



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN**

**COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO**

**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA  
ROTAVIRUS INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS TIPO  
INTESTINAL EN UN MODELO *IN VITRO***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA**

**LN. RICARDO ABAD BALBUENA SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ-GUERRERO**

Cuernavaca, Morelos, México. Octubre 2022

Cuernavaca, Morelos, México. Octubre 2022.

**Miembros del comité tutorial.**

Tutor principal:

Dra. Delia Vanessa López-Guerrero.

Tutor personal:

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama.

Sinodales:

Dr. Gustavo Pedraza Alva.

Dra. María Angélica Santana Calderón.

Dr. Miguel Cortés Hernández.

**Miembros del jurado de examen.**

Presidente: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Secretario: Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

1er. Vocal: Dra. María Angélica Santana Calderón

2do. Vocal: Dr. Miguel Cortés Hernández

3er. Vocal: Dra. Delia Vanessa López Guerrero

**Agradecimiento de fuentes de financiamiento:**

Este trabajo recibió apoyo del CONACyT a través del proyecto A1-S-27280 y del programa de becas nacionales 2020 del CONACyT, gracias a este apoyo se logró la obtención del grado de Maestro en Medicina Molecular, por parte de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Quiero agradecer en primer lugar mis padres, porque a pesar de mis tropiezos siempre me han mostrado su apoyo, por nunca haberme limitado y alentarme a cumplir mis metas, por simplemente estar ahí siempre.*

*A mi directora de tesis, Dra. Delia Vanessa López-Guerrero, por apoyarme desde hace más de 5 años, por permitirme seguir miembro de su laboratorio, por creer en mí y mis capacidades, gracias por todo.*

*Al Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, por permitirme trabajar en su laboratorio, brindarme de sus conocimientos y ayudarme a mejorar académica y personalmente.*

*De igual manera quiero dar mi agradecimiento al Dr. Gustavo Pedraza Alva y la Dra. María Angélica Santana Calderón, miembros de mi comité tutorial, por todas sus observaciones y apoyo brindado.*

*A mis amigas y compañeras de laboratorio Yael, Alice y Giovanna, por brindarme su amistad dentro y fuera del laboratorio. Por esas pláticas y discusiones de artículos que me permitieron aclarar dudas.*

*A Karina por haberme enseñado diferentes técnicas, a preparar mis reactivos, por su amistad y paciencia en todos los momentos que me ayudó.*

*A mis queridas amigas Kari y Mariana, que, aunque convivimos poco tiempo dentro del laboratorio, se convirtieron en mis grandes amigas y con sus elocuencias alegraban mis días.*

*A todas las personas que me acompañaron y apoyaron durante este tiempo, las que siguen aquí y las que se fueron, porque de alguna forma su compañía siempre fue importante para mí.*

*A los ratoncitos, por ser los superhéroes de todos los días, porque sin ellos el avance en gran parte de la ciencia no sería posible.*

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Sistema inmune.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Inmunidad innata.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Inmunidad de mucosas.....	10
1.2.2 Células dendríticas.....	12
1.2.3 Células dendríticas intestinales.....	15
<b>1.3 Inmunidad adaptativa.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Células T.....	20
<b>1.4 Modelos de generación de células dendríticas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>23</b>
1.4.1 Modelos para el estudio de células dendríticas intestinales.....	23
<b>1.5 Respuesta inmune en infecciones virales.....</b>	<b>25</b>
1.5.1 Células dendríticas e infecciones virales.....	28
<b>1.6 Rotavirus.....</b>	<b>29</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>32</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>34</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Objetivo general.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6.1 Ratones.....</b>	<b>37</b>
<b>6.2 Extracción de células de médula ósea de ratón.....</b>	<b>37</b>
<b>6.3 Diferenciación de precursores de médula ósea a células dendríticas tipo     intestinales.....</b>	<b>38</b>
6.3.1 Estimulación de células dendríticas derivadas de la médula ósea y carga de antígenos de rotavirus.....	38
<b>6.4 Purificación de ARN.....</b>	<b>39</b>
6.4.1 Obtención de cDNA.....	39
6.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
<b>6.5 Citofluorometría.....</b>	<b>41</b>

6.6 Obtención de células T CD4 <sup>+</sup> de bazo de ratón. ....	42
6.7 Ensayo de proliferación. ....	43
6.8 Determinación de TNF- $\alpha$ por ELISA. ....	44
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
7.1 Generación de DC y DCi <i>in vitro</i> a partir de precursores de MO. ....	45
7.2 Generación y caracterización de las DC derivadas de MO en presencia de AR. 46	
7.3 Detección de citocinas en DC y DC-AR mediante PCR punto final y ELISA. 48	
7.4 Los co-cultivos de células T con DC-AR tuvieron una menor producción de TNF. 50	
7.5 Proliferación de células T específicas contra rotavirus en presencia de DC y DC-AR cargadas con la proteína VP6 y el péptido 289-310 de rotavirus.....	52
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS. ....</b>	<b>76</b>
Protocolo GM-CSF Gibco. ....	76
Protocolo inmunoensayo ELISA TNF- $\alpha$ . ....	78
Constancias de asistencia a cursos durante la maestría. ....	81
Constancia de presentación de proyecto en congreso. ....	87

## ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Aldh1a2	Aldehído deshidrogenasa 2
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
BCR	Receptor de células B
cDC1	Células dendríticas clásicas tipo 1
cDC2	Células dendríticas clásicas tipo 2
CFSE	Carboxifluorosceína
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Célula dendrítica
DC-AR	Células dendríticas cultivadas con ácido retinoico
DCTi	Células dendríticas tipo intestinales
ELISA	Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
IFN	Interferón
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad de tipo 1
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de tipo 2
NALT	Tejido linfoide asociado a nasofaringe
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RAR	Receptor de ácido retinoico
RIA	Respuesta inmune adaptativa
RII	Respuesta inmune innata
RV	Rotavirus
TCR	Receptor de célula T
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor similar a toll
TNF	Factor de necrosis tumoral

## RESUMEN.

**Introducción:** Las células dendríticas (DC) intestinales son el vínculo entre las células de la respuesta inmune innata y de la respuesta inmune adaptativa, además de que tienen la capacidad de inducir un ambiente altamente tolerogénico generando poblaciones de células T reguladoras mediante la producción de ácido retinoico (AR). El AR tiene un papel inmunoregulador y se ha observado que cuando está presente durante el desarrollo de las DC aumenta la expresión de la integrina CD103, molécula que permite la interacción directa con células epiteliales. Además, la presencia de AR, aumenta la síntesis de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 o retinaldehído deshidrogenasa 2 (Aldh1a2 o RALDH2), haciendo que las DC aumenten su producción de AR a partir del retinol proveniente de la dieta. Las DC intestinales, una vez activadas, favorecen la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  en las células T, citocinas indispensables para mantener el estado tolerogénico en el intestino. Debido a su importancia, el estudio de la respuesta de las DC intestinales es imprescindible para comprender los mecanismos de inducción de tolerancia e inflamación en el ambiente intestinal, sin embargo, es muy complicado debido a que esta población representa del 2-5% del total de las células en esta zona, presentando una gran variabilidad en el intestino, además de que su extracción es difícil debido a la naturaleza del tejido. Por esta razón se han desarrollado estrategias para la generación de modelos *in vitro* a partir de precursores de médula ósea que permitan el estudio de las DC intestinales bajo diferentes estímulos antigénicos, en presencia de adyuvantes y células T.

**Objetivo:** Evaluar el perfil de la respuesta producida en células T específicas contra la proteína VP6 de rotavirus co-cultivadas con DC tipo intestinales generadas *in vitro* a partir de precursores de médula ósea en presencia de AR.

**Materiales y métodos:** Se generaron DC a partir de células de médula ósea de ratón de la cepa BALB/c utilizando GM-CSF y AR para la diferenciación. Mediante PCR tiempo final se demostró la presencia de ARNm para la enzima Aldh2 y por citofluorimetría la presencia de los marcadores CD11c y CD103 característicos de la población de DC intestinales. Posteriormente las células diferenciadas fueron cargadas con la proteína VP6 de rotavirus. Por otra parte, células T CD4<sup>+</sup> específicas contra rotavirus fueron obtenidas de bazo de

ratones previamente inmunizados con rotavirus y fueron purificadas positivamente utilizando un anticuerpo anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas y utilizando una columna de MACS. Posteriormente fueron marcadas con CFSE y se co-cultivaron con las DC previamente cargadas con los antígenos virales. La proliferación fue analizada por citofluorometría de flujo mediante tinción con CFSE y las citocinas producidas en el sobrenadante por medio de un kit de ELISA.

**Resultados:** Los co-cultivos de células T CD4<sup>+</sup> específicas contra rotavirus con DC tipo intestinal cargadas con la proteína VP6 de rotavirus mostraron una menor proliferación de células T y una disminución en la producción de TNF- $\alpha$ .

**Conclusión:** Las DC tipo intestinal generadas *in vitro* inducen una menor proliferación y producción de TNF- $\alpha$  en las células T específicas contra rotavirus, en comparación con las DC derivadas de médula ósea convencionales.

