



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR INDUCIDA *in vitro* POR EL PLÁSMIDO *rOmpB-24* CANDIDATO A VACUNA CONTRA *Rickettsia* EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANAS.

Tesis presentada por:

QFB. JAVIER BENJAMÍN BALAM ROMERO

En opción al grado de:

MAESTRO EN INVESTIGACIÓN EN SALUD

Directora de Tesis:

DRA. KARLA ROSSANET DZUL ROSADO

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO, ENERO DEL 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR INDUCIDA *in vitro* POR EL PLÁSMIDO *rOmpB-24* CANDIDATO A VACUNA CONTRA *Rickettsia* EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANAS.

Tesis presentada por:

QFB. JAVIER BENJAMÍN BALAM ROMERO

En opción al grado de:

MAESTRO EN INVESTIGACIÓN EN SALUD

Directora de Tesis:

DRA. KARLA ROSSANET DZUL ROSADO

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO, ENERO DEL 2019

OFICIO EMITIDO POR PICS

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **Dra. Karla Rossanet Dzul Rosado**, quien me ha apoyado incansablemente, me ha enseñado y forjado en mí una base para crecer como investigador en el área de la salud. Nunca podré pagarle lo mucho que ha hecho por mí. Pido a Dios que le bendiga siempre.

Al **Dr. Cesar I. Lugo Caballero** por todas sus valiosas enseñanzas, por todo su apoyo incondicional durante los días difíciles, y sobre todo por su paciencia. Mi humilde aprecio, respeto y cariño hacia usted.

A los doctores **Gaspar Peniche Lara, Miguel Rosado Vallado, Gilma Sanchez Burgos** y **Ana Lí Rosado Arroyo** por sus valiosos consejos, paciencia y experiencia.

A la **Dra Norma Pérez Herrera** por brindarme su apoyo y experiencia, y sobre todo por toda la confianza que puso en mí siendo una de las piedras angulares en mi formación como maestro en investigación en salud.

Al **Dr. Fernando I. Puerto Manzano** por permitirme una vez más generar productos académicos portando la bandera del Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes y a quien admiro y estimo mucho.

Al personal académico, administrativo, técnico, manual y becario del **Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi** quienes contribuyeron directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.

DEDICATORIA

A **Dios**, ante todo, por colaborar a mi lado siempre en la elaboración de ese trabajo en buenas y malas y por darme la humildad de reconocer que la ciencia también es apostolado que debe ser siempre puesto al servicio de los demás. A Él pido por las personas que sufren o han sufrido alguna enfermedad, en especial las Rickettsiosis.

A la **sold. QFB. Noriko Delgado Ontiveros** a quien amo, respeto y admiro, por no dejarme caer durante las malas, aconsejarme en las buenas y llenarme de amor en todas. Pido a Dios que nunca dejes de estar ahí. Te amo.

A mis padres **Verónica Beatriz Romero Novelo** y **Javier Arturo Balam Galera**, quienes, desde pequeño, en la humildad de nuestra familia, me inculcaron los mejores valores humanos y apostaron por mí con mucho cariño, de mí para ustedes, una pequeña muestra de que nunca les voy a fallar.

A mi hermana **Aracely Beatriz Balam Romero**, quien empieza a incursionar en el área de la ciencia y que ahora es una mujer nueva. Ya sabes qué hacer cuando alguien te pregunte: ¿Y sí vas a poder?

A mi familia en general y a mi abuela **QEPD. Martha Irene Novelo López** quienes siempre han creído en mí y me han apoyado para crecer profesionalmente a lo largo de mi vida.

A todas las personas que han muerto por causa de las Rickettsiosis, espero este trabajo sirva de aporte para la búsqueda de una pronta vacuna contra estas y otras enfermedades.

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Unidad Biomédica, de la Universidad Autónoma de Yucatán.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
Rickettsiosis y sus manifestaciones clínicas.....	5
Epidemiología de las rickettsiosis.	6
Patogenia y evasión de la respuesta inmune.....	7
Respuesta inmune innata y TLR´s.	9
Respuesta inmune adaptativa.....	11
Vacunas anti-rickettsia.	13
OMPA, OMPB como candidatos a vacunas.....	14
El plásmido <i>rOmpB-24</i> como candidato a vacuna	15
IV. OBJETIVOS	21
Objetivo general.	21
Objetivos específicos.	21
V. HIPÓTESIS	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
a) Tipo y diseño de Estudio.....	23
b) Universo.	23
c) Muestra.	23
d) Variables y escalas de medición.....	23
e) Criterios de Inclusión.....	24
f) Criterios de Exclusión.	24
g) Criterios de Eliminación.	24
h) Fuentes de recolección de la información.....	24
i) Esquema Metodológico.....	25
j) Metodología.....	26

Obtención de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP).....	26
Digestión enzimática del vector <i>pVAX</i>	26
Construcción del plásmido <i>pVAX-GFP5</i>	27
Obtención de células competentes.....	27
Transformación de células competentes.....	27
Extracción del plásmido por lisis alcalina.....	28
Verificación del Inserto GFP.....	28
Transferencia de la secuencia GFP al plásmido <i>rOmpB-24</i>	29
Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica Humanas (CMSP) por gradientes de centrifugación de Ficoll.....	30
Aislamiento de monocitos y linfocitos por gradiente de centrifugación con Percoll.....	31
Obtención de macrófagos mediante estímulos con Acetatos de Phorbol.....	31
Transfección de macrófagos con los plásmidos <i>pVAX-GFP5</i> y <i>rOmpB-24GFP</i>	31
Extracción de RNA.....	32
Transcripción Reversa.....	32
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
Co-cultivo de macrófagos transfectados con linfocitos.....	33
Marcaje de superficie y Análisis por Citometría de flujo.....	34
Detección de los alelos de HLA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.....	34
Tinción de Linfocitos y marcaje extracelular.....	35
Marcaje intracelular y Análisis por Citometría de flujo.....	36
VII. RESULTADOS.....	37
Construcción de los plásmidos <i>pVAX-GFP5</i> y <i>rOmpB-24GFP</i>	37
Evaluación del sistema de transfección por microscopia de fluorescencia....	39

Fenotipificación de las moléculas de HLA clase I y clase II en macrófagos CD40+ y CD80+.....	41
Análisis proliferativo de linfocitos T.....	48
Análisis de poblaciones de linfocitos productores de IFN- γ	49
Caracterización de alelos de HLA.....	51
VIII. DISCUSIÓN.....	53
IX. CONCLUSIONES.....	53
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
XI. ANEXOS.....	62
Anexo 1. Aprobación del comité de bioética.....	62
Anexo 2. Carta de Consentimiento Informado.....	63

I. RESUMEN

Introducción: Las rickettsiosis han sido catalogadas como un problema de salud pública en México y América Latina mientras las muertes por estas enfermedades van en aumento cada año. En la actualidad el desarrollo de vacunas anti-rickettsia genera la necesidad de plantear nuevas estrategias para la selección y evaluación de antígenos. La naturaleza de los antígenos de rickettsiales que generan respuestas de tipo humoral y celular ha sido el sujeto de investigaciones dirigidas al desarrollo de una vacuna basado en la vacunología tradicional. Han sido evaluados antígenos de superficie celular mediando respuestas por linfocitos T para *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*), sin embargo, estos se han limitado a evaluaciones en modelos animales con resultados de protección parcial y memoria inmunológica a corto plazo, todo esto apoyado en la vacunología tradicional. La estrategia propuesta en este trabajo, permite evaluar un plásmido que contienen ADN de la bacteria *R. rickettsii* seleccionado por vacunología reversa, en un sistema autólogo de células mononucleares de sangre periférica humanas y estudiar la respuesta celular que este plásmido induce.

Hipótesis: El plásmido *rOmpB-24* induce *in vitro* un efecto proliferativo y estimula la producción de interferón gamma (IFN- γ) en linfocitos CD4 y CD8 provenientes de pacientes con diagnóstico positivo a *Rickettsia* comparable con linfocitos de sujetos con diagnóstico negativo a *Rickettsia*.

Objetivo: Analizar la respuesta inmune celular inducida por el plásmido *rOmpB-24* candidato a vacuna contra bacterias del género *Rickettsia* en células mononucleares de sangre periférica humanas de pacientes con diagnóstico positivo a *Rickettsia* y de sujetos con diagnóstico negativo

Métodos: A partir de los plásmidos *rOmpB-24*, *pVAX1* y *pEGFP-N1* se sintetizaron los plásmidos *pVAX-GFP5* y *rOmpB-24GFP* los cuales fueron transfectados en macrófagos, se evaluó la expresión de la proteína rickettsial mediante fluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa retrotranscrita (RT-PCR, por sus siglas en inglés). A partir de células mononucleares de sangre

periférica se realizaron transfecciones de los plásmidos en macrófagos y co-cultivos con linfocitos en los cuales se midió la proliferación linfocítica, activación de macrófagos y expresión de IFN- γ mediante citometría de flujo.

Resultados: Los resultados sugieren que los macrófagos transfectados con el plásmido *rOmpB-24* expresan la proteína rickettsial, la cual es detectable por microscopía de fluorescencia y RT-PCR.

En los macrófagos transfectados se observó un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y en la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, así como la producción de Interferón gamma en linfocitos tanto T CD4+ como en T CD8+. Sin embargo, dado el reducido número de muestras evaluadas, estas diferencias no alcanzaron a ser significativas. Así mismo, no fue posible asociar el tipo de alelo del antígeno leucocitario humano de clase 1 (HLA-I, por sus siglas en inglés) encontrado con la respuesta inmune obtenida.

II. INTRODUCCIÓN

En México y América Latina las rickettsiosis se han vuelto un problema de salud pública, ya que son enfermedades, cuyo diagnóstico y tratamiento suele ser tardío u equívoco por lo que los casos muchas veces culminan en la muerte del paciente. Ante la creciente necesidad de combatir estas enfermedades, muchos estudios han surgido para la elaboración de vacunas que permitan disminuir el número de casos por estas infecciones. En la actualidad, plásmidos de ADN contenedores de genes de proteínas de membrana rickettsial, prometen una inmunidad efectiva ante las bacterias del género *Rickettsia* ya que son parásitos intracelulares por lo cual necesitan combatirse generando una respuesta inmune de tipo celular. El agente causal de estas enfermedades son las bacterias del género *Rickettsia*. Estas bacterias son parásitos obligados que producen mecanismos de patogenicidad durante la infección que pueden culminar con la muerte del paciente. Es por ello que con el fin de poder tomar medidas preventivas o terapéuticas contra estas enfermedades se han estudiado a profundidad los diversos mecanismos de inmunidad que participan en el control de las rickettsiosis, siendo la más importante la producción de INF- γ por los linfocitos T CD8+ necesarios para la destrucción de las células infectadas.

Durante años se han diseñado y estudiado distintos tipos de vacunas empleando rickettsias muertas o atenuadas, las cuales han aportado protección parcial, escasa, e inclusive letal a quienes les fue aplicada. Sin embargo, gracias a los avances en la biotecnología, se han encontrado algunas proteínas antigénicas de las bacterias del género *Rickettsia* como son OMPA y OMPB que prometen resultados confiables en la defensa contra las rickettsiosis.

Una de las metas preventivas para las rickettsiosis es el desarrollo de vacunas de ADN, empleando modelos animales para probar su efectividad en una fase preclínica, lo cual ha dado resultados muy prometedores. Sin embargo, una alternativa intermedia para evaluar el desarrollo de nuevas vacunas, puede ser el uso de co-cultivos *in vitro* de células mononucleares de pacientes para analizar la inmunogenicidad de proteínas antigénicas, lo cual promete ser una estrategia

de mayor proximidad a los estudios *in vivo* para comprender la inmunomodulación producida en los humanos por candidatos a vacunas.

III. ANTECEDENTES

Rickettsiosis y sus manifestaciones clínicas.

Las Rickettsiosis son enfermedades zoonóticas febriles causadas por alfaproteobacterias del género *Rickettsia* y transmitidas por vectores ectoparásitos hematófagos (garrapatas, piojos, pulgas y ácaros). Se caracterizan por sus manifestaciones clínicas que van desde una simple fiebre a la letalidad según la especie bacteriana implicada en la infección, la predisposición del paciente y la atención médica oportuna.¹ Las bacterias del género *Rickettsia* se clasifican en cuatro grandes grupos: el grupo ancestral conformado por *Rickettsia belli* (*R. belli*) y *R. canadensis*, el grupo de las fiebres tíficas (*R. typhi* y *R. prowazekii*), el grupo de las fiebres manchadas (*R. rickettsii*, *R. parkerii* y *R. conorii*) y el grupo transicional (*R. akari*, *R. australis* y *R. felis*). Las fiebres manchadas comunmente son transmitidas por garrapatas duras de los géneros *Rhipicephalus spp.*, *Amblyomma spp.*, entre otras.^{2,3} La infección en humanos generalmente presenta síntomas característicos que suelen ser cefaleas acompañadas de mialgias e insomnio, vómitos recurrentes y dolor abdominal. Entre sus signos están las temperaturas mayores a los 39°C, edema en el dorso y las extremidades, exantema y rash maculopapular, distensión abdominal, esplenomegalia, hepatomegalia e hipotensión. En ocasiones aparece una escara en la zona de la picadura de la garrapata. En las pruebas de laboratorio suele presentarse trombocitopenia (signo similar al de otras patologías comunes como el dengue), transaminasas elevadas, hipoalbuminemia y un incremento de la creatinfosfoquinasa (CPK). En el líquido cefalorraquídeo aparecen los monocitos y la pleocitosis así como un incremento en la concentración de proteínas. Este tipo de rickettsiosis se caracteriza por producir una bacteriemia en los pacientes alterando así su sistema inmune. Se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, el incremento en la carga bacteriana en el paciente regula de forma negativa la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) necesarias para la depuración de las bacterias del género *Rickettsia*, de tal forma que la enfermedad se desarrolla llevando al paciente a la muerte si no es atendido a

tiempo.³⁻⁶ En una clasificación más común, el tifus murino es causado por *R. typhi* y es transmitido por pulgas de la rata del género *Xenopsylla spp.* y pulgas del gato del género *Ctenocephalides spp.* Estas pulgas se infectan al picar al reservorio (rata o gato) infectados y pueden transmitirse al patógeno por vía transovárica. La transmisión al humano se manifiesta posterior a ser picado por pulgas y rascarse en la zona inoculando así las heces infectadas depositadas durante la alimentación del hematófago. La incubación va de una a dos semanas apareciendo fiebres superiores a los 38°C, escalofríos, cefaleas, náuseas, y en algunos casos causa estupor, convulsiones y ataxia focalizada. Es muy rara la aparición de erupción cutánea, rash, y es característico el exantema en extremidades de corta duración. El paciente puede recuperarse en dos semanas, pero con terapia antibiótica, en menos de 5 días. El tifus epidémico es causado por *R. prowazekii* y se le considera como la rickettsiosis más antigua de todas debido a su transmisión a través de piojos humanos. Ha sido históricamente referenciada en epidemias por piojos, lo cual convierte al humano en su reservorio principal. Esta bacteria, a diferencia de las demás bacterias del género *Rickettsia*, no se transmite por vía transovárica en los piojos y sus manifestaciones clínicas son similares a las del tifus murino, sin embargo, difieren en el tiempo de evolución que es de dos a tres semanas. *R. prowazekii* tiene la propiedad de almacenarse en tejido adiposo o en algunos órganos como el hígado por lo que puede volver a activarse y proliferar manifestando síntomas clínicos más leves (enfermedad de Brill-Zinsser).³⁻⁵

Epidemiología de las rickettsiosis.

La letalidad de estas infecciones es considerada multifactorial, destacando su ineficaz atención médica y el tratamiento tardío. Los pacientes que padecen rickettsiosis pueden presentar síntomas similares al dengue como son las fiebres, dolor de huesos y abdomen, rash, y la plaquetopenia. En la mayoría de los casos, los pacientes fallecen por una mala atención médica prestada por los servicios de salud debido a la deficiente preparación del personal para tratar la

enfermedad, la carencia de equipos necesarios para su diagnóstico clínico específico como termocicladores o antígenos para inmunofluorescencia indirecta (IFI), o inclusive una terapia inadecuada, ya que los pacientes requieren un tratamiento antibiótico específico como la doxiciclina o el cloranfenicol debido al carácter intracelular de las bacterias del género *Rickettsia*.⁷

México es uno de los países en América Latina más afectados por los frecuentes casos confirmados y sus casos fatales. De acuerdo a las cifras del Centro Nacional de Programas Preventivos y control de Enfermedades (CENAPRECE) existe un registro en México de 9396 casos confirmados en un período comprendido entre el 2005 y el 2014 de los cuales 151 casos fueron defunciones causadas por fiebres manchadas. Cerca del 90% de los casos confirmados en ese período son infecciones atribuidas a la bacteria *R. rickettsii* y se focalizan en el norte del país, mientras que el resto se asocia a otras especies de bacterias del género *Rickettsia*. El incremento de los casos positivos en la región ha despertado la alarma por lo que desde el 4 de abril del 2015 se declaró “emergencia nacional” y se iniciaron medidas para combatir el número de casos.⁸ Por otro lado, en el sureste del país, principalmente en Yucatán, un estudio de caracterización clínica de pacientes realizado en el 2014 en el Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, arrojó que 33 de 71 muestras analizadas durante ese mismo año fueron positivas en un 94% para fiebres tíficas y un 6% para fiebres manchadas diagnosticadas por serología y biología molecular, resultados contrastantes con el norte del país donde las infecciones más recurrentes son las fiebres manchadas. De este estudio se demostró que la población más afectada es la urbana (64%) en relación con la rural (36%) y las principales manifestaciones clínicas fueron fiebre, exantemas, mialgias, artralgias y cefalea.⁹

Patogenia y evasión de la respuesta inmune.

