001$  entre L-STNP vs. SL3261, L-TP y L-TN; y con  $p < 0.05$  vs. L-STN.



**Figura 26. Análisis de las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra Concanavalina A (ConA).** Aquí se muestra el análisis estadístico de cuatro experimentos independientes; se analiza la producción de IFN  $\gamma$  a las 48hrs. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con ConA; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8, seguida de una tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En ésta figura se observa el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN  $\gamma$ , en cada grupo de ratones. Se realizó un análisis de varianza de una vía tipo no paramétrica, sin encontrarse diferencias significativas.



**Figura 27. Análisis de las poblaciones celulares activadas productoras de IFN  $\gamma$  durante la inducción de la respuesta inmune contra Concanavalina A (ConA).** Aquí se muestra el análisis estadístico de cuatro experimentos independientes; se analiza la producción de IFN  $\gamma$  a las 48hrs. Se obtuvieron las células totales del bazo, se incubaron y fueron estimuladas con ConA; después se realizó una tinción de marcadores de superficie para CD3, CD4 y CD8, seguida de una tinción intracelular para IFN  $\gamma$ . En ésta figura se observa el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$ , en cada grupo de ratones. Se realizó un análisis de varianza de una vía tipo no paramétrica, sin encontrarse diferencias significativas.

## X. DISCUSIÓN

El uso de vectores bacterianos vivos constituye una estrategia óptima para la generación de una respuesta inmune de tipo sistémica y de mucosas tal como se ha demostrado en numerosos trabajos. En éste contexto *Salmonella enterica* representa una alternativa prometedora para el desarrollo de este tipo de vacunas ya que su producción masiva es de bajo costo, además se cuentan con cepas atenuadas que no revierten su patogenicidad en individuos inmunocomprometidos y en caso de revertir son sensibles a una amplia gama de antibióticos, pueden ser administradas oralmente y poseen tropismo por las células presentadoras de antígeno [1,15].

*Salmonella enterica* es un patógeno intracelular de residencia fagolisosomal y no se conocen con exactitud los mecanismos de estimulación de las células CD8<sup>+</sup> cuando se emplea a esta bacteria como vector de antígenos heterólogos. Una de las primeras evidencias de inducción de CTLs empleando a *Salmonella enterica* fue mostrada por González-Bonilla CR y cols., [12] al expresar a la proteína CSP (circunsporozoítica) de *Plasmodium falciparum* en el citosol de esta bacteria. Actualmente se conoce que la inducción de la respuesta inmune citotóxica, empleando a *Salmonella enterica* como vector de antígenos heterólogos, es más eficiente si el antígeno es secretado de la bacteria, tal como lo demuestran los trabajos realizados en los sistemas de secreción tipo I y tipo III [37-39]. En este contexto nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que la expresión de péptidos fusogénicos sintéticos acoplados a un epitopo de Dengue y secretado de la superficie bacteriana a través del autotransportador MisL (Sistema de secreción tipo V) fue eficiente para inducir una respuesta de CTLs antígeno específica contra el epitopo de Dengue [79]. Sin embargo, para una mejor caracterización de este sistema es necesario analizar la población celular que esta respondiendo al estímulo antigénico. Este trabajo propone contestar esta pregunta mediante el siguiente abordaje experimental: Se inmunizaron ratones con las diferentes cepas recombinantes descritas por Luría-Pérez y cols., en referencia 79. Los ratones inmunizados fueron sacrificados y analizados por citometría de flujo para la identificación del tipo celular que prolifera al estímulo antigénico (epitopo PNS3 ó virus Dengue) empleando CDCFDA-SE [80] y para identificar a las células productoras de IFN  $\gamma$  en presencia de los estímulos antes descritos.

Con la finalidad de re-evaluar la eficiencia del sistema de péptidos fusogénicos que son expresados en la superficie de *Salmonella enterica* a través del autotransportador MisL, los plásmidos que codifican para las proteínas de fusión L-TN, T-TP, L-TNP, L-STNP fueron transformados y expresados en la superficie de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium SL3261. Los ensayos de inmunofluorescencias y citometría de flujo demostraron que las proteínas recombinantes se expresaron de manera eficiente y se localizaron en la membrana externa de *Salmonella enterica*.