# **1. INTRODUCCIÓN.**

## **1.1 Sistema inmune.**

El sistema inmune es un conjunto de órganos, células y moléculas que tienen la finalidad de mantener la homeostasis y proteger al organismo a través de distintas barreras como la piel, las mucosas, la secreción de moléculas dirigidas a la eliminación de agentes extraños y/o la generación de células específicas ante la presencia de algún agente potencialmente patógeno que pudiera comprometer la salud del organismo. El sistema inmune permite generar una respuesta protectora ante los retos inmunogénicos, así como inducir tolerancia hacia los antígenos ambientales inocuos al organismo. Existen dos estrategias para generar inmunidad, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, siendo esta última la más reciente desde el punto de vista evolutivo, presentándose únicamente en vertebrados aumentando la longevidad, por lo que se necesitó desarrollar una memoria inmunológica a largo plazo que protegiera ante futuros contactos con el mismo patógeno (Gasteiger et al., 2017; Kaur & Secord, 2019., Punt et al., 2020).

## **1.2 Inmunidad innata.**

La inmunidad innata consiste en un conjunto de moléculas y células que constituyen la primera defensa de un organismo ante un agente extraño. Dentro de los componentes de este sistema podemos encontrar barreras físicas (como la piel y mucosas) y químicas (como el ácido del estómago o el pH de la piel), de este modo la respuesta inmune innata (RII) se encarga de proteger contra una gran variedad de microorganismos potencialmente patógenos. La inmunidad innata celular comienza casi de manera instantánea, después de haber reconocido a un agente extraño, gracias a que las células de la respuesta innata poseen receptores celulares que les permiten reconocer moléculas conservadas presentes principalmente sobre los organismos patógenos y señales de daño causadas en las células. Estas moléculas son denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Una vez reconocido el antígeno, ya sea

libre o a partir de células infectadas, este es fagocitado para su eliminación y durante este proceso se lleva a cabo la presentación de antígeno sobre las moléculas del MHC a los linfocitos T, mecanismo necesario para iniciar la respuesta inmune específica. Así mismo, las células de la inmunidad innata poseen receptores intracelulares que les permiten reconocer moléculas presentes en infecciones intracelulares y desencadenar una respuesta inflamatoria con la finalidad de eliminar estos patógenos. Dentro de los principales receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), se encuentran los TLRs y los NLRs, los cuales tienen un papel muy importante en la activación de la respuesta inmune celular (Gasteiger et al., 2017; Kaur & Secord, 2019; Rusek, Wala, Druszczyńska, & Fol, 2018; Punt et al 2020). Una vez que los patógenos son reconocidos y fagocitados por las células fagocíticas (como macrófagos y DC) son procesados y presentados en pequeños péptidos sobre su superficie en asociación con las moléculas del MHC, y bajo este contexto, son reconocidos de manera específica por las células T del sistema inmune adaptativo. El proceso de presentación de antígeno es un mecanismo presente en todas las células nucleadas del organismo, el cual permite exponer sobre su superficie péptidos generados de las propias proteínas celulares, asociados a moléculas del MHC de clase I, este procesamiento se conoce como la vía endógena y es requerido para que las células T CD8<sup>+</sup> sean activadas. Las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) son un grupo de células que tienen la capacidad de presentar antígenos propios unidos a moléculas del MHC de clase I y por otro lado son células capaces de endocitar o fagocitar agentes extraños, degradarlos y presentarlos en forma de péptidos unidos a moléculas del MHC de clase II, este complejo es necesario para activar a las células T CD4<sup>+</sup>, esta vía se conoce como vía exógena y solo las APC tienen la capacidad de llevarla a cabo (Guermonprez et al., 2002; Kirkling et al., 2018).

En la vía endógena los antígenos son degradados en péptidos en el citosol por el proteasoma, posteriormente los péptidos son transportados al lumen del retículo endoplasmático rugoso donde chaperonas los unirán a moléculas del MHC-I. En la vía exógena los antígenos capturados serán degradados en péptidos dentro de un endosoma o un fagosoma, posteriormente los péptidos se unirán a moléculas del MHC-II dentro de la misma vesícula endocítica donde los péptidos desplazan a la molécula CLIP para formar el complejo MHC-péptido. Otra vía de presentación de antígenos es la presentación cruzada, en esta los antígenos procesados por vía exógena serán presentados unidos a moléculas del MHC-I para