Las células blanco de estas bacterias son preferentemente las pertenecientes al endotelio vascular (aunque también infectan monocitos) debido a la presencia de

un receptor celular conocido como Ku70 quien juega un rol importante en la patogenicidad de las bacterias del género *Rickettsia*. Las condiciones intracelulares de la bacteria llevan a la destrucción del endotelio vascular justificando la vasculitis en pacientes graves y edema a nivel sistémico. Las bacterias del género *Rickettsia* están constituidas por una membrana interna y una externa que contiene cerca de 17 antígenos de superficie o sca (siglas del inglés: *surface celular antigen*) de los cuales sobresalen las proteínas sca0 y sca5 conocidas como OmpA (siglas del inglés: *outer membran protein A*) y OmpB respectivamente quienes tienen funciones importantes como la adhesión e invasión a la célula huésped.¹⁰

El mecanismo de invasión a las células huésped es actina-dependiente, inicia con la interacción de OmpA, Adr1 (adhesina rickettsial 1) y Adr2 con sus receptores celulares mientras que OmpB interacciona con la proteína heterodimérica Ku70 presente en la superficie de la célula huésped. Esta unión activa a la ubiquitinligasa (c-Cbl) y tirosinquinazas (FAK) para reclutar ubiquitina y cortactina al dominio intracelular de Ku70.¹¹ Simultáneamente, la activación de las tirosinquinazas p110 y p85 α permitiendo la fosforilación del fosfatidilinositol (IP₂) a inositoltrifosfato (IP₃), la activación del complejo enzimático Arp2/3 y un gradiente de concentración de cationes intracelulares (Ca⁺²) lo cual iniciará la polimerización de actina alrededor del sitio ubiquitinizado endocitando a la bacteria y produciendo el endosoma temprano el cual madura hasta fusionarse con el lisosoma (figura 1). Dentro de la célula, las bacterias del género *Rickettsia* cambian su morfología dejando atrás su forma variante pequeña [small cell variant (SCV)] para formar un bacilo o variante grande [large cell variant (LCV)]. El cambio en la estructura de la bacteria favorece la producción de factores de virulencia mediados por la vía de secreción tipo IV (T4SS) tal es el caso de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), PLD y la hemolisina C que degrada la membrana vesicular del fagolisosma liberando a la bacteria al citoplasma la cual expresa las proteínas de superficie RickA que reclutarán polímeros de actina, esto le confiere motilidad

a la bacteria permitiendo su migración a las células adyacentes (efecto cometa).

12-17

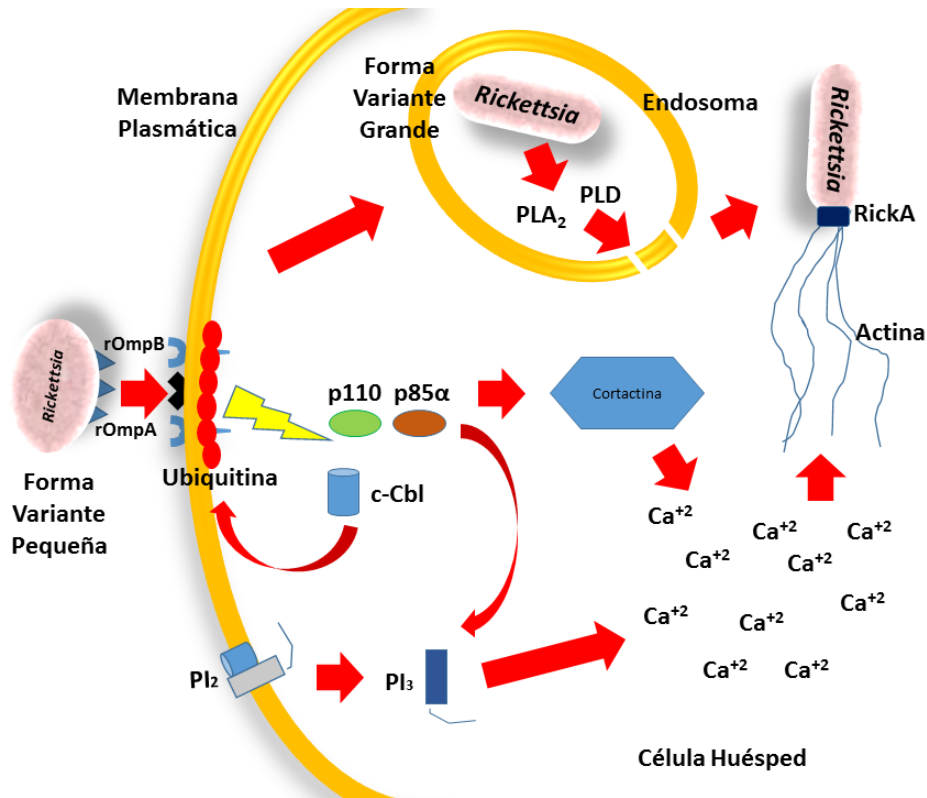


Figura 1. Mecanismo de acoplamiento, entrada e invasión de las bacterias del género *Rickettsia* a la célula huésped. La proteína OmpB se acopla al receptor Ku70 de la célula huésped lo que genera una cascada de señalización que le permite a las bacterias del género *Rickettsia* la invasión celular.

Respuesta inmune innata y TLR's.

A pesar que las bacterias del género *Rickettsia* son patógenos intracelulares de carácter obligatorio, se tiene conocimiento que la respuesta inmune innata se encuentra mediada principalmente por la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) de la bacteria con los receptores tipo Toll (TLR's) de superficie como el TLR2 y el TLR4 en células dendríticas (DC) y linfocitos "Natural Killer" (NK). Las bacterias del género *Rickettsia* al ser gram-negativas, poseen una membrana deficiente en peptidoglicano pero muy rica en lipopolisacárido (LPS). La presencia del LPS en la bacteria favorece que los TLR's tipo 2 y 4 activen la producción de interleucinas inflamatorias e interferones por la vía dependiente de MyD88.¹⁸ Los estudios en ratones de la cepa C3H/HeN

han demostrado que la ausencia en la expresión del TLR4 en mayor medida que el TLR2 en linfocitos NK y DC favorece la infección por *R. conorii*.^{19, 20} Por otro lado, la participación de las células NK y DC en la inmunidad innata no pasa a segundo plano. La interacción TLR/LPS estimula a la producción de interleucinas (IL) inflamatorias como la IL-1 β , IL-8 e IL-6 atrayendo quimiotácticamente a fagocitos como los macrófagos y los neutrófilos al sitio de infección (infiltrados celulares) favoreciendo la depuración de la bacteria. De igual manera, la apoptosis también juega un papel importante y es regulada por las células NK ya que su activación mediada por MyD88 en el dominio intracelular del TLR2 favorece en gran medida la producción de interleucinas apoptóticas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α , por sus siglas en inglés) e IFN- γ el cual activa a los macrófagos en el sitio de infección. Mediante la activación de los fagocitos, la fagocitosis se hace presente mediante las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) y macrófagos. Las bacterias fagocitadas con éxito son degradadas por lisosimas, catepsinas y especies reactivas de oxígeno (RANTES, por sus siglas en inglés). Los productos de la degradación son liberados al lumen celular ocurriendo diversos eventos: por un lado, las proteínas residuales son degradadas a péptidos en el proteosoma posterior a su ubiquitinización y viajan al retículo endoplásmico (ER), ahí son acoplados al sitio de unión de las moléculas principales de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) y viajan a la membrana celular mediante transporte vesicular regulado por el complejo de Golgi, lo cual favorece la transición de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa (vía proteolítica de procesamiento antigénico), por otro lado, el material genético de las rickettsias puede activar el inflammasoma al ser reconocido por los receptores intracelulares tipo NOD (NLR's) induciendo la producción de interleucinas inflamatorias, o puede ser transcrito a ARN mensajero de manera que se expresen péptidos en los ribosomas del ER (figura 2), estos péptidos son acoplados al MHC-I y expresados en la membrana celular (vía citosólica).¹⁸⁻²⁴

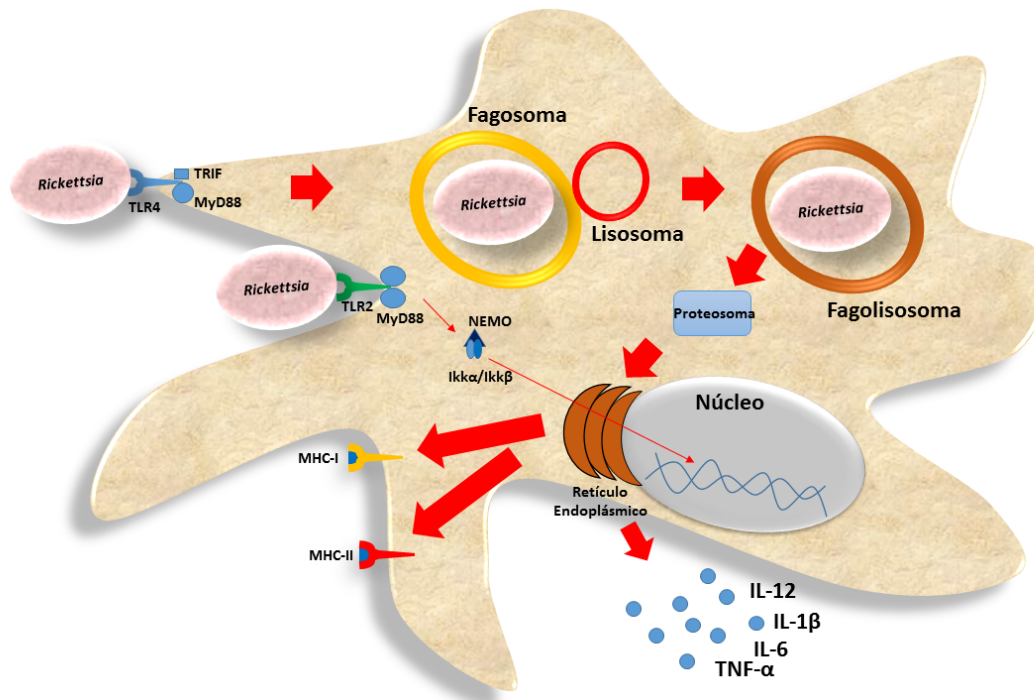


Figura 2. Respuesta inmune innata contra bacterias del género *Rickettsia* mediada por células fagocíticas y presentadoras profesionales. Las bacterias del género *Rickettsia* son degradadas por los fagolisosomas en las células presentadoras de antígeno, esto permite la degradación de sus proteínas para su procesamiento en proteosoma y ensamble en los complejos principales de histocompatibilidad.

Respuesta inmune adaptativa.

El papel de la respuesta inmune adaptativa es quizá el más importante en la eliminación de las bacterias del género *Rickettsia* durante la infección. El carácter intracelular de la bacteria sugiere que la vía de presentación de antígenos más común llevada a cabo por el sistema inmune es la vía citosólica por lo que la activación de los linfocitos T CD8 es la más común, sin embargo, los estudios realizados en ratones han revelado que puede existir una activación de linfocitos T CD4.²⁵ Otros estudios en ratones han demostrado que la activación de los linfocitos es importante en la eliminación de las bacterias del género *Rickettsia* ya que la expresión de moléculas co-estimuladoras solubles como la sCD40 favorece dicha eliminación.²⁶ La presentación del antígeno por el MHC-I y la

interacción ligando/receptor de las moléculas co-estimuladoras activa a los linfocitos T CD8 de modo que estos producen citocinas que favorece su autoproliferación (IL-2, IL-6), así como la activación de células fagocíticas mediante la producción de IFN- γ regulada por IL-12 e IL-10 (producidas por las APC) y promueven la apoptosis mediante la producción de citocinas inflamatorias (IL-6 y TNF- α).²⁷ Por otro lado, la activación de los linfocitos T CD4 induce la diferenciación de linfocitos colaboradores Th1 y Th2 que favorece la producción de IFN- γ (activación de fagocitos) y la activación de linfocitos B mediada por IL-4. La activación de los linfocitos B es T-dependiente en la respuesta inmune contra bacterias del género *Rickettsia*.²⁸ La fagocitosis mediada por los linfocitos B induce la presentación de antígeno a los linfocitos Th2 quienes al reconocer al antígeno en su receptor (TCR) y la interacción ligando/receptor de las moléculas co-estimuladoras activan al linfocito B induciéndolo a la producción de inmunoglobulinas (Ig's) que reconozcan al antígeno presentado proveniente de las bacterias del género *Rickettsia*.^{29, 30} Los estudios en modelos murinos han demostrado que las inmunoglobulinas no son de vital importancia en la eliminación de las bacterias del género *Rickettsia* comparadas con la actividad de los LT CD8+ o los LT Th1, sin embargo, se ha demostrado que su papel es fundamental en la prevención de la interacción OMPB/Ku70 y otros antígenos de adhesión, impidiendo la adhesión de la rickettsia a la superficie de la célula huésped y por ende la invasión a la misma (figura 3).^{31,32}

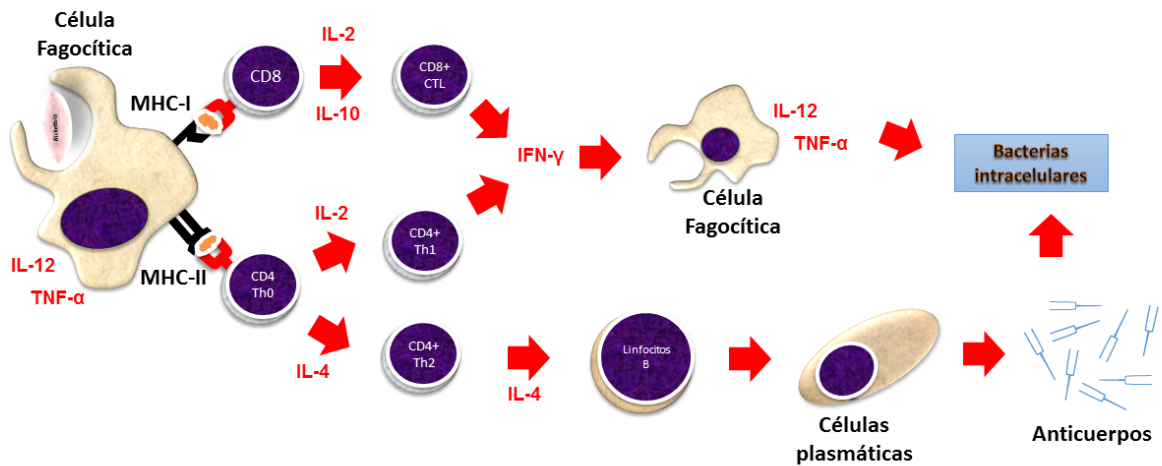


Figura 3. Respuesta inmune adaptativa contra bacterias del género *Rickettsia* mediada por linfocitos T, linfocitos B e inmunidad humoral regulada por citocinas y anticuerpos. La fagocitosis de las bacterias del género *Rickettsia* y la degradación de sus antígenos, permiten una respuesta inmune cruzada tanto del tipo humoral como celular.

Vacunas anti-rickettsia.

Con el paso del tiempo, la búsqueda de alternativas para el control y terapia de las rickettsiosis ha llevado al desarrollo de vacunas que permitan disminuir el número de casos positivos. La complejidad de la bacteria en su patogenia y la respuesta inmune que produce en el hospedero han sido los pilares que han llevado al diseño de vacunas siendo unas más efectivas que otras. En algunos estudios, tanto en humanos como en ratones, se ha demostrado protección parcial contra las fiebres manchadas al emplearse bacterias del género *Rickettsia* muertas o atenuadas como estrategia vacunal, sin embargo, su desventaja es que la carga bacteriana y el compromiso inmune en los pacientes puede producir infecciones en los sujetos de estudio. En otros estudios empleando ratones se han probado lisados de bacterias demostrando de igual manera protección parcial, esto debido a que la crudeza de los antígenos orienta la respuesta inmune hacia la diferenciación de los linfocitos Th2 en lugar de linfocitos Th1 los cuales son los ideales para la eliminación de las bacterias del género *Rickettsia* por su naturaleza intracelular.^{34, 35} De igual manera, los estudios en ratones empleando proteínas recombinantes de las bacterias han demostrado protección

parcial, limitandose a infecciones producidas por unas cuantas especies de bacterias del género *Rickettsia* y en algunos casos los co-adyuvantes han demostrado toxicidad. Por otro lado, los avances en la tecnología del ADN recombinante y la vacunología reversa, han permitido la selección de antígenos candidatos a vacunas que puedan ser construidos en vectores plasmídicos para el desarrollo de vacunas de ADN. Las vacunas de ADN han resultado ser las más prometedoras pues pueden inducir la expresión del antígeno en un sistema eucariota de modo que sea presentado por la ruta citosólica favoreciendo la diferenciación de linfocitos Th1. ³⁶⁻³⁸

OMPA, OMPB como candidatos a vacunas.