La respuesta inmune inducida por la inmunización de los ratones con las diferentes salmonellas fue caracterizada analizando las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> que responden al estímulo antígeno (PNS3 ó virus Dengue) y analizando su proliferación mediante ensayos de CDCFDA-SE. Cuando se analizó la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> al estímulo con epitopo PNS3 el grupo L-STNP que contiene el péptido fusogénico unido al epitopo de Dengue y que lo libera de la superficie bacteriana mostró un ligero incremento en la población total con respecto a los demás grupos, este hallazgo se vio confirmado al estimular con virus Dengue. En cuanto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con el virus Dengue se observó una ligera disminución de esta población, sin embargo al estimular con virus Dengue, los valores aumentaron, aunque en todos los casos estas ligeras diferencias no fueron significativas y pueden deberse muy probablemente a la variabilidad de las mediciones en el experimento. Con la finalidad de confirmar si existía una población de linfocitos T ya sea CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> que estuviera induciendo una ronda extra de proliferación que explicara los valores de citotoxicidad encontrados por Luría-Pérez y cols [79], se verificaron las proliferaciones a las 96 horas de cada una de las poblaciones analizadas anteriormente. En el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> al estímulo con el epitopo PNS3 no se observó ninguna ronda de población extra en ninguno de los grupos analizados estos resultados son consistentes con los experimentos en donde se estimuló con virus Dengue. Al respecto de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> mostró la misma tendencia observada para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, no se observaron rondas de proliferación extra en ninguno de los grupos analizados al estímulo con PNS3 ó virus Dengue, excepto en el grupo de ratones control inmunizados con virus Dengue. Estos resultados contradicen lo reportado por Luría-Pérez y cols [79] en donde se observa una exacerbación de una ronda de proliferación extra de una población CD8<sup>+</sup> al estímulo con el epitopo PNS3 la principal razón de esta diferencia podría deberse al tiempo de análisis de estas poblaciones, el análisis de proliferación en este trabajo fue realizado a las 96 horas y en el ensayo referido se realizaron a las 120 horas.

Diversos trabajos han reportado que la medición de IFN  $\gamma$  correlaciona con actividad efectora de los linfocitos T citotóxicos [80]. Considerando esta premisa y con la finalidad de determinar que población de linfocitos T estaba induciendo la actividad citotóxica reportada por Luría-Pérez y cols., [79]. Se realizaron mediciones de IFN  $\gamma$  tanto para linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó linfocitos T CD8<sup>+</sup> al estímulo con el epitopo PNS3 y virus Dengue.

Sorprendentemente los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  provenientes del grupo L-STNP mostraron un mayor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  al estímulo con el péptido PNS3 y con el virus Dengue. Estos resultados pueden explicarse en función de que el fragmento clonado en las diferentes cepas recombinantes incluye aparte de epitopo para CD8 (negritas) otros aminoácidos (cursivas) que lo flanquean (AR **GYISTRVEM** GEAA) y que el péptido PNS3 empleado en este trabajo incluyó dos aminoácidos aparte del epitopo para CD8 (AR **GYISTRVEM**). Estos resultados hacen sentido con resultados del grupo de Francis Ennis y cols., que analiza la inducción de CTLs en respuesta a la infección con virus Dengue en un modelo murino y donde se encontraron linfocitos T CD4<sup>+</sup> que generan actividad citolítica contra la proteína NS1 y otras proteínas [84,85]. Estos resultados sugieren que el péptido fusogénico también ayudó a incrementar la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Cuando se analizaron las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN  $\gamma$  en respuesta al estímulo con PNS3 y virus Dengue, se observó que el grupo L-STNP presentó mayores porcentajes comparándolo con los demás grupos incluso el control positivo con virus Dengue. Éstos resultados sugieren la funcionalidad del sistema de péptidos fusogénicos para incrementar significativamente el porcentaje de células productoras de IFN  $\gamma$  en respuesta al antígeno específico y este evento se ve favorecido cuando se libera el péptido fusogénico de la superficie bacteriana como ocurre en los ratones inmunizados con la Salmonella recombinante L-SNTP.