Muchos son los antígenos que han sido candidatos para el desarrollo de vacunas contra *Rickettsia*, sin embargo, entre los más importantes destacan las proteínas OMPA, OMPB. La importancia en el empleo de estas proteínas radica en que son los antígenos principales de estos patógenos, es decir, son los antígenos responsables de la adhesión e invasión de las bacterias del género *Rickettsia* a las células del huésped. Por otro lado, estas proteínas tienen la característica de ser altamente conservadas entre las diferentes especies de bacterias del género *Rickettsia*, esta ventaja permitiría una respuesta inmune cruzada, por lo que las vacunas desarrolladas a partir de estas proteínas podrían proteger contra una amplia gama de rickettsiosis. Los estudios en los que se emplearon OMPA recombinante proveniente de *R. rickettsii* han demostrado que confiere protección de infecciones contra su homólogo *R. conorii* en ratones³⁹ Otros estudios empleando recombinantes de OMPA provenientes de *R. heilongjiangensis* demostraron protección de conejillos de indias contra *R. rickettsii* incrementando sus niveles de inmunoglobulinas contra la proteína OMPA, lo cual demuestra la protección ante especies homólogas y heterólogas.⁴⁰ Respecto a OMPB, se sabe que tiene mayor capacidad inmunoestimulante que OmpA, pues en un estudio realizado en ratones se demostró que los epítopes de *R. conorii* provenientes de SCA5 son reconocidos por linfocitos T e inducen la

producción de IFN- γ cuando son expresados en células NCTC e inoculadas a ratones previa infección.⁴¹ Otros estudios empleando proteínas OMPB recombinantes han demostrado la protección de ratones C3H/HeN induciendo la producción de anticuerpos y la proliferación de linfocitos T, así como la producción de IFN- γ necesario para la activación de macrófagos.^{42,43} De igual manera, otra recombinante de esta proteína en conjunto con la recombinante de la proteína Adr2 fue probada en ratones C3H/HeN y ambas demostraron una alta inmunización por separado produciendo activación de Linfocitos T CD4 y la producción de IFN- γ e IgG2a.⁴⁴ Finalmente, en 2015 se probaron plásmidos candidatos a vacunas de ADN con resultados prometedores. Estos plásmidos contienen regiones de ADN provenientes de OmpA y OmpB de *R. rickettsii* y fueron transfectados en macrófagos provenientes de la línea celular THP-1. Este estudio demostró por co-cultivo *in vitro* de los macrófagos con células polimorfo nucleares de sangre periférica que los plásmidos transfectados en macrófagos permiten la expresión de los péptidos rickettsiales que inducen una respuesta proliferativa en linfocitos provenientes de pacientes con diagnóstico positivo a rickettsiosis (*R. rickettsii*, *R. felis* y *R. typhi*) en contraste con los linfocitos de sujetos sanos,, produciendo un incremento en las concentraciones de IFN- γ y la proliferación de los linfocitos CD4+ y CD8+?. En este estudio no solo se demostró la eficacia de los plásmidos sino también la propiedad de estimular una respuesta inmune independientemente de la especie de *Rickettsia* implicada en la enfermedad del paciente.⁴⁵⁻⁴⁶

El plásmido *rOmpB-24* como candidato a vacuna

El estudio anteriormente mencionado, reportó que el plásmido *rOmpB-24* estimula a las células mononucleares de pacientes con rickettsiosis pero no estimula linfocitos de las de personas que nunca han padecido alguna rickettsiosis. Dicho plásmido fue construido en el vector plasmídico *pVAX1*[®] con un tamaño de 3 kilobases el cual ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicinas (FDA por sus siglas en inglés de *Food and Drug*

Administration) para su uso en la elaboración de vacunas de ADN debido a que posee bajo tamaño molecular y toxicidad, permitiendo su expresión en células eucariotas sin que se integre al ADN genómico (figura 4). El plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina que permite su selección clonal en células procariontas, una región promotora del citomegalovirus humano (CMV, por sus siglas en inglés) que permite la expresión en células eucariotas, así como contiene material cromosómico para disminuir su acoplamiento al ADN de la célula huésped. Así mismo, el plásmido contiene una región de múltiple acoplamiento que permite el uso de una amplia gama de enzimas de restricción para su apertura y acoplamiento de las secuencias de interés cercano al sitio de origen de replicación.⁴⁷

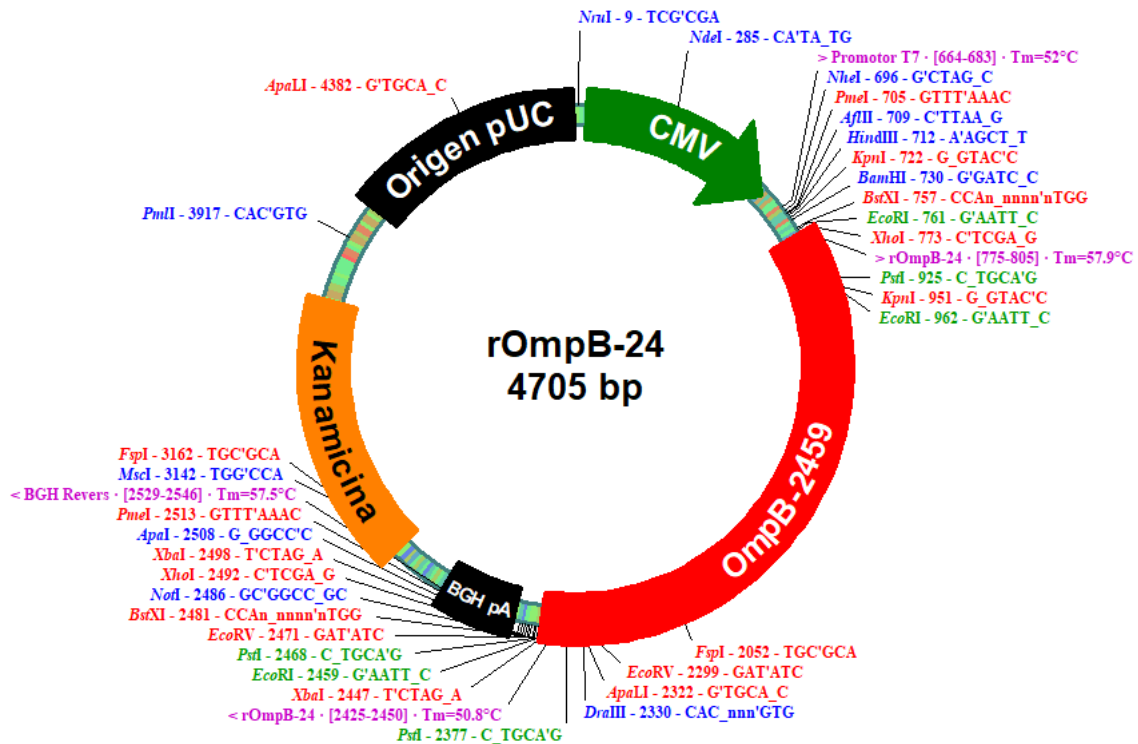


Figura 4. Mapa del plásmido *rOmpB-24*. El plásmido contiene un gen de la proteína OMPB de *R. rickettsii* clonado en el vector *pVAX1*. Los orígenes de replicación *pUC* y *CMV* permiten la expresión en células procariontas y eucariotas respectivamente. El mapa fue construido mediante el software *pDRAW*.

El plásmido contiene una región genética de 1734 pb aislada del genoma de la bacteria *R. rickettsii* de la cepa “*Sheila Smith*”. Esta región codifica para una sección proteica de OMPB con número de acceso ABV76666.1 de 58942 daltones. Dicha región fue seleccionada a partir de previos estudios *in silico* en los cuales se analizó la promiscuidad de los péptidos nonaméricos derivados de su procesamiento en células presentadoras de antígeno en los haplotipos de HLA-I tipo A y tipo B, así mismo, la región antigénica seleccionada no solo posee los más altos índices de acoplamiento al HLA-I, sino también posee un alto porcentaje de conservación genética entre las principales especies de *Rickettsia* (tabla 1) lo cual permite abarcar una amplia gama de rickettsiosis a nivel mundial.⁴⁸

Tabla 1. Porcentajes de homología del gen de *R. rickettsii* incluido en *rOmpB-24* respecto a los genes de las principales cepas de *Rickettsia* a nivel mundial analizados en Blast.

Especie	No. De Acceso	% de homología
<i>Rickettsia rickettsii</i> str. Sheila Smith	ABV76666.1	100%
<i>Rickettsia felis</i> str. URRWXCal2	CP000053.1	89.975%
<i>Rickettsia typhi</i> str. Wilmington	AE017197.1	81.865%
<i>Rickettsia prowazekii</i> str. Madrid E	AJ235273.1	81.362%
<i>Rickettsia conorii</i> str. Malish 7	AE006914.1	97.040%
<i>Rickettsia parkeri</i> str. Portsmouth	CP003341.1	97.270%
<i>Rickettsia akari</i> str. Hartford	CP000847.1	88.791%
<i>Rickettsia slovaca</i> str. D-CWPP	CP003375.1	97.792%
<i>Rickettsia japonica</i> str. VR-1363	AP011533.1	95.290%

El plásmido se espera que funcione (figura 5) al ser endocitado por células presentadoras de antígeno y aprovechar su maquinaria bioquímica para producir la proteína OMPB. La presencia de este antígeno activará la vía clásica de

presentación antigénica a través del HLA-I y en menor proporción la del HLA-II, involucrando así la estimulación de linfocitos T CD8 generando células de memoria productoras de Interferón gamma (IFN- γ). Los alelos de los haplotipos A y B del HLA-I para los cuales fue diseñado el plásmido son HLA-A02:01, HLA-A24, HLA-B35:01 y HLA-B39:01. Estos alelos fueron elegidos ya que se estima que están presentes en el 80 % de la población a nivel mundial, esto beneficiaría a la mayoría de la población en caso de emplearse para el desarrollo de una vacuna (figura 6).

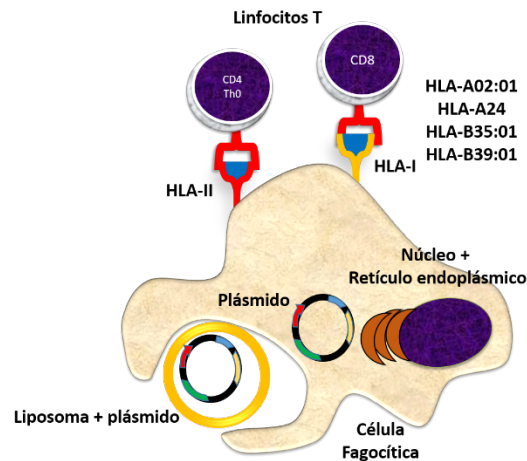


Figura 5. Mecanismo de acción del plásmido *rOmpB-24*. Su ingreso por endocitosis a las células presentadoras de antígeno permite su procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos mediante la vía del HLA-I y en menor proporción la vía del HLA-II.



Figura 6. Frecuencia de los Alelos de HLA a nivel mundial. El color dorado indica las regiones donde la población presenta una alta frecuencia alélica de los diferentes haplotipos de HLA-I, el color plata presenta una frecuencia media y el color bronce una baja frecuencia (tomado de www.allelefreqencies.net).

La selección de antígenos vacunales ha presentado un gran reto para el área de la vacunología. El empleo de antígenos recombinantes o de proteínas crudas provenientes de la lisis bacteriana presenta complicaciones al momento de seleccionar las regiones antigénicas con mayor actividad inmunogénica. Estos procesos son tardados y dependen de fases de evaluación preclínica lo que conlleva elevados costos y condiciones de estudio inmunogénico en modelos animales, totalmente ajenos a las que ocurren en los humanos. Por todo lo anteriormente expuesto resulta de particular importancia el desarrollar métodos rápidos y confiables para la selección de los antígenos que puedan ser utilizados en el desarrollo de vacuna recombinantes y de ADN para el control de diversas patologías infecciosas.

En el presente estudio, se propone una metodología *in vitro* que permite evaluar la respuesta inmune en generada en células mononucleares provenientes de humano (células autólogas) sin comprometer la salud de los donadores. Este método permite evaluar antígenos específicos provenientes de la bacteria *R. rickettsii* los cuales se espera que sean procesados por macrófagos a través de su transfección con un plásmido y presentados a los linfocitos de memoria de donadores con serología positiva a *Rickettsia*. Esto permitirá medir los porcentajes de activación, proliferación de linfocitos y de células productoras de IFN- γ para determinar la eficacia del método como una alternativa viable para la evaluación de candidatos a vacunas.⁴⁸⁻⁵⁰

IV. OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar la capacidad de los macrófagos transfectados con el plásmido *rOmpB-24*, para activar a linfocitos de pacientes con diagnóstico positivo a *Rickettsia*.

Objetivos específicos.

1. Evaluar *in vitro* la activación de los macrófagos de sangre periférica humana inducida por la transfección con el plásmido *rOmpB-24*.
2. Analizar la presencia de los alelos de HLA (*HLA-A02:01*, *HLA-A24*, *HLA-B35:01* y *HLA-B39:01*) en monocitos de sangre periférica de individuos incluidos en el estudio.
3. Caracterizar *in vitro* la respuesta proliferativa de linfocitos T (CD4 y CD8) de sangre periférica inducida por el co-cultivo con los macrófagos autólogos transfectados con el plásmido *rOmpB-24*.
4. Caracterizar los linfocitos T (CD4 y CD8) productores de IFN- γ estimulados por el co-cultivo con macrófagos autólogos transfectados con los plásmidos candidatos a vacunas.
5. Determinar la relación entre la respuesta inmune celular estimulada con el plásmido *rOmpB-24* y la presencia de diferentes alelos de HLA en células mononucleares de sangre periférica humanas.

V. HIPÓTESIS

Los macrófagos transfectados con el plásmido *rOmpB-24* son capaces de activar *in vitro* a los linfocitos CD4 y CD8 provenientes de pacientes con diagnóstico positivo a *Rickettsia*, provocando en ellos un efecto proliferativo y la producción de IFN- γ .

.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Tipo y diseño de Estudio.

- Se trata de un estudio experimental.

b) Universo.

- Pacientes mexicanos con diagnóstico positivo a rickettsiosis y sujetos sanos.

c) Muestra.

- Participaron 4 sujetos mexicanos con diagnóstico positivo (Px) a rickettsiosis y 4 sujetos con diagnóstico negativo (Cx).
- Algunos datos clínicos:

Código	Edad	Sexo	Diagnóstico
PX-01	30	H	<i>R. typhi</i>
PX-02	33	M	<i>R. typhi</i>
PX-03	42	M	<i>R. typhi</i>
PX-04	28	H	<i>R. typhi</i>
CX-01	33	H	-
CX-02	28	M	-
CX-03	39	M	-
CX-04	22	H	-

d) Variables y escalas de medición.

- Índice de linfoproliferación: Porcentajes.
- Porcentaje de expresión de interleucinas: Porcentajes.
- Porcentaje de expresión de HLA: Intensidad Media de Fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) y Porcentajes.

- Índice de activación de macrófagos: Porcentaje
- Expresión de proteínas de *Rickettsia*: Presente/ausente

e) Criterios de Inclusión.

- Sujetos con diagnóstico positivo a rickettsiosis mediante IFI.
- Sujetos con diagnóstico negativo a rickettsiosis mediante IFI pareados por edad y sexo con los sujetos seropositivos.
- Pacientes mayores de 5 años del sexo masculino o femenino que deseen participar con previo consentimiento informado.
- Sujetos sanos mayores de 5 años del sexo masculino o femenino que deseen participar con previo consentimiento informado pareados por edad y sexo con los pacientes.

f) Criterios de Exclusión.

- Sujetos que no deseen participar en el estudio.
- Sujetos con enfermedades de tipo febril o enfermedades autoinmunes.
- Pacientes o sujetos sanos con compromiso inmune.

g) Criterios de Eliminación.

- Sujetos que ya no deseen participar en el estudio.
- Integridad de la muestra sanguínea.

h) Fuentes de recolección de la información.

- Bases de datos de pacientes diagnosticados por el Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Banco de plásmidos de ADN elaborado por el Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán.

i) Esquema Metodológico.

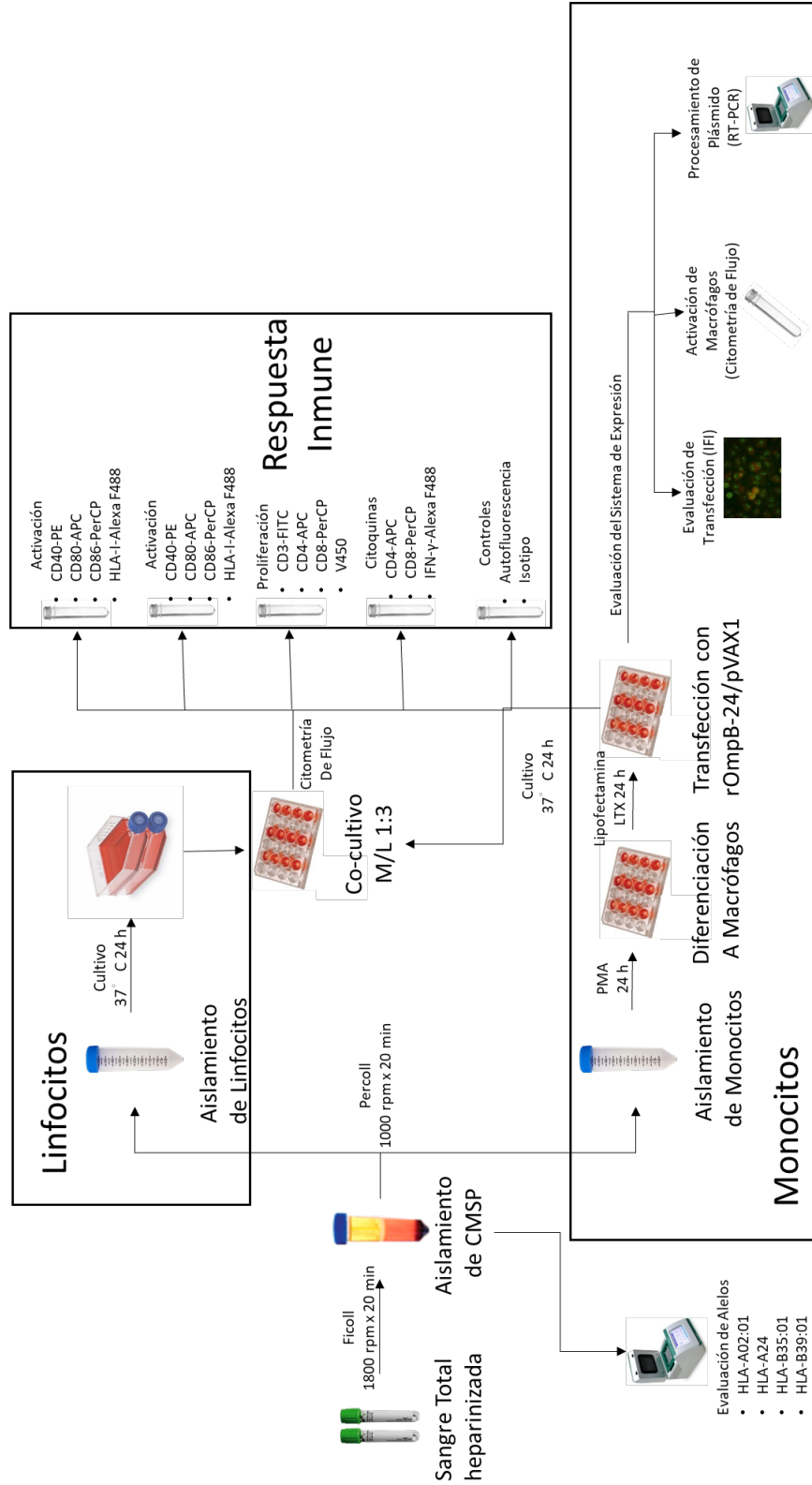


Figura 7. Diagrama del diseño experimental.

j) Metodología.

Para cumplir el objetivo 1, fue necesario construir un plásmido (Figura 8) derivado de *pVAX1* que posea una región codificante para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) para poder emplear un control de transfección.

Obtención de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP).

Se realizó la digestión enzimática del plásmido pEGFP-N1 para obtener la región GFP. Para ello se preparó una reacción enzimática empleando el buffer FastDigest 10X ajustado a 1X (Thermo Scientific, Cat. B64), 1U de la enzima HindIII (Thermo Scientific Cat. ER0501), 1U la enzima NotI (Thermo Scientific Cat. ER0591) y 8 µg del plásmido pEGFP-N1 (Clontech, Cat. #6085-1) en un volumen de 20 µL. La mezcla se mantuvo en incubación a 37°C por 2 horas y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 v por 30 minutos) teñido con bromuro de etidio. La banda obtenida del producto de digestión (760 pb) fue cortada del gel y se purificó mediante la metodología propuesta en el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit.

Digestión enzimática del vector *pVAX*.

Se realizó la digestión enzimática del plásmido vector *pVAX1* (Thermo Scientific, Cat. V26020) para la construcción del plásmido *pVAX-GFP5*. Para ello se preparó una reacción de 20 µL conteniendo 5 µg del plásmido, 1X del buffer FastDigest 10X, 1U de la enzima NotI y 1U de la enzima HindIII, dejando en incubación toda la noche a 37 °C. Finalmente, los productos de digestión enzimática de *pVAX1* fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (30 minutos, 100 v) teñido con bromuro de etidio. La segunda banda, correspondiente al plásmido digerido fue cortada y se purificada mediante la metodología propuesta en el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit.

Construcción del plásmido *pVAX-GFP5*.

Posterior a la digestión enzimática, se inactivaron las enzimas de restricción por 5 minutos a 65 °C. En relación 5:1 (inserto/plásmido) se emplearon 47 ng del inserto digerido, 40 ng del plásmido *pVAX1* digerido y 1 U de la enzima ligasa T4 (Thermo Scientific, EL0016) para un volumen de 20 µL. Finalmente se incubó por 16 horas a 14 °C para la ligación del plásmido con el inserto.

Obtención de células competentes.

Células DH5α (Thermo Scientific, 18265017) se cultivaron en 5 mL de medio LB broth con agitación a 250 rpm por 16 horas a 37°. Seguidamente, se cultivaron las células en 100 mL de medio LB broth libre de antibióticos bajo las mismas condiciones por 3 horas hasta alcanzar la densidad óptica de 550 nm. Las células se enfriaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron por 10 minutos a 8000 rpm a 4 °C para descartar el sobrenadante. Inmediatamente, las células se suspendieron en 250 µL de MgCl₂ 0.1 M en frío y se repitió la centrifugación descartando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 250 µL de CaCl₂ 0.1 M frío y se reservó a 0 °C por 20 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 4.3 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y 1 mL de glicerol preservándolas a -70 °C hasta su uso.

Transformación de células competentes.

Una alícuota de 50 µL de células competentes congeladas se añadió 20 µL del plásmido *pVAX-GFP5* recién preparado agitando con suavidad y manteniendo en hielo por 20 minutos. Seguidamente, las células se colocaron por 90 segundos a 42 °C e inmediatamente se colocaron en hielo por 10 minutos. Las células resultantes fueron incubadas en 150 µL de medio LB broth libre de antibiótico por 30 minutos en agitación a 250 rpm y 37 °C. Finalmente, las células se sembraron en agar LB con una concentración de 100 µg/mL de kanamicina y fueron incubadas por 16 horas a 37 °C.

Extracción del plásmido por lisis alcalina.

A partir de 10 colonias obtenidas, se realizó un cultivo en 15 mL de medio LB broth con 100 µg/mL de kanamicina por 16 horas a 37 °C y agitación a 250 rpm. Las células obtenidas fueron centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 8000 rpm y se decantó el sobrenadante. Las células fueron suspendidas en 200 µL de buffer LA-I (glucosa 50 mM, Tris-Cl pH:8.0 25 mM, EDTA 10 mM), se añadió 400 µL del buffer LA-II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) incubando 5 minutos. Seguidamente se añadió 300 µL del buffer LA-III (Acetato de sodio 3 M, Ácido Acético Glacial 0.115%), se homogenizó cada tubo por inversión y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a microtubos de 1.5 mL, se les adicionó 10 µL de RNAsa (Invitrogen Cat. 12091-021) y se incubaron por 2 horas a 37°C. Concluida la incubación, se colocó 1 volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos recuperando la fase superior (fase acuosa), el procedimiento se realizó dos veces. Seguido, se obtuvo la fase acuosa y se le añadió 1 volumen igual de etanol absoluto incubando a -20°C por 30 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 100 µL de etanol al 70% centrifugando a 13 000 rpm por 30 minutos. Finalmente, el sobrenadante se desechó y posteriormente la pastilla se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 100 µL de agua estéril libre de nucleasas. Las construcciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Verificación del Inserto GFP.

Para verificar la presencia del inserto en el plásmido construido, se seleccionó una de las construcciones cuyo tamaño era de 3.7 kb (*pVAX1*: 3 kb, GFP: 700 pb) para realizar una digestión enzimática y su análisis por PCR. La digestión enzimática se realizó empleando las enzimas HindIII y NotI como se indica en el

apartado A del protocolo 1 en el presente documento. La reacción de PCR se realizó empleando 1.5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 1 U de taq polimerasa, 0.4 μM del cebador “*T7 promoter*” (5'- TAATACGACTCACTATAGGG- 3') y del cebador “*BGH reverse*” (5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG- 3') más 100 ng de ADN en un volumen de 25 μL. La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 94°C para la desnaturalización por 30 segundos, alineamiento a 51 °C por 30 segundos y 2 minutos de extensión a 72 °C durante 35 ciclos. Finalmente, los productos de PCR y de digestión se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % a 150V y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Transferencia de la secuencia GFP al plásmido *rOmpB-24*

Para realizar la transferencia de la secuencia GFP del plásmido *pVAX-GFP5* al plásmido *rOmpB-24* mediante subclonación, ambos plásmidos fueron digeridos con la enzima Apal mediante las condiciones antes descritas. Los fragmentos de interés fueron purificados y ligados con Ligasa T4 y se realizó el proceso de transformación, propagación, extracción y análisis de plásmido antes descrito. El nuevo plásmido fue construido con la región GFP ubicada después del marco de lectura para garantizar que primero se sintetice la proteína OMPB y al final la proteína GFP (figura 8).

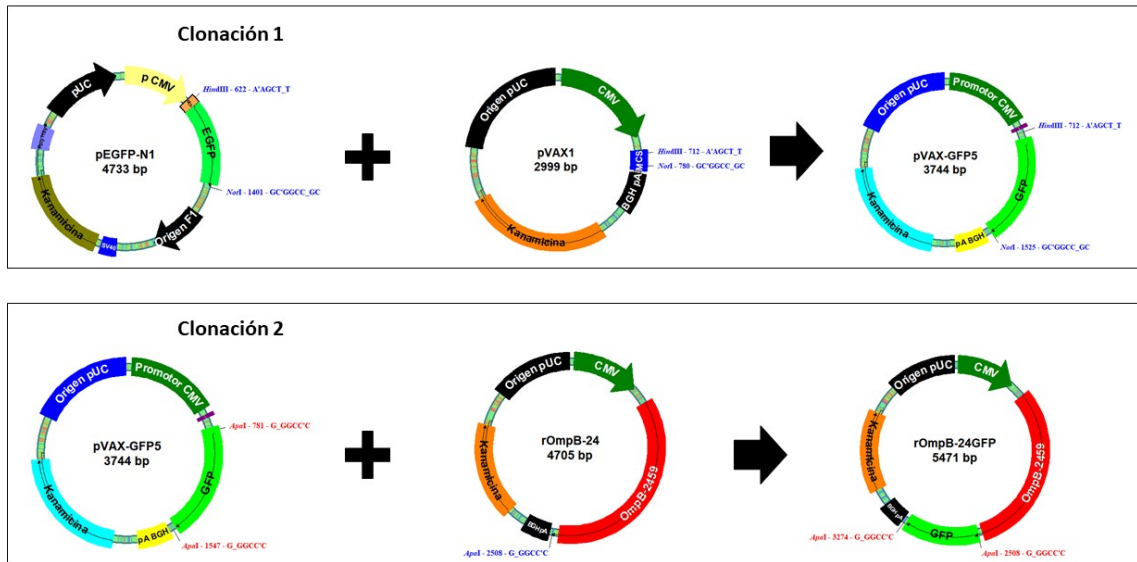


Figura 8. Construcción de los plásmidos *pVAX-GFP5* y *rOmpB-24GFP* para el análisis de transfección en macrófagos. En la primera clonación se emplearon las enzimas de restricción HindIII y NotI para transferir la región GFP al vector *pVAX1* dando origen al plásmido *pVAX-GFP5*. En la segunda clonación se empleó la enzima ApaI para transferir la secuencia GFP al plásmido de estudio *rOmpB-24*. Amabas construcciones fueron empleadas para localizar a la proteína OMPB en los macrófagos transfectados detectando a la proteína verde fluorescente.

Para poder detectar la presencia de la proteína rickettsial OMPB, se transfectaron macrófagos con los plásmidos construidos como se describe a continuación:

Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica Humanas (CMSP) por gradientes de centrifugación de Ficoll.

De acuerdo a la metodología descrita por Dzul y Balam⁴⁵⁻⁴⁶, se realizó lo siguiente: Se colectaron 20 mL de sangre periférica por punción venosa en tubos con heparina. La sangre fue diluida 1:1 en buffer de sales de fosfato (PBS 1X) con pH de 7.2 ± 1 frío y se colocaran 10 mL de la sangre diluida en un colchón de ficoll (Lymphoprep™ 1.077 g/mL, Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) de 3 mL en tubos cónicos cuidando mantener ambas fases y se centrifugaron por 20 minutos a 1800 rpm a 4°C. Seguidamente, el anillo contenedor de CMSP se colectó en tubos cónicos, las células fueron lavadas con PBS 1X frío a 1500 rpm

por 8 minutos a 4°C por tres veces. Las células colectadas se resuspendieron en 4 mL de medio RPMI-1460 completo RPMI-1640, 10 % de suero fetal bovino, 1 % de estreptomicina/anfotericina B, 1 % de Hapes, 2 mM de L-glutamina).

Aislamiento de monocitos y linfocitos por gradiente de centrifugación con Percoll.

Después del aislamiento de CMSP, se procedió a aislar los monocitos como sigue: La solución fue colocada sobre dos fases de Percoll® P1644 (Sigma-Aldrich, 1.130 g/mL, pH: 9.4) ajustadas a 1.062 g/mL y 1.064 g/mL de densidad y se centrifugaron por 30 minutos a 1700 rpm. El anillo obtenido en la interfase fue colectado y lavado por centrifugación con PBS 1X frío a 1500 rpm por 8 min por dos veces. Finalmente, las células fueron suspendidas en 1 mL de medio RPMI-1640 completo y se procedió a su recuento en cámara de Neubauer por la técnica de exclusión de azul de Tripano en dilución 1:100.

Obtención de macrófagos mediante estímulos con Acetatos de Phorbol.

Los monocitos obtenidos fueron diluidos en medio completo RPMI-1640 y cultivados a razón de 1×10^6 monocitos por pozo en placas de cultivo celular de 24 pozos y se les adicionará una solución de Phorbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA 1 ng/ μ L) para obtener la concentración de 100 ng/mL. Las placas fueron cultivadas en incubadora con atmósfera de CO₂ al 5%, humedad de 95% y temperatura de 37 °C durante 24 horas.

Transfección de macrófagos con los plásmidos *pVAX-GFP5* y *rOmpB-24GFP*.

A partir de monocitos diferenciados, cada pozo fue lavado con PBS 1X estéril. En un tubo de 1.5 mL se colocaron 50 μ L de medio Opti-MEM y 16 μ L de Lipofectamina LTX, en un tubo a parte se colocarán 50 μ L de Opti-MEM con 1 μ g de plásmido y 5 μ L de Reactivo Plus para cada pozo. Finalmente, ambos

contenidos se mezclaron e incubaron 30 min a temperatura ambiente y se colocaron 100 μ L de la mezcla final a cada pozo. En este experimento se emplearon 5 condiciones cuyo duplicado fue tratado con Brefeldin A: macrófagos sin transfectar y transfectados con *pVAX1* y *rOmpB-24* como controles negativos, *pVAX-GFP* como control positivo y *rOmpB-24GFP*. Las placas se incubaron a 37 °C por 12 horas en atmósfera del 5% de CO₂ y 95% de humedad y se añadió Brefeldin A (5 μ g/mL) a cada pozo duplicado y se mantuvo en incubación 12 horas más. Las células fueron observadas en microscopio invertido de fluorescencia mediante el filtro de FITC.

Extracción de RNA.

Partiendo de 3 pozos con macrófagos transfectados con los plásmidos *rOmpB-24* y *pVAX1*, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se rasparon las células adheridas colectándolas en 1 mL de PBS. Posterior a una centrifugación de 14 000 rpm por 5 minutos se realizó la extracción de ARN mediante TRIzol® Reagent (Invitrogen, cat. 15596026) y Fenol-Cloroformo 1:1 precipitando el ARN de la fase acuosa con isopropanol. El ARN extraído fue lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua tratada con DEPC.

Transcripción Reversa.

Para la síntesis de ADN complementario (cADN) se empleó el kit comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System de la marca Promega (cat. A3800). Por reacción se colocaron en un tubo de 200 μ L 0.5 μ L de cebador hexámero y 4.5 μ L de ARN y se incubaron a 70°C por 5 minutos, seguidamente en hielo por otros 5 minutos. A la par se adicionó a cada tubo una mezcla de 15 μ L que contenía 1X de ImProm II 5x Reaction Buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 500 μ M de dNTP's, 20 unidades de Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor y 160 unidades de ImProm II Reverse Transcriptase. Concluida la incubación en hielo, se unieron ambas mezclas para un volumen final de 20 μ L y se colocaron en el

termociclador a 25°C por 5 minutos (alineación), 42°C por una hora (Elongación del cADN) y 70°C por 15 minutos (inactivación de la Transcriptasa Reversa).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se prepararon 4 reacciones empleando las concentraciones de 2.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1 U de taq polimerasa, 0.4 µM de cada cebador (Fw: 5'-ATGGTCGGTGGACAGCAAGGTAATAAG-3', Rv: 5'-GGTAACGATAGCTCCAACAAAG-3') y 100 ng de ADN para un volumen de 25 µL por reacción. La programación necesaria para el termociclador fue 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C, y 3 minutos a 72°C y una temperatura de alineamiento final de 72°C por 10 minutos. Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % por 60 minutos a 120 V y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

Para poder conocer el porcentaje de expresión de HLA-I y HLA-II en los macrófagos transfectados, se realizó un análisis por citometría de flujo como se explica a continuación:

Co-cultivo de macrófagos transfectados con linfocitos.

A partir de 20 mL de sangre total heparinizada, se aislaron las CMSP de los pacientes y los sujetos sanos mediante gradientes de centrifugación con Ficoll. Las células fueron resuspendidas en medio completo RPMI-1640 y se separaron los linfocitos de los monocitos mediante centrifugación con Percoll. Los monocitos fueron sembrados en placas de cultivo de 24 pozos a razón de 1×10^6 monocitos por pozo mientras que los linfocitos fueron cultivados por separado en frascos de cultivo de 25 mL. Los pozos con monocitos fueron tratados por 24 horas con PMA (100 nM) para su diferenciación a macrófagos. Los macrófagos generados fueron transfectados con el plásmido *rOmpB-24* y con el plásmido

pVAX1 para un análisis de proliferación basal, empleando Lipofectamina LTX por 24 horas. Los linfocitos fueron lavados con PBS 1X, resuspendidos en medio fresco RPMI-1640. Finalmente fueron co-cultivados a razón de 3:1 respecto a los macrófagos en los pozos durante 72 horas.

Marcaje de superficie y Análisis por Citometría de flujo.