Nuestro trabajo demuestra que el sistema de péptidos fusogénicos acoplados a un epitopo de interés y secretados de la superficie bacteriana a través del autotransportador MisL ayuda en el aumento de la respuesta citotóxica mediada tanto por linfocitos T CD4<sup>+</sup> como linfocitos T CD8<sup>+</sup>. De igual manera confirma que la medición de IFN  $\gamma$  correlaciona con la actividad citotóxica medida por ensayos de liberación de Cromo [82].

## XI. CONCLUSIONES

La respuesta inmune inducida contra el epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue fue mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y por linfocitos T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN  $\gamma$ .

La respuesta inmune antígeno específica mediada por linfocitos T fue mejor cuando se liberó el péptido fusogénico acoplado al epitopo NS3<sub>298-306</sub> del virus Dengue según se demostró con la cepa de *Salmonella enterica* recombinante que expresa la proteína L-STNP.

La medición de células productoras de IFN  $\gamma$  correlaciona con la actividad citotóxica revelada en los ensayos convencionales de liberación de Cromo.

## **XI. PERSPECTIVAS**

Se requiere conocer si la respuesta inmune inducida por la *Salmonella enterica* que expresa y libera el epitopo de Dengue unido al péptido fusogénico, protege al ratón de la infección con el virus Dengue.

Se requiere evaluar si el sistema de péptidos fusogénicos acoplados a péptidos antigénicos y secretados de la superficie bacteriana a través del autotransportador MisL, es útil para inducir respuesta inmune humoral antígeno específica.

### XIII. REFERENCIAS.

- [1] Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of Salmonella-based vaccination strategies. *Methods* 2006;38(2):133-43.
- [2] Levine MM, Sztein MB. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat.Immunol.* 2004;5(5):460-4.
- [3] Finlay BB, Falkow S. Salmonella as an intracellular parasite. *Mol.Microbiol.* 1989;3(12):1833-41.
- [4] Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated Salmonella: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol.Rev.* 1999;171:5-26.
- [5] Reimann J, Schirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol.Rev.* 1999;172:131-52.
- [6] Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J.Immunol.* 1995;154(10):5071-9.
- [7] Bhardwaj N, Young JW, Nisanian AJ, Baggers J, Steinman RM. Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J.Exp.Med.* 1993;178(2):633-42.
- [8] Bhardwaj N. Processing and presentation of antigens by dendritic cells: implications for vaccines. *Trends Mol.Med.* 2001;7(9):388-94.
- [9] Overath P, Aebischer T. Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitol.Today* 1999;15(8):325-32.
- [10] Wick MJ, Ljunggren HG. Processing of bacterial antigens for peptide presentation on MHC class I molecules. *Immunol.Rev.* 1999;172:153-62.
- [11] Hoiseth SK, Stocker BA. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981;291(5812):238-9.
- [12] Gonzalez C, Hone D, Noriega FR, et al. Salmonella typhi vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J.Infect.Dis.* 1994;169(4):927-31.
- [13] Gonzalez CR, Noriega FR, Huerta S, et al. Immunogenicity of a Salmonella typhi CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of Leishmania mexicana mexicana. *Vaccine* 1998;16(9-10):1043-52.
- [14] Patterson Y. Intracellular bacterial vaccine vectors: immunology, cell biology and genetics. Hone DM, Shata MT Pascual DW Lewis GK. Mucosal vaccination with Salmonella vaccine vectors. 171-222. 1999. London, John Wiley and Sons.
- [15] Atkins HS, Morton M, Griffin KF, Stokes MG, Nataro JP, Titball RW. Recombinant Salmonella vaccines for biodefence. *Vaccine* 2006;24(15):2710-7.