Terminado el tiempo de co-cultivo, se colectó el sobrenadante en tubos para citometría de flujo. Los pozos fueron lavados por triplicado con Versene frío (Gibco™, cat. 15040033) para despegar todas las células colectando los lavados en los tubos. Los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos decantando el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µL de buffer de tinción (PBS 1X, Suero Fetal Bovino al 2.5%). Seguido, se añadieron 3 µL de los anticuerpos monoclonales antihumano anti-CD40 marcado con PE, anti-CD80 marcado con APC y anti-HLA-I marcado con Alexa Fluor 488 y se incubaron en frío por 30 minutos realizando el mismo marcaje con el HLA-II. Finalmente, las células fueron lavadas por duplicado con PBS 1X frío y se resuspendieron en 500 µL del buffer de tinción. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo modelo FACSVerse de BD.

Para cumplir con el objetivo 2 se realizó lo siguiente:

Detección de los alelos de HLA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.

A partir de leucocitos aislados se realizó una extracción de ADN empleando el kit DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen ® Cat No./ID: 69504) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se prepararon las reacciones de PCR empleando las concentraciones de 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1 U de taq polimerasa, 0.4 µM del cebador de sentido y del cebador antisentido y 100 ng de ADN para un volumen de 25 µL. La programación necesaria para el

termociclador fue: 94°C para la desnaturalización por 30 segundos, alineamiento de 64 °C para cualquier alelo y 2 minutos de extensión a 72 °C para 35 ciclos. Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % por 30 minutos a 150 V y visualizados por tinción con bromuro de etidio (tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores y tamaño en pares de bases (pb) del producto de PCR esperado para cada alelo del haplotipo *HLA-A* y *HLA-B*.

Alelo	Cebadores	Tamaño
<i>HLA-A02:01</i>	Fw: 5'-GTGGATAGAGCAGGAGG-3' Rv: 5'-CCAAGAGCGCAGGTCCTCT-3'	489 pb
<i>HLA-A24:02</i>	Fw: 5'-GGCCGGAGTATTGGGACGA-3' Rv: 5'-CCTCCAGGTAGGCTCTCTG-3'	557 pb
<i>HLA-B35:01</i>	Fw: 5'-GACCGGAACACACAGATCTT-3' Rv: 5'-GAGGAGGCGCCCGTCG-3'	389 pb
<i>HLA-B39:01</i>	Fw: 5'-CCGAGAGAGCCTGCGGAA-3' Rv: 5'-CGTGCCCTCCAGGTAGGT-3'	507 pb

Para llevar a cabo el objetivo 3 referente a la proliferación linfocítica se procedió como sigue:

Tinción de Linfocitos y marcaje extracelular.

Previo al co-cultivo, los linfocitos fueron tratados e incubados por 10 minutos a 37 °C en presencia del tinte Ghost Dye™ Violet 450 (Tonbo Biosciences, Cat.No. 13-0863-T100) y lavados nuevamente para retirar los restos del tinte. Los linfocitos fueron co-cultivados con los macrófagos manteniendo la relación 3:1 por 72 horas. Concluido el tiempo de cultivo, las células fueron cosechadas, lavadas y marcadas con los anticuerpos monoclonales antihumano anti-CD3

marcado con FITC, anti-CD4 marcado con APC y anti CD8 marcado con PerCP. Las células fueron analizadas por citometría de flujo.

Cumpliendo con el objetivo 4 referente a la producción de IFN- γ , se realizó la siguiente metodología:

Marcaje intracelular y Análisis por Citometría de flujo.

Partiendo de un co-cultivo de linfocitos y células transfectadas, se realizó un tratamiento con Brefeldin A para detener el tráfico vesicular del IFN- γ en los Linfocitos 6 horas antes de despegar las células. Las células fueron lavadas y permeabilizadas con el buffer de permeabilización (PBS 1X, Tritón 20 al 0.5%, Suero Fetal Bovino al 2.5%) por 10 min. Las células se lavaron nuevamente y fueron marcadas con los anticuerpos antihumano anti-CD4 marcado con APC, anti-CD8 marcado con PerCP y anti-IFN- γ marcado con Alexa 488 y analizadas en el citómetro de flujo.

VII. RESULTADOS

Construcción de los plásmidos *pVAX-GFP5* y *rOmpB-24GFP*

Se realizó la construcción de los plásmidos *pVAX-GFP5* y *rOmpB-24GFP* para ser empleados como control de transfección y para seguimiento de la expresión de la proteína *OMP*B respectivamente. En la figura 9 se muestran los respectivos mapas generados de ambos plásmidos en el software pDRAW32 (AcaClone Software). Ambos plásmidos fueron analizados y presentaron los tamaños esperados de 3.7 kb para el plásmido *pVAX-GFP5* y de 5.4 kb para *rOmpB-24GFP* (Figura 10). Del mismo modo, ambos plásmidos demostraron poseer la región codificante para la proteína verde fluorescente (Figura 11C), mientras que el plásmido *rOmpB-24GFP* demostró contener también la región codificante de la proteína *OMP*B (Figura 11A).

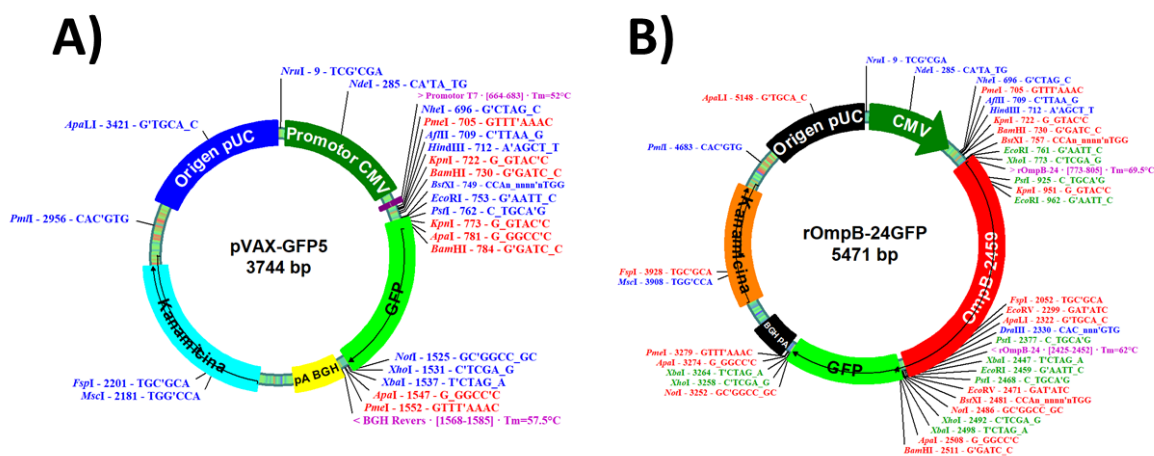


Figura 9. Mapas genéticos de los plásmidos *pVAX-GFP5* y *rOmpB-24GFP*. A) *pVAX-GFP5*: construido en el vector *pVAX1*, posee una región codificante para la proteína verde fluorescente y una región promotora de expresión en eucariotas CMV. B) *rOmpB-24GFP*: Construido en el plásmido *rOmpB-24*, además de poseer la región codificante para *OMP*B posee una región GFP y una región promotora para expresión en eucariotas.

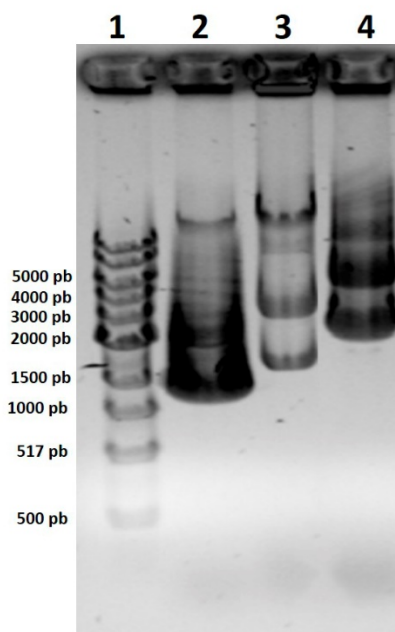


Figura 10. Tamaño de los plásmidos construidos evaluado mediante electroforesis en agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de tamaño (NEB 1kb). Carril 2: plásmido *pVAX1* (3 kb). Carril 3: plásmido *pVAX-GFP5* (3.7 kb). Carril 4: plásmido *rOmpB-24GFP* (5.4 kb).

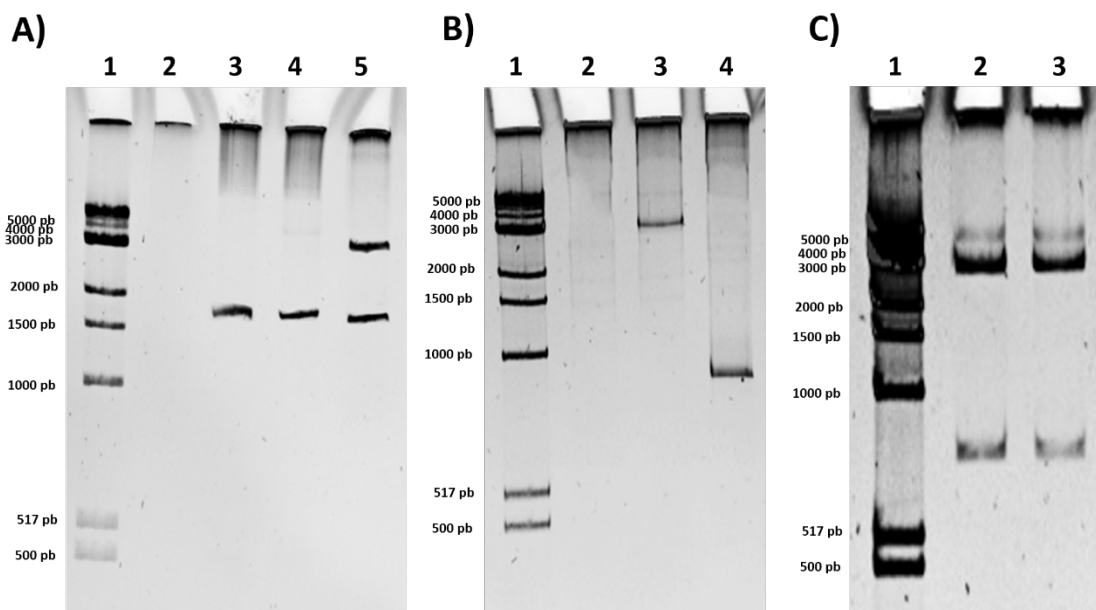


Figura 11. Análisis de PCR y digestión por enzimas de restricción de los plásmidos construidos, electroforesis en acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio. A) Productos de PCR del gen *OmpB-24*. Carril 1: Mk NEB 1kb. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Control positivo (ADN de *R. rickettsii*, 1.7 kb). Carril 4: plásmido *rOmpB-24GFP*. Carril 5: plásmido *rOmpB-24GFP* digerido con la enzima BamHI. B) Productos de PCR de control de insertos T7-BGH. Carril 1: Mk NEB 1kb. Carril 2: Control negativo. Carril 3:

plásmido *rOmpB-24GFP* (2.8 kb). Carril 4: plásmido *pVAX-GFP5* (850 pb). C) Análisis de la región GFP. Carril 1: : Mk NEB 1kb. Carril 2: *pVAX-GFP5* digerido con NotI y BamHI (760 pb). Carril 3: *rOmpB-24GFP* digerido con Apal (760 pb).

Evaluación del sistema de transfección por microscopia de fluorescencia.

Empleando el sistema de aislamiento de monocitos por doble centrifugación con gradientes de densidad se obtuvo un promedio de 10×10^6 monocitos en 20 mL de sangre total. Como se observa en la figura 12 correspondiente a los macrófagos sin tratamiento con Brefeldin A, no se encontró emisión de fluorescencia al evaluarse en el filtro para FITC a los macrófagos sin transfectar, los transfectados con *pVAX1* y los transfectados con *rOmpB-24*, mientras que los macrófagos transfectados con el plásmido de control *pVAX-GFP5* y el plásmido de seguimiento *rOmpB-24GFP* mostraron una fluorescencia con poca intensidad.

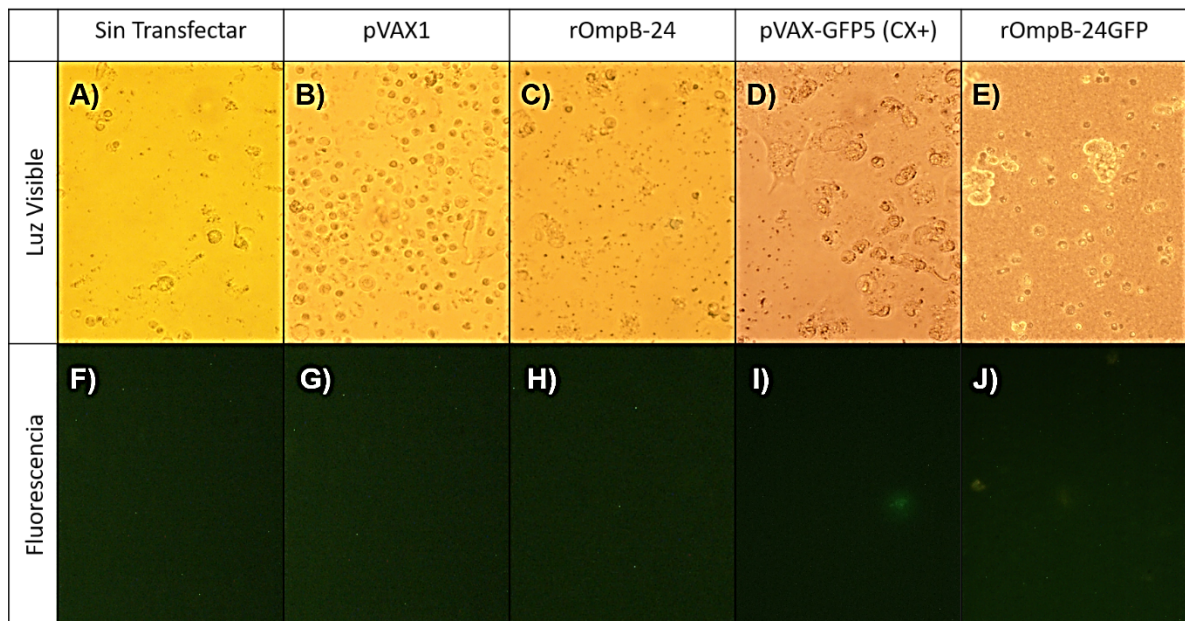


Figura 12. Imágenes 40X de microscopia de fluorescencia obtenidas de los macrófagos posterior a 24 horas de transfección sin tratamiento con Brefeldin A. A) Macrófagos sin transfectar: Luz visible. B) Macrófagos transfectados con *pVAX1*: Luz visible. C) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24*: Luz visible. D) Macrófagos transfectados con *pVAX-GFP5*: Luz visible. E) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24GFP*: Luz visible. F) Macrófagos sin transfectar: Filtro FITC. G) Macrófagos transfectados con *pVAX1*: Filtro FITC. H) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24*: Filtro FITC. I) Macrófagos transfectados con *pVAX-GFP5*: Filtro FITC. J) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24GFP*: Filtro FITC.

En la figura 13 se muestran las imágenes obtenidas de los macrófagos transfectados bajo las mismas condiciones y mediante tratamiento con Brefeldin A. Los macrófagos transfectados con los plásmidos que no poseen la región GFP no mostraron ninguna fluorescencia, sin embargo, los macrófagos transfectados con los plásmidos que poseen la región GFP mostraron un aumento en la intensidad de la fluorescencia lo cual sugiere que el sistema de lipofección es funcional.

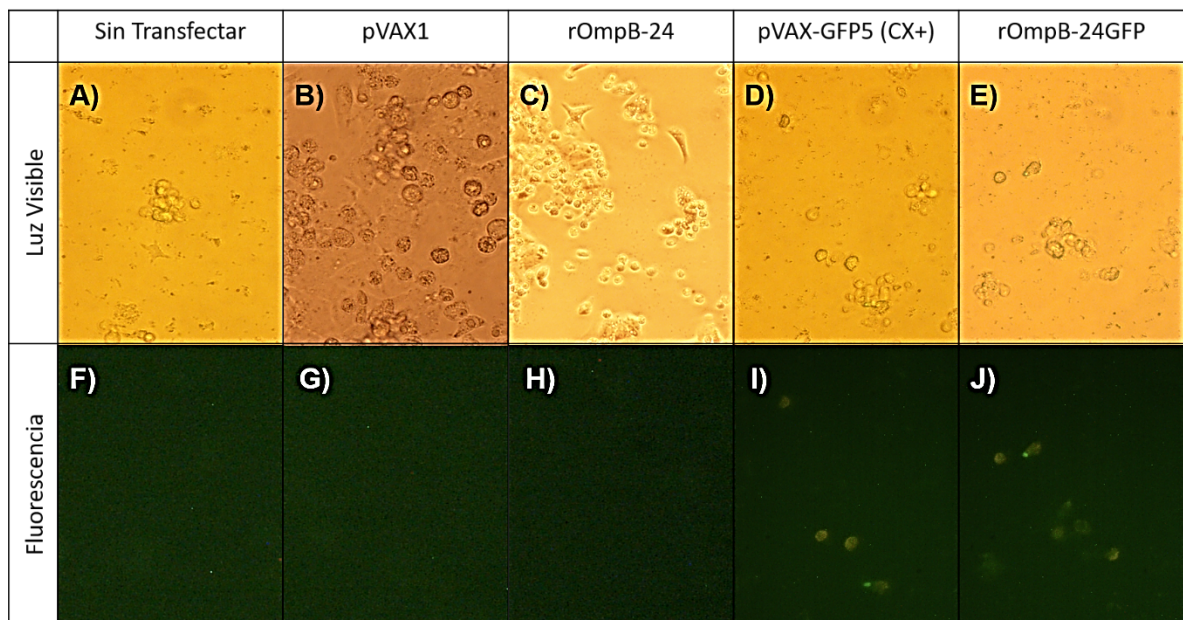


Figura 13. Imágenes 40X de microscopia de fluorescencia obtenidas de los macrófagos posterior a 24 horas de transfección tratados con Brefeldin A. A) Macrófagos sin transfectar: Luz visible. B) Macrófagos transfectados con *pVAX1*: Luz visible. C) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24*: Luz visible. D) Macrófagos transfectados con *pVAX-GFP5*: Luz visible. E) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24GFP*: Luz visible. F) Macrófagos sin transfectar: Filtro FITC. G) Macrófagos transfectados con *pVAX1*: Filtro FITC. H) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24*: Filtro FITC. I) Macrófagos transfectados con *pVAX-GFP5*: Filtro FITC. J) Macrófagos transfectados con *rOmpB-24GFP*: Filtro FITC.

En cuanto a la evaluación de la presencia de ARNm derivado de la síntesis de la proteína OMPB en los macrófagos transfectados, se obtuvo un producto de RT-PCR de un tamaño de 1.7 kb correspondiente al gen de estudio. En la figura 14 se muestra un gel representativo de los productos de PCR de las extracciones

realizadas a los macrófagos transfectados con *pVAX1* y con *rOmpB-24* comparados con el amplificado derivado del ADN de la bacteria *R. rickettsii*.

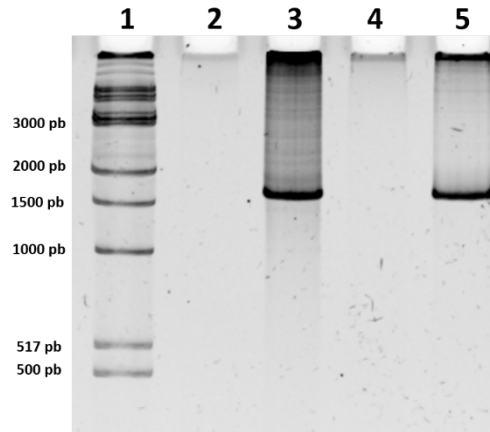


Figura 14. RT-PCR realizado a las extracciones de ARN de macrófagos transfectados con *pVAX1* y con *rOmpB-24*. El resultado muestra una banda del tamaño del gen de estudio lo cual sugiere la expresión de la proteína rickettsial en los macrófagos post-transfección. Carril 1: Mk NEB 1kb. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Control positivo (ADN de *R. rickettsii*, 1.7 kb). Carril 4: producto de PCR de la extracción de macrófagos transfectados con *pVAX1*. Carril 5: producto de PCR de la extracción de macrófagos transfectados con *rOmpB-24*.

Fenotipificación de las moléculas de HLA clase I y clase II en macrófagos CD40+ y CD80+.

El análisis citométrico (figura 15) de los macrófagos transfectados mostró que el plásmido *rOmpB-24* induce un incremento en la MFI de macrófagos con moléculas co-estimuladoras o presentadoras de antígeno comparado con el plásmido *pVAX1* el cual no posee genes de la bacteria *R. rickettsii*. La figura 16a sugiere un incremento en la MFI correspondiente a CD40 en 4 de 4 muestras de donadores seropositivos mediante el estímulo con *rOmpB-24* respecto a *pVAX1*, ocurriendo de manera similar con las pruebas para CD80 (figura 16b) y HLA-I (figura 16c) mientras que para HLA-II solo se mostró un incremento de MFI en 3 de 4 muestra bajo las mismas condiciones de estímulo. La figura 17 muestra la estrategia de evaluación de las diferentes poblaciones celulares mediante la delimitación de células doble negativas (-/-). Las figuras 18a y 18b sugieren un incremento en el porcentaje de macrófagos CD40+HLA-I+ y CD80+HLA-I+

respectivamente en 4 de 4 muestras analizadas de donadores seropositivos. Las figuras 18c, 18d sugieren un incremento en el porcentaje de macrófagos CD40+HLA-II+ y CD80+HLA-II+ en 4 de 4 muestras, mientras que sólo hubo un incremento de macrófagos CD40+CD80+ en 3 de 4 muestras (figura 18e). Así mismo, las diferencias en los porcentajes de células estimuladas con ambos plásmidos de los seropositivos fueron mayores comparados con los de los sujetos con seronegativos. Los resultados sugieren que el fenotipo CD40+HLA-I es el más frecuente. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas (figura 19).

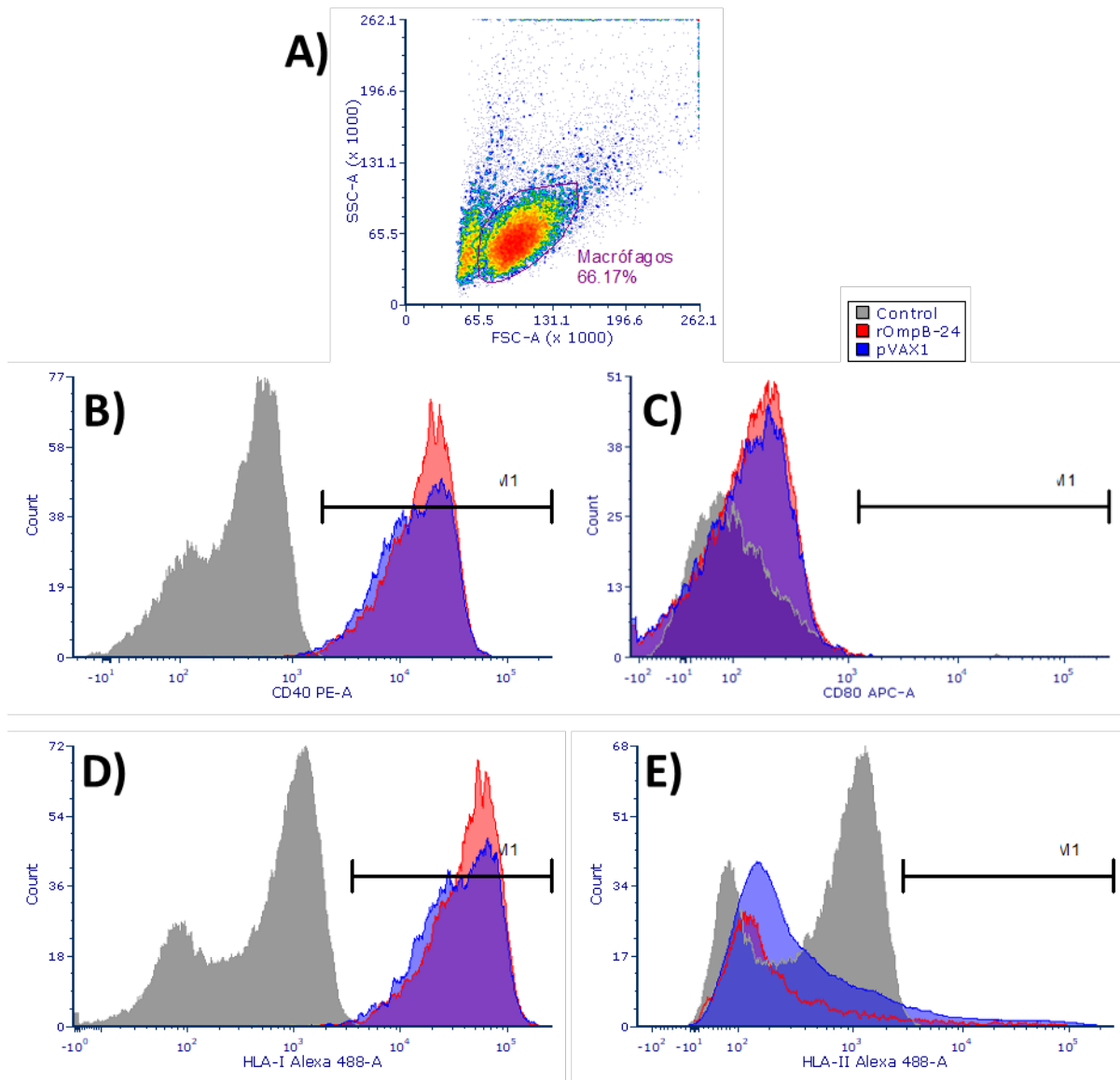


Figura 15. Expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40 y CD80) y de presentación de antígeno (HLA-I y HLA-II) en macrófagos transfectados con *rOmpB-24* y *pVAX1*. A) Análisis *dot plot* de las poblaciones celulares por tamaño y granularidad (los macrófagos son más grandes y más granulares que los linfocitos). B) Histograma representativo de la intensidad media de fluorescencia en macrófagos CD40+. C) Histograma representativo de la intensidad media de fluorescencia en macrófagos CD80+. D) Histograma representativo de la intensidad media de fluorescencia en macrófagos HLA-I+. E) Histograma representativo de la intensidad media de fluorescencia en macrófagos HLA-II+.

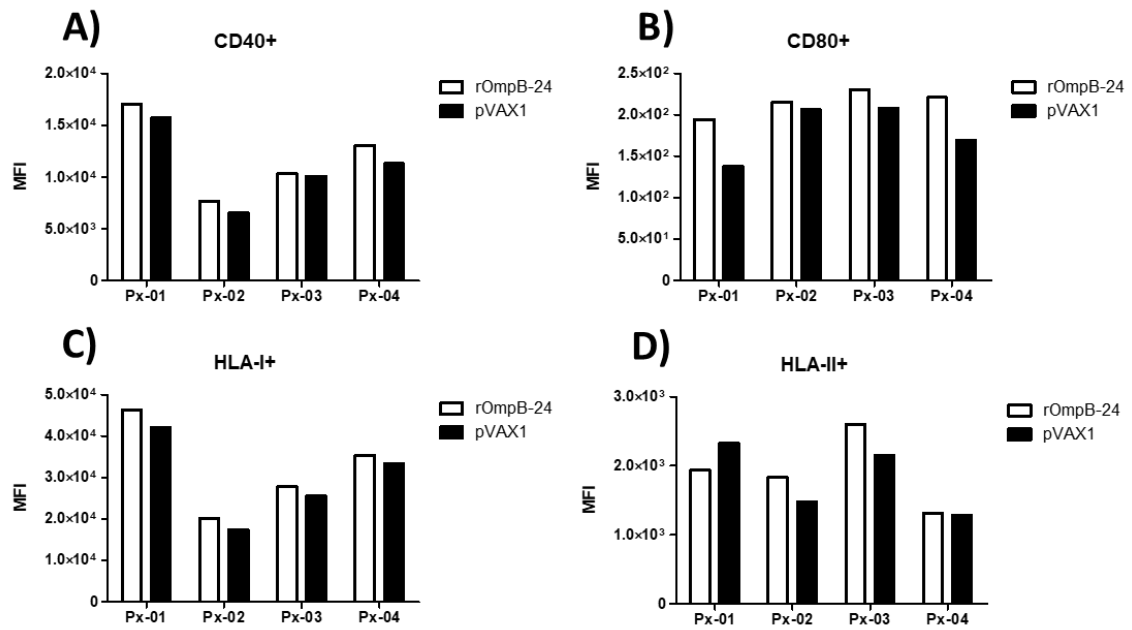


Figura 16. Intensidades medias de fluorescencia en macrófagos de sujetos seropositivos a *Rickettsia* transfectados con *rOmpB-24* y *pVAX1*. A) Macrófagos CD40+. B) Macrófagos CD80+. C) Macrófagos HLA-I+. D) Macrófagos HLA-II+.

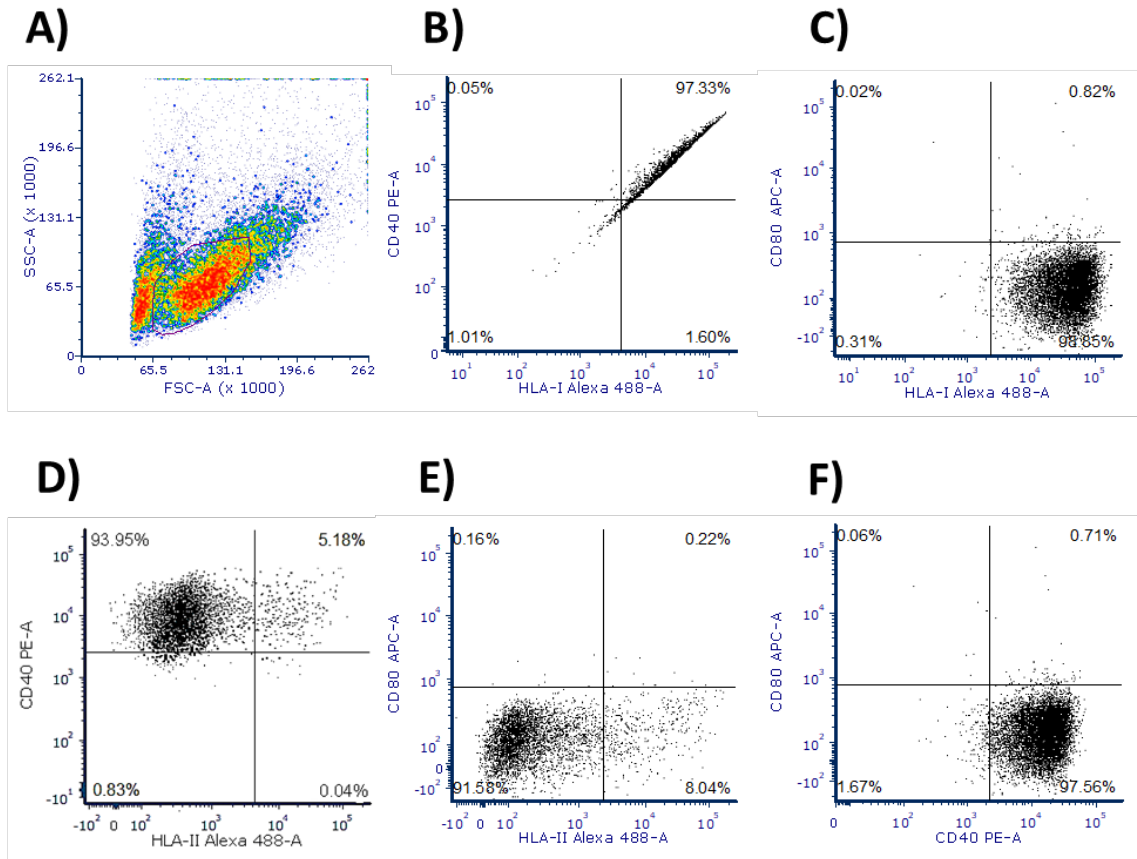


Figura 17. Representación del análisis citométrico de macrófagos mediante dot plots. A) Selección de los macrófagos mediante tamaño y granularidad. B) Selección de los macrófagos CD40+HLA-I+. C) Selección de los macrófagos CD80+HLA-I+. D) Selección de los macrófagos CD40+HLA-II+. E) Selección de los macrófagos CD80+HLA-II+. F) Selección de los macrófagos CD40+CD80+.

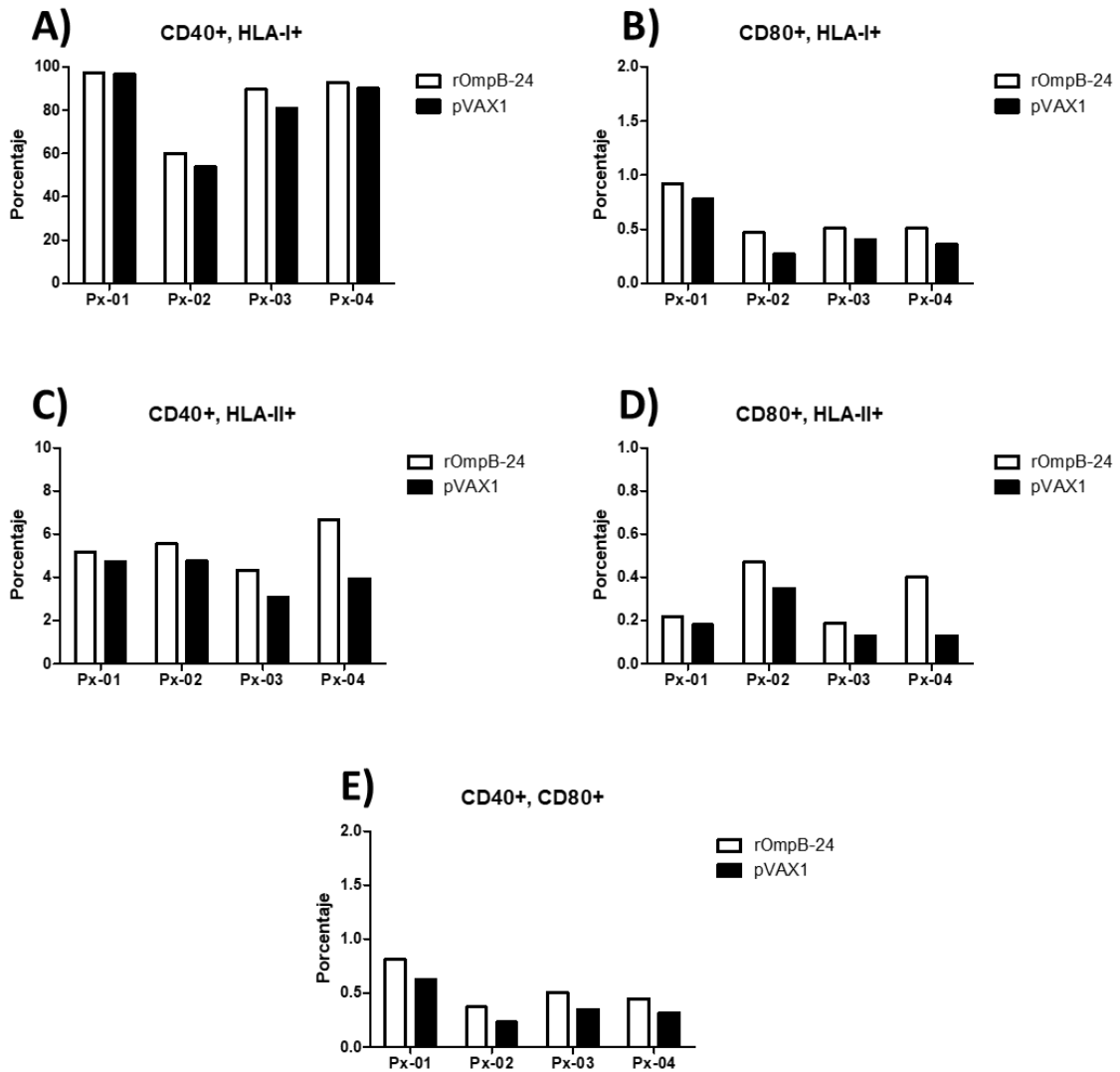


Figura 18. Porcentaje de macrófagos provenientes de muestras de 4 donadores seropositivos a Rickettsiosis transfectados con *rOmpB-24* y *pVAX1*. A) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD40+HLA-I+. B) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD80+HLA-I+. C) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD40+HLA-II+. D) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD80+HLA-II+. E) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD40+CD80+.