- [16] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998;6(9):370-8.
- [17] Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect.Immun.* 2001;69(3):1231-43.
- [18] Veiga E, Sugawara E, Nikaido H, de L, V, Fernandez LA. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J.* 2002;21(9):2122-31.
- [19] Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. The autotransporter secretion system. *Res.Microbiol.* 2004;155(2):53-60.
- [20] Maurer J, Jose J, Meyer TF. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 1997;179(3):794-804.
- [21] Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF. Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J.Bacteriol.* 2000;182(13):3726-33.
- [22] Klauser T, Kramer J, Otzelberger K, Pohlner J, Meyer TF. Characterization of the *Neisseria lga* beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J.Mol.Biol.* 1993;234(3):579-93.
- [23] Ruiz-Perez F, Leon-Kempis R, Santiago-Machuca A, et al. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect.Immun.* 2002;70(7):3611-20.
- [24] Osorio Leon Juan Francisco. Caracterización molecular del tamaño mínimo esencial funcional del dominio del autotransportador ShdA. 2005. Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología., Universidad Simón Bolívar.
- [25] Ruiz-Olvera P, Ruiz-Perez F, Sepulveda NV, et al. Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid* 2003;50(1):12-27.
- [26] Pompa-Mera EN. Construcción y evaluación de una cepa vacunal de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que expresa en su superficie un antígeno de *T. spiralis*. Tesis de Maestría. 2006. México D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.
- [27] Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, Meyer TF, Aebischer T. Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect.Immun.* 2003;71(11):6320-8.
- [28] Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect.Immun.* 2003;71(4):1944-52.
- [29] Shams H, Poblete F, Russmann H, Galan JE, Donis RO. Induction of specific CD8+ memory T cells and long lasting protection following immunization with *Salmonella*

typhimurium expressing a lymphocytic choriomeningitis MHC class I-restricted epitope. *Vaccine* 2001;20(3-4):577-85.

[30] Medina E, Paglia P, Rohde M, Colombo MP, Guzman CA. Modulation of host immune responses stimulated by Salmonella vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur.J.Immunol.* 2000;30(3):768-77.

[31] Medina E, Guzman CA, Staendner LH, Colombo MP, Paglia P. Salmonella vaccine carrier strains: effective delivery system to trigger anti-tumor immunity by oral route. *Eur.J.Immunol.* 1999;29(2):693-9.

[32] Cong H, Gu QM, Jiang Y, et al. Oral immunization with a live recombinant attenuated Salmonella typhimurium protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2005;27(1-2):29-35.

[33] Karpenko LI, Nekrasova NA, Ilyichev AA, et al. Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. *Vaccine* 2004;22(13-14):1692-9.

[34] Cochlovius B, Stassar MJ, Schreurs MW, Benner A, Adema GJ. Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. *Immunol.Lett.* 2002;80(2):89-96.

[35] Wedemeyer H, Gagneten S, Davis A, Bartenschlager R, Feinstone S, Rehermann B. Oral immunization with HCV-NS3-transformed Salmonella: induction of HCV-specific CTL in a transgenic mouse model. *Gastroenterology* 2001;121(5):1158-66.

[36] Bachtiar EW, Sheng KC, Fifis T, et al. Delivery of a heterologous antigen by a registered Salmonella vaccine (STM1). *FEMS Microbiol.Lett.* 2003;227(2):211-7.

[37] Hess J, Gentshev I, Miko D, et al. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant Salmonella vaccine induced protection against listeriosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93(4):1458-63.

[38] Russmann H, Igwe EI, Sauer J, Hardt WD, Bubert A, Geginat G. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J.Immunol.* 2001;167(1):357-65.

[39] Igwe EI, Geginat G, Russmann H. Concomitant cytosolic delivery of two immunodominant listerial antigens by Salmonella enterica serovar typhimurium confers superior protection against murine listeriosis. *Infect.Immun.* 2002;70(12):7114-9.

[40] Evans DT, Chen LM, Gillis J, et al. Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the Salmonella type III secretion antigen delivery system. *J.Virol.* 2003;77(4):2400-9.