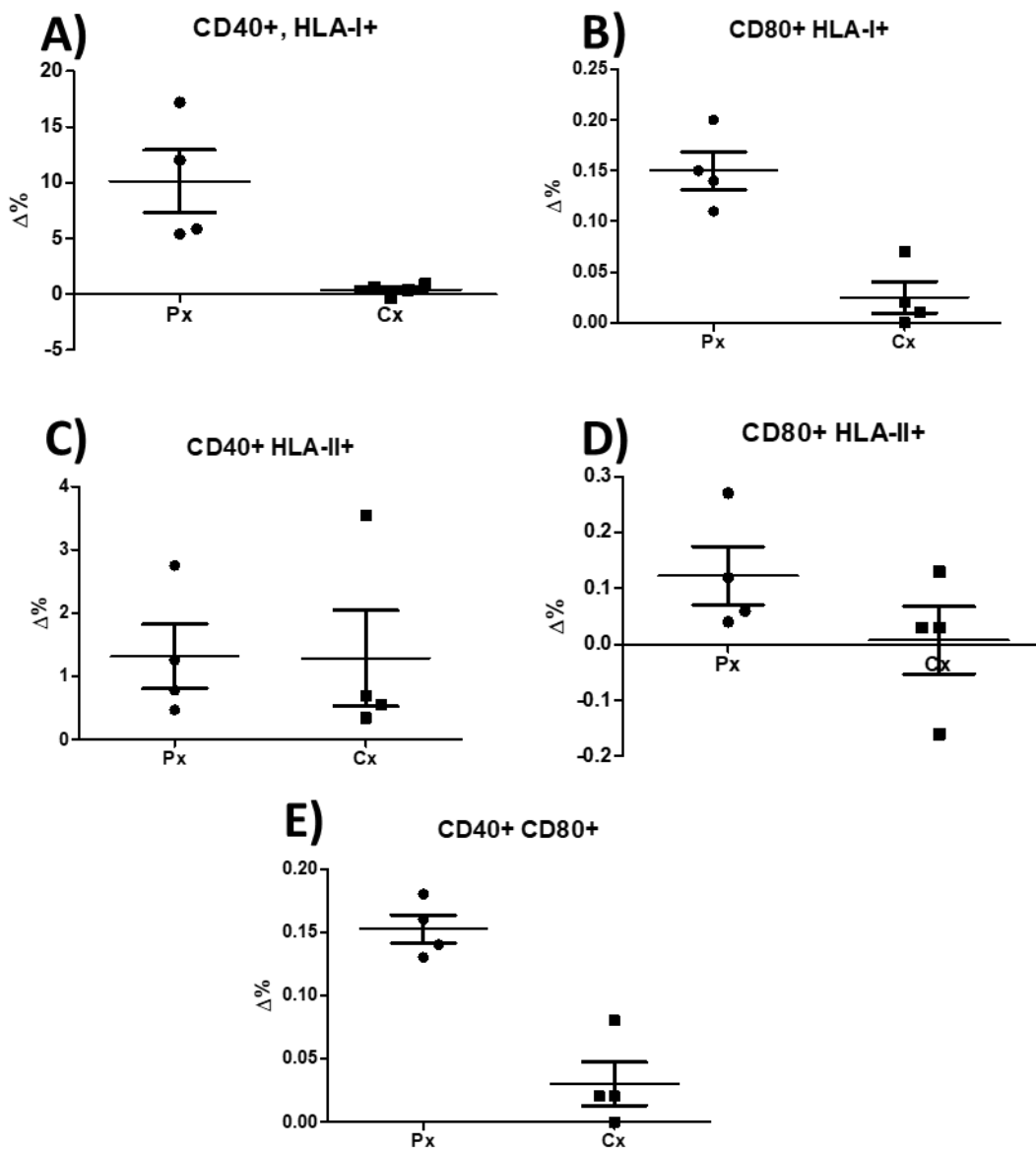


Figura 19. Comparativo de las diferencias de porcentajes de macrófagos provenientes de donadores seropositivos (Px) y seronegativos (Cx) a rickettsiosis transfectados con rOmpB-24 y pVAX1. A) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD40+HLA-I+. B) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD80+HLA-I+. C) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD40+HLA-II+. D) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD80+HLA-II+. E) Porcentaje de macrófagos con fenotipo CD40+CD80+. No existen diferencias significativas para $p < 0.05$.

Análisis proliferativo de linfocitos T.

En la figura 20 se muestra el análisis realizado para obtener los porcentajes de proliferación de los linfocitos co-cultivados por 72 horas con macrófagos transfectados con *rOmpB-24* y *pVAX1*. Los resultados obtenidos sugieren un incremento en el porcentaje de proliferación de linfocitos CD3+CD4+ cuando son estimuladas por macrófagos transfectados con *rOmpB-24* en 3 de 4 muestras de donadores seropositivos (figura 21a). De manera similar, se obtuvo un incremento en los porcentajes de proliferación de linfocitos CD3+CD8+ bajo las mismas condiciones de estímulo en 3 de 4 muestras analizadas (figura 21b). El análisis comparativo entre ambos estímulos mostró ser mayor en linfocitos de donadores seropositivos en contraste con linfocitos de donadores seronegativos. Los resultados sugieren que los linfocitos CD3+CD8+ tienen mayores porcentajes de proliferación que los linfocitos CD3+CD4+. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas (figura 21c).

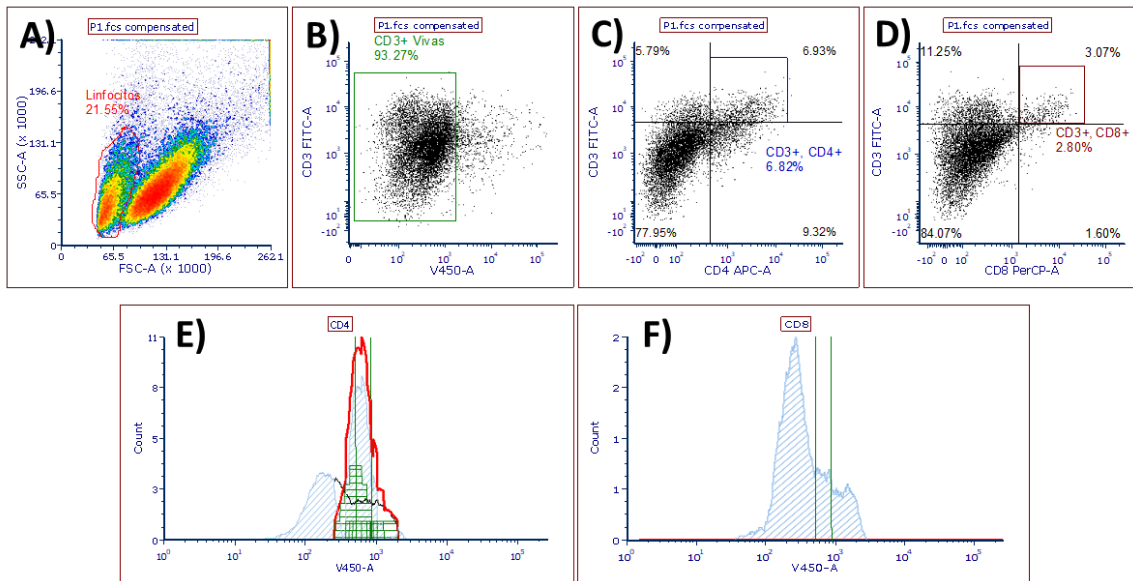


Figura 20. Representación del análisis citométrico de linfocitos mediante gates, dot plots e histogramas. A) Selección de los linfocitos mediante tamaño y granularidad. B) Selección de los linfocitos vivos CD3+. C) Selección de los linfocitos CD3+CD4+. D) Selección de los linfocitos CD3+CD8+. E) Histograma de los linfocitos CD3+CD4+ proliferantes. E) Histograma de los linfocitos CD3+CD8+ proliferantes.

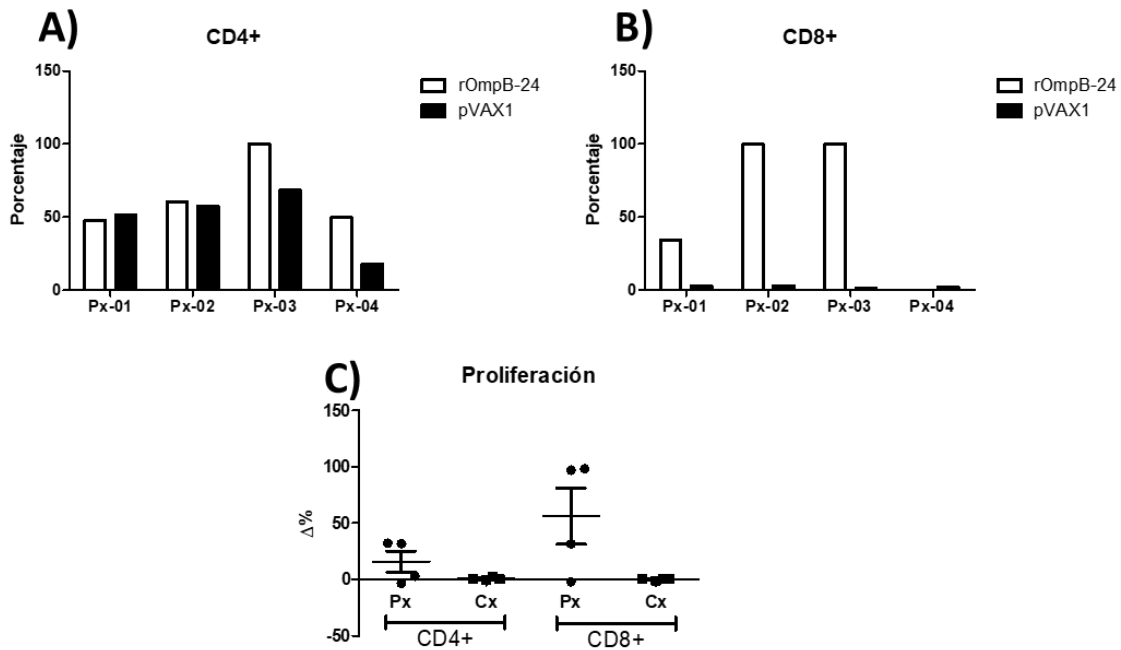


Figura 21. Porcentajes de proliferación de linfocitos estimulados mediante co-cultivo de 72 horas con macrófagos transfectados con *rOmpB-24* y *pVAX1*. A) Porcentaje de proliferación de linfocitos CD3+CD4+. B) Porcentaje de proliferación de linfocitos CD3+CD8+. C) Análisis comparativo de las diferencias de porcentajes de proliferación de linfocitos provenientes de donadores seropositivos (Px) y seronegativos (Cx) a rickettsiosis.

Análisis de poblaciones de linfocitos productores de IFN- γ .

En la figura 22 se presenta el análisis citométrico realizado a los linfocitos después de 72 horas de co-cultivo con macrófagos transfectados con los plásmidos *rOmpB-24* y *pVAX1*. Los resultados mostraron un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ estimuladas por macrófagos transfectados con *rOmpB-24* en 4 de 4 muestras provenientes de donadores seropositivos (figura 23a). Del mismo modo, los resultados mostraron un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ que producen IFN- γ mediante las mismas condiciones de estímulo (figura 23b). El análisis comparativo de ambas condiciones de estímulo sugiere un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ que producen interferón gama en muestras de pacientes seropositivos en contraste con las muestras seronegativas. Los

resultados sugieren que los linfocitos T del fenotipo CD8+ producen más IFN- γ que los linfocitos T CD4+. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas (figura 23c).

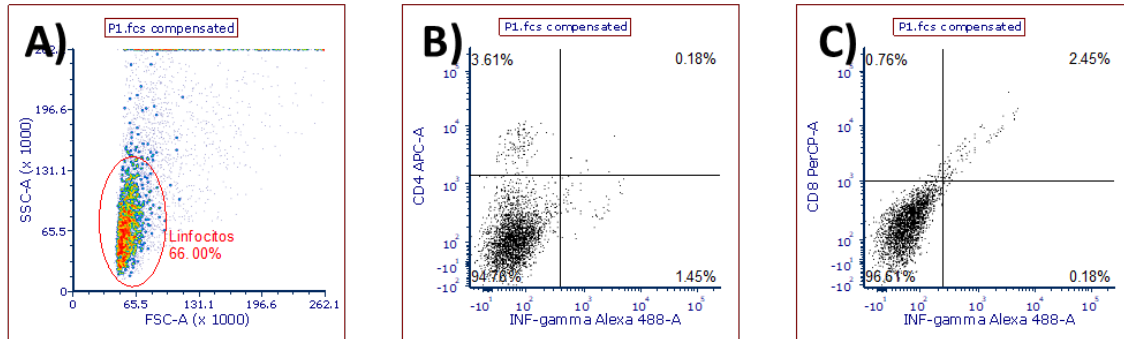


Figura 21. Representación del análisis citométrico de linfocitos mediante dot plots. A) Selección de los linfocitos mediante tamaño y granularidad. B) Selección de los linfocitos CD4+IFN- γ +. C) Selección de los linfocitos CD8+IFN- γ +.

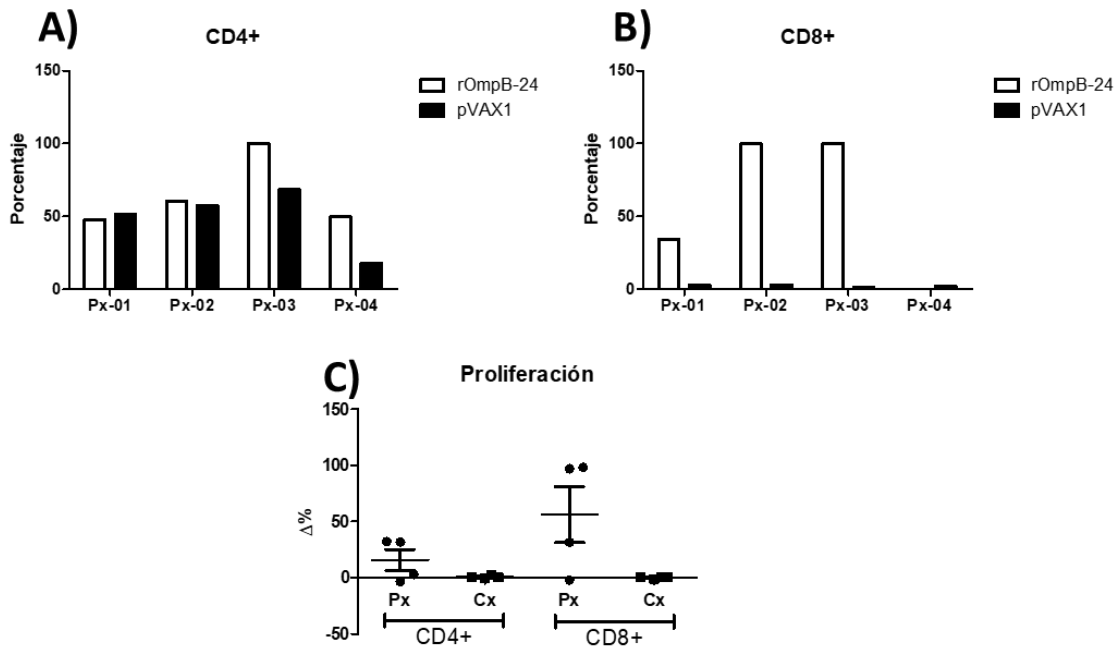


Figura 22. Porcentajes de linfocitos productores de IFN- γ estimulados mediante co-cultivo de 72 horas con macrófagos transfectados con rOmpB-24 y pVAX1. A) Porcentaje de linfocitos CD4+IFN- γ +. B) Porcentaje de proliferación de linfocitos CD8+IFN- γ +. C) Análisis comparativo de las diferencias de porcentajes de linfocitos productores de IFN- γ provenientes de donadores seropositivos (Px) y seronegativos (Cx) a rickettsiosis.

Caracterización de alelos de HLA.

Para la caracterización de los alelos de HLA presente en los genes de los pacientes, se realizó un análisis por PCR de punto final. La presencia y ausencia de los alelos en las muestras fue vaciada en la tabla 3.

Tabla 3. Presencia (+) y ausencia (-) de los diferentes alelos de HLA en las muestras de los sujetos seropositivos (Px) y seronegativos (Cx) a *Rickettsia*.