[41] Panthel K, Meinel KM, Domenech VE, et al. Salmonella pathogenicity island 2-mediated overexpression of chimeric SspH2 proteins for simultaneous induction of antigen-specific CD4 and CD8 T cells. *Infect.Immun.* 2005;73(1):334-41.

- [42] Groothuis TA, Neefjes J. The many roads to cross-presentation. *J.Exp.Med.* 2005;202(10):1313-8.
- [43] Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 2005;434(7029):83-8.
- [44] Gromme M, Uytdehaag FG, Janssen H, et al. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96(18):10326-31.
- [45] Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003;425(6956):397-402.
- [46] Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 2003;425(6956):402-6.
- [47] Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100(22):12889-94.
- [48] Wolkers MC, Brouwenstijn N, Bakker AH, Toebes M, Schumacher TN. Antigen bias in T cell cross-priming. *Science* 2004;304(5675):1314-7.
- [49] Chen L, Jondal M. Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 2004;34(4):952-60.
- [50] Rusmann H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galan JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* 1998;281(5376):565-8.
- [51] Chen W, Masterman KA, Basta S, et al. Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur.J.Immunol.* 2004;34(1):194-9.
- [52] den Haan JM, Bevan MJ. Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr.Opin.Immunol.* 2001;13(4):437-41.
- [53] Moron G, Dadaglio G, Leclerc C. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol.* 2004;25(2):92-7.
- [54] Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv.Immunol.* 1999;73:1-77.
- [55] Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol.Rev.* 2005;207:166-83.
- [56] Dubovskii PV, Li H, Takahashi S, Arseniev AS, Akasaka K. Structure of an analog of fusion peptide from hemagglutinin. *Protein Sci.* 2000;9(4):786-98.

- [57] Lear JD, DeGrado WF. Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH<sub>2</sub> terminus of influenza HA-2. *J.Biol.Chem.* 1987;262(14):6500-5.
- [58] Wharton SA, Martin SR, Ruigrok RW, Skehel JJ, Wiley DC. Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J.Gen.Virol.* 1988;69 ( Pt 8):1847-57.
- [59] Durrer P, Galli C, Hoenke S, et al. H<sup>+</sup>-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *J.Biol.Chem.* 1996;271(23):13417-21.
- [60] Haynes BF, Arthur LO, Frost P, et al. Conversion of an immunogenic human immunodeficiency virus (HIV) envelope synthetic peptide to a tolerogen in chimpanzees by the fusogenic domain of HIV gp41 envelope protein. *J.Exp.Med.* 1993;177(3):717-27.
- [61] Delahunty MD, Rhee I, Freed EO, Bonifacino JS. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* 1996;218(1):94-102.
- [62] Pereira FB, Goni FM, Muga A, Nieva JL. Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects. *Biophys.J.* 1997;73(4):1977-86.
- [63] Suarez T, Gallaher WR, Agirre A, Goni FM, Nieva JL. Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. *J.Virol.* 2000;74(17):8038-47.
- [64] Peisajovich SG, Epand RF, Pritsker M, Shai Y, Epand RM. The polar region consecutive to the HIV fusion peptide participates in membrane fusion. *Biochemistry* 2000;39(7):1826-33.
- [65] Rodriguez-Crespo I, Gomez-Gutierrez J, Nieto M, Peterson DL, Gavilanes F. Prediction of a putative fusion peptide in the S protein of hepatitis B virus. *J.Gen.Virol.* 1994;75 ( Pt 3):637-9.
- [66] Rodriguez-Crespo I, Nunez E, Yelamos B, et al. Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site. *Virology* 1999;261(1):133-42.
- [67] Horth M, Lambrecht B, Khim MC, et al. Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* 1991;10(10):2747-55.
- [68] Bosch ML, Earl PL, Fargnoli K, et al. Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science* 1989;244(4905):694-7.
- [69] Martin I, Defrise-Quertain F, Mandieau V, et al. Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH<sub>2</sub> terminal domain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991;175(3):872-9.
- [70] Schanck A, Peuvot J, Brasseur R. Influence of the mode of insertion of SIV peptides into membranes on the structure of model membrane as studied by <sup>31</sup>P NMR. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;250(1):12-4.

[71] Ghosh JK, Peisajovich SG, Shai Y. Sendai virus internal fusion peptide: structural and functional characterization and a plausible mode of viral entry inhibition. *Biochemistry* 2000;39(38):11581-92.

[72] Hsu CH, Wu SH, Chang DK, Chen C. Structural characterizations of fusion peptide analogs of influenza virus hemagglutinin. Implication of the necessity of a helix-hinge-helix motif in fusion activity. *J.Biol.Chem.* 2002;277(25):22725-33.

[73] Watabe A, Yamaguchi T, Kawanishi T, et al. Target-cell specificity of fusogenic liposomes: membrane fusion-mediated macromolecule delivery into human blood mononuclear cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1999;1416(1-2):339-48.

[74] Nakanishi T, Hayashi A, Kunisawa J, et al. Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway. *Eur.J.Immunol.* 2000;30(6):1740-7.

[75] Partidos CD, Vohra P, Steward MW. Priming of measles virus-specific CTL responses after immunization with a CTL epitope linked to a fusogenic peptide. *Virology* 1996;215(1):107-10.

[76] Bongartz JP, Aubertin AM, Milhaud PG, Lebleu B. Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4681-8.

[77] Laus R, Graddis TJ, Hakim I, Vidovic D. Enhanced major histocompatibility complex class I-dependent presentation of antigens modified with cationic and fusogenic peptides. *Nat.Biotechnol.* 2000;18(12):1269-72.

[78] Luría-Pérez R. Expresión de epitopos y péptidos fusogénicos en la superficie de enterobacterias empleando MisL como autotransportador. (Tesis de maestría.). 2002. México. D.F., CINVESTAV-IPN.

[79] Luría-Pérez R. Aumento en la expresión de antígenos dependiente de MHC clase I empleando una *Salmonella* que expresa péptidos fusogénicos. (Tesis de doctorado). 2007. México. D.F., CINVESTAV-IPN.

[80] Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J.Immunol.* 2002;168(2):834-8.

[81] Kate Schroder (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions

[82] Horton, Helen; Russell, Nina; Moore, Erin; Frank, Ian; Baydo, Ruth; Havenar-Daughton, Colin; Lee, Deborah; Deers, Marck; Weinhold, Kent McElrath Juliana. Correlation between Interferon g Secretion and Cytotoxicity in Virus-Specific Memory T Cells. *J. of Infectious Diseases* 2004 190, 9, 1692-1696.

[83]Dobaño, Carlota; Widera, Georg; Rsbussay, Dietmar; Doolan, Denise. Enhancement of antibody and cellular immune response to malaria DNA vaccines by *in vivo* electroporation. *Vaccine* 2007 25 6635-6645.

[84] Rothman, Alan, Kurane, Ichiro, Ennis, Francis. Multiple specificities in the Murine CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-Cell response to Dengue Virus. *J. of Virology* 1996; 70(10):6540-6546.

[85] Rothman, Alan. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J. of Clinical Investigation* 2004; 113(7):946-951.

[86] Sapaulding AC, Kurane I, Ennis FA, Rothman AL. Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. *J. of Virology* 1999; 73(1):398-403.

A tí, mi Dios  
Gal 3 :14-20, 6 :14

*Ad maiorem Dei gloria et B. honor Mariae Stma.*

*Tanquam ignoti et quasi occulti in hoc mundo*

*Societatis Mariae*

## **Dedicatorias:**

A mi familia, gracias por todos los momentos de apoyo que me han brindado hasta ahora.

A mis amigos, mi familia extendida, nunca hay nombres porque como siempre sus acciones son anónimas y aún así me impulsan a seguir creciendo.

A mis hermanos de la Sociedad de María porque con ustedes creo en la hermandad aún en nuestros días; a mis hermanos de la Compañía de Jesús que tantas enseñanzas sobre la vida me han mostrado, a mis hermanos Salesianos que demuestran que en la felicidad se encuentra la gracia y finalmente a todos los santos que he encontrado en el camino.