Muestra	HLA-A02:01	HLA-A24	HLA-B35:01	HLA-B39:01
Px-01	+	-	-	+
Px-02	+	-	+	+
Px-03	+	-	-	+
Px-04	+	-	-	+
Cx-01	+	-	+	-
Cx-02	-	-	+	-
Cx-03	-	-	+	-
Cx-04	-	-	+	-

Para determinar si la presencia o ausencia de los alelos de HLA se correlacionaban con la respuesta inmune obtenida en los ensayos empleando el plásmido *rOmpB-24* se realizó una regresión logística binaria. En la tabla 4 se muestran los datos obtenidos del análisis los cuales no demostraron una relación significativa (95% de confianza) con ninguna de las pruebas realizadas por lo que se puede inferir que no existe una relación estadísticamente significativa entre las variables de la respuesta inmune y la presencia/ausencia de los alelos de HLA.

Tabla 4: Análisis de regresión logística binaria para la correlación de la presencia/ausencia de los alelos de HLA con la respuesta inmune obtenida en las muestras transfectadas con el plásmido *rOmpB-24*. Para un $\alpha=0.05$ no se mostraron evidencias significativas de una correlación.

	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
				Inferior	Superior
Proliferación CD4+	3	.424	.578	.151	2.214
Proliferación CD8+	3	.677	.620	.066	5.844
INF- γ LT CD4+	3	.496	1.427	.513	3.966
IFN- γ LT CD8+	3	.650	.803	.312	2.070
Constante	3	.865	22.478		

VIII. DISCUSIÓN

La evaluación de vacunas de ADN se encuentra limitada a esquemas de inmunización en ratones o en otros animales como los perros, sin embargo, lo novedoso de la metodología aquí propuesta permite tener una aproximación a la inmunoestimulación que se obtendría *in vivo* en humanos.⁵¹⁻⁵³ Estudios de evaluación de candidatos vacunales de ADN contra *Rickettsia* mediante técnicas *in vitro* emplean esquemas de inmunización heteróloga, es decir, se basan en el uso de líneas celulares como medios de presentación antigénica.⁴⁸ La metodología aquí propuesta, provee un panorama de evaluación autólogo basado en las propias células de los pacientes que permiten observar el funcionamiento de los candidatos a vacunas con mayor proximidad al modelo *in vivo* humano, especialmente en enfermedades causadas por patógenos intracelulares, tal es el caso de las bacterias del género *Rickettsia*.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible inducir la expresión de proteínas y moléculas co-estimuladoras de la respuesta inmune en macrófagos mediante la transfección de plásmidos, tal es el caso de *rOmpB-24*. Este método permite comparar la respuesta inmune obtenida entre dos poblaciones (con serología positiva y negativa) y poder observar un incremento en la actividad inmune de los macrófagos y de los linfocitos.

Este método de evaluación de candidatos a vacunas contra *Rickettsia*, comparado con otros métodos, permite obtener información acerca de las poblaciones de linfocitos T que proliferan y que producen IFN- γ , lo cual ofrece un panorama para caracterizar mediante citometría de flujo si el tipo de respuesta inmune inducida por los candidatos a vacunas es de carácter celular (CD8+) o de carácter humoral (CD4+), además, el estudio con un número representativo de muestras permite evaluar si la respuesta inmune está relacionada con los alelos de HLA presentes en las células de los sujetos seropositivos y seronegativos.

IX. CONCLUSIONES

1.- Los resultados sugieren que los macrófagos transfectados con el plásmido *rOmpB-24* inducen una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40 y CD80) y presentadoras de antígeno (HLA-I y HLA-II) comparado con el plásmido *pVAX1* sin inserto.

2.- Los resultados mostraron que el co-cultivo de linfocitos con los macrófagos transfectados con *rOmpB-24* induce una respuesta linfoproliferativa y de producción de IFN- γ mayor comparado con el plásmido *pVAX1*.

3.- Los resultados no mostraron una relación estadísticamente significativa entre la presencia/ausencia de los alelos de HLA en las CMSP de los sujetos seropositivos con la respuesta inmune generada por el plásmido *rOmpB-24*.

4.- Los resultados obtenidos muestran la capacidad de esta estrategia utilizada para detectar la presencia de linfocitos de memoria antígeno-específicos en los sujetos seropositivos a *Rickettsia* lo que sugiere que este plásmido es lo suficientemente inmunogénico para ser considerado un posible candidato para el desarrollo de una vacuna contra *Rickettsia*. Sin embargo, es imprescindible ampliar estos estudios con un mayor número de muestras, de modo que nos permita garantizar que las claras tendencias observadas son realmente significativas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Labruna M et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Rev. MVZ Córdoba 16(2):2435-2457, 2011
- 2.- Valbuena G, Patogénesis de las infecciones producidas por rickettsias en las Américas. Rev. MVZ Córdoba 2010 (15):2004-2006.
- 3.- Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E. The emerging diversity of Rickettsia. Proc Biol Sci 2006; 273:2097–2106.
- 4.- Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. BMC Biol 2009; 7:6.
- 5.- Dantas-Torres F. Rocky Mountain Spotted Fever. Lancet Infect Dis 2007; 7: 724-732.
- 6.- Buckingham SC, Marshall GS, Schutze GE, Woods CR, Jackson MA, Patterson LER, et al. Clinical and laboratory features, hospital course, and outcome of Rocky Mountain Spotted Fever in children. J Pediatr 2007; 150: 180-184.
- 7.- Walker DH. Principles of the malicious use of infectious agents to create terror: reasons for concern for organisms of the genus *Rickettsia*. Ann NY Acad Sci 2003;990:739–42.
- 8.- Centro nacional de programas para la prevención y control de enfermedades CENAPRECE. [En línea]. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PreencionControlRickettsiosis2013_2018.pdf [Consultado el 15 de octubre del 2016].

- 9.- Valdez Vargas N. Caracterización clínica de pacientes con rickettsiosis provenientes del estado de Yucatán [Tesis de Licenciatura]. México: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán; 2015.
- 10.- Chan, Yvonne Gar-Yun, Sean Phillip Riley, and Juan Jose Martinez. "Adherence to and Invasion of Host Cells by Spotted Fever Group *Rickettsia* Species." *Frontiers in Microbiology* 1 (2010): 139.
- 11.- Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nat Rev Microbiol.* 2008 May;6(5):375-86
- 12.- Elizabeth DRC, James ES. Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol Spectr.* 2016 February ; 4(1).
- 13.- Balraj, P., Renesto, P. and Raoult, D. (2009), *Advances in Rickettsia Pathogenicity*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166: 94–105.
- 14.- Gillespie JJ, Kaur SJ, Rahman MS, et al. Secretome of obligate intracellular *Rickettsia*. Dehio C, ed. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015;39(1):47-80.
- 15.- Rahman MS, Ammerman NC, Sears KT, Ceraul SM, Azad AF. Functional Characterization of a Phospholipase A2 Homolog from *Rickettsia typhi*. *Journal of Bacteriology*. 2010;192(13):3294-3303.
- 16.- Reed SCO, Serio AW, Welch MD. *Rickettsia parkeri* invasion of diverse host cells involves an Arp2/3 complex, WAVE complex and Rho-family GTPase-dependent pathway. *Cellular Microbiology*. 2012;14(4):529-545.

17.- Gouin E et al. A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. 1999, 112 (11):1697-1708.

18.- Himanshu K, Taro K and Shizuo A, Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* (2009) 420, 1–16.

19.- Quevedo-Diaz MA, Song C, Xiong Y, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in cell responses to *Rickettsia akari*. *Journal of Leukocyte Biology.* 2010;88(4):675-685.

20.- Jeffrey MJ, Michael EW, Juan O and David HW, The Absence of Toll-Like Receptor 4 Signaling in C3H/HeN Mice Predisposes Them to Overwhelming Rickettsial Infection and Decreased Protective Th1 Responses. *Infect. Immun.* 2008; 76 (8): 3717-3724

21.- Jordan JM, Woods ME, Soong L, Walker DH. *Rickettsiae* stimulate dendritic cells through TLR4, leading to enhanced NK cell activation in vivo. *The Journal of infectious diseases.* 2009;199(2):236-242.

22.- Bechelli J, Smalley C, Zhao X, et al. MyD88 Mediates Instructive Signaling in Dendritic Cells and Protective Inflammatory Response during Rickettsial Infection. Palmer GH, ed. *Infection and Immunity.* 2016;84(4):883-893.

23.- Curto P, Simões I, Riley SP, Martinez JJ. Differences in Intracellular Fate of Two Spotted Fever Group Rickettsia in Macrophage-Like Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2016;6:80.

24.- Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annual review of immunology.* 2013;31:443-473.

26.- Caro-Gomez E, Gazi M, Cespedes MA, Goez Y, Teixeira B, Valbuena G. Phenotype of the Anti-Rickettsia CD8+ T cell Response suggests cellular correlates of protection for the assessment of novel antigens. *Vaccine*. 2014;32(39):4960-4967.

27.- Jan KD, Mogens J, Thor U, Kari O, Arne Y, Stig SF, Jean-Marc R, Bjørn M, Didier R and Pål A, Increased Levels of Soluble CD40L in African Tick Bite Fever: Possible Involvement of TLRs in the Pathogenic Interaction between *Rickettsia africae*, Endothelial Cells, and Platelets, *The Journal of Immunology*, 2006;177(4): 2699-2706.

28.- Walker DH, Dumler JS. The Role of CD8 T Lymphocytes in *Rickettsial* Infections. *Seminars in immunopathology*. 2015;37(3):289-299.

29.- Lauvau G, Soudja SM. Mechanisms of memory t cell activation and effective immunity. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015; 850:73-80.

30.- Walker DH, Olano JP, Feng H-M. Critical Role of Cytotoxic T Lymphocytes in Immune Clearance of Rickettsial Infection. Petri WA, ed. *Infection and Immunity*. 2001;69(3):1841-1846.

31.- H Feng, V L Popov, G Yuoh and D H Walker, Role of T Lymphocyte Subsets in Immunity to Spotted Fever Group Rickettsiae. *J Immunol*;1997 (158): 5314-5320.

32.- Feng H-M, Whitworth T, Popov V, Walker DH. Effect of Antibody on the Rickettsia-Host Cell Interaction . *Infection and Immunity*. 2004;72(6):3524-3530.

- 33.- Hillman RD, Baktash YM, Martinez JJ. OmpA-mediated rickettsial adherence to and invasion of human endothelial cells is dependent upon interaction with $\alpha 2\beta 1$ integrin. *Cellular microbiology*. 2013;15(5):727-741.
- 34.- Flamm H. Spotted fever and the invention of its serodiagnosis and vaccination in the Austro-Hungarian army in World War I. *Wien Med Wochenschr*. 2015 Apr;165(7-8):152-63
- 35.- Blanton LS, Mendell NL, Walker DH, Bouyer DH. "*Rickettsia amblyommii*" induces cross protection against lethal Rocky Mountain spotted fever in a guinea pig model. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014 Aug;14(8):557-62
- 36.- Walker DH. The realities of biodefense vaccines against *Rickettsia*. *Vaccine*. 2009 Nov 5;27 Suppl 4:D52-5
- 37.- Walker DH, Montenegro MR, Hegarty BC, Tringali GR. Rocky Mountain spotted fever vaccine: a regional need. *South Med J*. 1984 Apr;77(4):447-9.
- 38.- Richards AL. Rickettsial vaccines: the old and the new. *Expert Rev Vaccines*. 2004 Oct;3(5):541-55.
- 39.- Development of *Rickettsia prowazekii* DNA vaccine: cloning strategies. Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis. *Vaccine*. 2001 Dec 12;20(5-6):979-88.
- 40.- Jiao Y, Wen B, Chen M, Niu D, Zhang J, Qiu L. Analysis of immunoprotectivity of the recombinant OmpA of *Rickettsia heilongjiangensis*. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec;1063:261-5.

- 41.- Li Z, Díaz-Montero CM, Valbuena G, Yu XJ, Olano JP, Feng HM, Walker DH. Identification of CD8 T-lymphocyte epitopes in OmpB of *Rickettsia conorii*. *Infect Immun*. 2003 Jul;71(7):3920-6.
- 42.- Meng Y, Xiong X, Qi Y, Duan C, Gong W, Jiao J, Wen B. Protective immunity against *Rickettsia heilongjiangensis* in a C3H/HeN mouse model mediated by outer membrane protein B-pulsed dendritic cells. *Sci China Life Sci*. 2015 Mar;58(3):287-96.
- 43.- Feng HM, Whitworth T, Olano JP, Popov VL, Walker DH. Fc-dependent polyclonal antibodies and antibodies to outer membrane proteins A and B, but not to lipopolysaccharide, protect SCID mice against fatal *Rickettsia conorii* infection. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):2222-8.
- 44.- Gong W, Wang P, Xiong X, Jiao J, Yang X, Wen B. Enhanced protection against *Rickettsia rickettsii* infection in C3H/HeN mice by immunization with a combination of a recombinant adhesin rAdr2 and a protein fragment rOmpB-4 derived from outer membrane protein B. *Vaccine*. 2015 Feb 18;33(8):985-92.
- 45.- Dzul K. Desarrollo y evaluación de candidatos a vacunas de ADN contra *Rickettsia rickettsii* seleccionados por análisis *in silico*. México: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán; 2014.
- 46.- Balam J. Evaluación *in vitro* del efecto inmunoestimulante de plásmidos de ADN de *Rickettsia rickettsii* (rOmpA-49, rOmpB-15, rOmpB-24) en co-cultivo de linfocitos de pacientes con diagnóstico positivo a *Rickettsia* y macrófagos transfectados. México: Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán; 2015.
- 47.- pVAX1™ Material Data Sheet No. MAN0000094 Invitrogen™ by Life

TechnologiesTM, (Marzo 2) 2012, <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V26020> (Consultado Diciembre 2016).

48.- Dzul-Rosado K, Balam-Romero J, Valencia-Pacheco G, Lugo-Caballero C, Arias-León J, Peniche-Lara G, Zavala-Castro J. Immunogenicity of OmpA and OmpB antigens from *Rickettsia rickettsii* on mononuclear cells from *Rickettsia* positive Mexican patients. **J Vector Borne Dis** 2017; 54(4):317-327.

49.- Basic Local Alignment Search Tool. En línea en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> [Consultado en 2017].

50.- Gonzalez-Galarza FF, Takeshita LY, Santos EJ, Kempson F, Maia MH, Silva AL, Silva AL, Ghattaoraya GS, Alfirevic A, Jones AR and Middleton D *Nucleic Acid Research* 2015, 28, D784-8.

51.- Yi, G., Xu, X., Abraham, S., Petersen, S., Guo, H., Ortega, N., Shankar, P., ... Manjunath, N. (2017). A DNA Vaccine Protects Human Immune Cells against Zika Virus Infection in Humanized Mice. *EBioMedicine*, 25, 87-94.

52.- Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramirez-Sierra MJ, Cruz-Chan JV, VanWynsberghe NR, Dumonteil E Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine*. 2010 Oct 28;28(46):7414-9

53.- Cruz-Chan JV, Aguilar-Cetina Adel C, Villanueva-Lizama LE, Martínez-Vega PP, Ramírez-Sierra MJ, Rosado-Vallado ME, Guillermo-Cordero JL, Dumonteil E. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. *Parasit Vectors*. 2014 Aug 9;7:361.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del comité de bioética.

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN			
 Mérida, Yucatán, México, a 19 de octubre de 2018			
DICTAMEN			
OFICIAL	FECHA:	NÚMERO (ID):	PROTOCOLO:
	Evaluación 19/10/2018	CEI-05-2017	INVESTIGACIÓN
TÍTULO:	CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOESTIMULACIÓN IN VITRO INDUCIDA POR DOS PLÁSMIDOS CANDIDATOS A VACUNAS CONTRA RICKETTSIA (ROMPA-49 Y ROMPB-24) EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANAS.		
RESPONSABLES:	Dra. Karla Rossanet Dzul Rosado		
Adscripción donde se realizará el estudio:	Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán		
Teléfonos:	9999245755 ext. 1150	Correo-e:	karla.dzul@correo.uady.mx
Observaciones acerca del protocolo			
<p>Este proyecto fue evaluado de forma colegiada y con apego a las normas y leyes vigentes internacionales y de nuestro país. Se aprueba la solicitud de modificación de título al de Caracterización de la inmunestimulación <i>in vitro</i> inducida por el plásmido rOmpB-24 candidato a vacuna contra <i>Rickettsia</i> en células mononucleares de sangre periférica humanas.</p>			
DICTAMEN:	APROBADO		

Anexo 2. Carta de Consentimiento Informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO		
<p>De acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y con la ley general de salud, título segundo. De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos Capítulo 1 Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el artículo 21</p>		
Lugar y Fecha	_____	
Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:		
Caracterización de la inmunoestimulación <i>in vitro</i> inducida por dos plásmidos candidatos a vacunas contra <i>Rickettsia</i> (rOmpA-49 y rOmpB-24) en células mononucleares de sangre periférica humanas.		
Registrado con el número:	_____	
El objetivo del estudio es:	Caracterizar la inmunoestimulación <i>in vitro</i> inducida por plásmidos candidatos a vacunas contra <i>Rickettsia</i> (rOmpA-49 y rOmpB-24) en células mononucleares de sangre periférica humanas.	
Se me ha explicado que mi participación consistirá en:	Que se me realice una punción venosa para llevar a cabo la identificación y caracterización del patógeno involucrado en el proceso infeccioso, así mismo los estudios de estimulación con los antígenos rickettsiales para medir la producción de IFN- γ y dar cumplimiento a un objetivo particular planteado en el proyecto.	
Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:		
<p>El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.</p>		

Nombre y firma del paciente		

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.		
Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:		

Testigos	_____	
	_____	_____