A las comunidades en condiciones desfavorecidas por nuestras culpas, sobre todo a Cihuateo y Tepeixco en Koskatlán de los Reyes Veracruz.

Al grupo Kerygma que gracias a ellos encontré el camino.

Al grupo Alpino porque la hermandad compartida llega hasta confiar tu vida plenamente.

A las comunidades porque sin ustedes éste camino seguramente no existiría.

## **Agradecimientos:**

Al Dr. Rosendo Luría Pérez: Por el asesoramiento, revisión y dirección de éste trabajo.

A la Dra. Rosa Isela Carbajal de Nova: Por el asesoramiento y revisión de éste trabajo

Al Dr. Germán Flores Gutiérrez: Por el asesoramiento y revisión de éste trabajo.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón: Por la revisión de éste trabajo.

A la Dra. Margarita Ivonne Garrido Gutiérrez: Por la revisión de éste trabajo.

A la M. en C. Paola Berenice Zárate Segura: Por la revisión de éste trabajo.

## **Agradecimientos:**

Agradezco al Dr. Rosendo Luría por todo el tiempo, disposición, ayuda y apoyo brindado a lo largo de éste proyecto.

Agradezco a la M. en C. Paola Zárate por todo el apoyo brindado durante todo éste tiempo, las facilidades y ayuda cada vez que fue necesaria.

Agradezco a la Dra. Rosa Isela Carbajal por todos los consejos y ayuda mostrada cada vez que fue necesaria.

Agradezco al Dr. Germán Gutiérrez por la disposición, tiempo y ayuda mostrada para éste trabajo.

Agradezco a los integrantes del laboratorio de la Dra. Leticia Cedillo Barrón por todas las facilidades prestadas para la realización de éste trabajo. Muy en especial agradezco a Cyn, Jazz, Julio, Ángel y don Pedro que me han apoyado plenamente y ayudado cuando fue necesario.

Agradezco a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología por las facilidades prestadas para la realización de éste trabajo. En especial agradezco a Alice, Erika, Berna, Miriam y al Dr. César Raúl González Bonilla.

Agradezco a la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas por la asistencia técnica para la realización de éste trabajo. En especial a Lupita, Arca, Guille, Dany, Grace, Ángeles, el Señor Heriberto, la Señora Ana, la señora Magos, a la Dra. Sara y al Dr. Rosendo.

## **Agradecimientos:**

A ti mi Dios, porque sólo contigo hace sentido la vida.

A mi familia por todo el apoyo durante éste tiempo, muy en especial a mis padres que me han brindado todo el apoyo posible y a mi hermano que ha confiado en mí; muchísimas gracias por todo lo que hacen por mí.

A mis amigos porque cada uno es una parte más de mi familia que ha creído en mí y me han ayudado a superarme poco a poco. Por todas sus obras y acciones, por los mejores momentos de la vida gracias por estar siempre disponibles para mí.

A la sociedad de María porque con ustedes pude conocer lo que es ser pleno y la hermandad; gracias al CPP y sus grupos que me han ayudado a crecer como nunca, gracias al CPU porque hacen que la hermandad sea posible aún en la distancia; a las diferentes comunidades maristas doy gracias por todos los momentos compartidos y la hermandad forjada.

Gracias a las comunidades indígenas de Koskatlán de los Reyes, Veracruz, porque con ustedes el Reino en verdad es posible, gracias por toda su entrega; por hacernos ver la obra de Dios.

Gracias al grupo Kerygma que con un momento compartido fue posible cambiar el rumbo de una vida para corregir el camino y hacer posible toda una vida y las comunidades, que hicieron posible mi crecimiento.

Gracias al grupo Alpino Pax porque me han enseñado lo valioso de tener una vida en las manos y más aún la hermandad en cualquier circunstancia.

A todos mis formadores a lo largo de éste camino, gracias a todos y cada uno de ustedes porque sin sus conocimientos nunca hubiera llegado hasta dónde estoy.

Finalmente a todos los que han creído en mí, éste trabajo no es sólo mío, éste triunfo es compartido.