ser reconocidos por las células T CD8<sup>+</sup> y por otro lado, antígenos endógenos pueden ser presentados en moléculas del MHC-II y activar células T CD4<sup>+</sup>, de esta manera la inmunidad innata tiene un papel importante la activación de la inmunidad adaptativa lo que permite la eliminación de patógenos (Ferris et al., 2020; Kirkling et al., 2018; Wohn et al., 2020). La inmunidad innata posee otras estrategias para la eliminación de patógenos, como lo son la producción de péptidos antimicrobianos y la activación del sistema de complemento por la vía de las lectinas. Los péptidos antimicrobianos tienen la capacidad de eliminar bacterias, hongos y virus, algunos ejemplos son las defensinas. El sistema del complemento es un conjunto de proteínas que pueden ser activadas por componentes del sistema inmune innato (lectina de unión a manosa) y adaptativo (inmunoglobulinas). Las proteínas pertenecientes al sistema de complemento se activan en forma de cascada y tienen la capacidad de unirse a la membrana de patógenos, donde formaran el complejo de ataque a membrana (MAC), el cual formará poros en la membrana de los patógenos y de esta manera será eliminado. Así mismo, la producción de quimiocinas y enzimas como la lisozima permite la eliminación de los agentes extraños. La activación del sistema inmune innato desencadena una respuesta inflamatoria cuya finalidad es la eliminación del agente patógeno y la posterior reparación del daño celular (Kaur & Secord, 2019; Rusek et al., 2018; Punt et al., 2020).

### 1.2.1 Inmunidad de mucosas.

Las mucosas son el principal sitio de entrada para agentes extraños ya que se encuentran en contacto directo con el medio ambiente, por esta razón el sistema inmune en esta zona debe de estar altamente vigilado y regulado. Debido a esta constante exposición, es importante que el sistema inmune de las mucosas desarrolle características especiales que le permitan establecer una respuesta inmune ante agentes patógenos y tolerancia hacia los antígenos alimenticios y microorganismos comensales que no comprometen la salud del organismo. El sistema inmune de las mucosas recibe el nombre de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), este se encuentra en las superficies de las mucosas y se encarga de regular la respuesta inmune en estas zonas. El MALT puede ser dividido en: tejido linfoide asociado al intestino (GALT), tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) y tejido linfoide asociado a

nasofaringe (NALT) (Sánchez & Villa, 2015; Punt et al., 2020). En el caso del GALT, posee características especiales ya que además de estar constantemente expuesto a antígenos provenientes de la dieta también se encuentra expuesto a la microbiota intestinal, la cual se encuentra constituida por miles de microorganismos entre virus, bacterias arqueas y hongos, la cual es necesaria para mantener la salud del organismo. Debido a esto, es importante que la respuesta inmune a nivel intestinal establezca una tolerancia ante estos organismos pero que al mismo tiempo sea capaz de diferenciar y reaccionar ante organismos patógenos. Las paredes del tracto gastrointestinal están conformadas por dos capas: la mucosa y la submucosa. Así mismo la mucosa se compone de dos capas, una capa de células epiteliales y la *lámina propia* donde se pueden encontrar células del sistema inmune, capilares y vasos linfáticos (Punt et al., 2020). La inmunidad a nivel intestinal comienza con el contacto constante con la microbiota, la cual compete con agentes patógenos por los nutrientes impidiendo así su crecimiento. A nivel intestinal existen varios tipos de células que tienen la capacidad de brindar protección por diferentes mecanismos, un ejemplo son las células calciformes que son encontradas mayormente en el intestino grueso y tienen la capacidad de secretar moco y producir péptidos antimicrobianos con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismos. Las células microplegadas (M) se encuentran principalmente en el intestino delgado y se encuentran en contacto directo con el lumen intestinal, por lo tanto, con la microbiota y los alimentos. Estas células tienen la capacidad de transportar antígenos del lumen al interior de las PP y de establecer una comunicación con las células del sistema inmune ahí presentes, en donde se encuentran las células dendríticas capaces de presentar antígeno a células T residentes (Delia V. Lopez-Guerrero et al., 2010), linfocitos B productores de inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina secretada en el lumen intestinal cuya función es bloquear tanto organismos comensales como a potenciales patógenos. Las células de Paneth, son células del intestino que se encuentran en las criptas intestinales y secretan péptidos antimicrobianos con la finalidad de proteger el epitelio intestinal (Punt et al., 2020).

En condiciones normales, las mucosas presentan un ambiente tolerogénico. En el caso del intestino, la secreción de la citocina antiinflamatoria TGF- $\beta$ , la producción de ácido retinoico (AR) y la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) programan a las APCs para que induzcan una diferenciación de las células T naïve en células T reguladoras (T<sub>REG</sub>), manteniendo así el

ambiente tolerogénico mediante la secreción de interleucina 10 (IL-10) y TGF- $\beta$ . Las células más importantes para el mantenimiento de la homeostasis a nivel intestinal son: células dendríticas, células T<sub>REG</sub>, células B secretoras de IgA, células Th foliculares (T<sub>FH</sub>), células T<sub>H</sub>17, las células linfoides innatas (ILC) y los linfocitos intraepiteliales (IEL) (Aliberti, 2016; Sánchez & Villa, 2015; Punt et al., 2020).

### 1.2.2 Células dendríticas.

Las DC son un grupo celular muy heterogéneo, con distintas subpoblaciones de células con una gran capacidad endocítica conocidas como las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) más potentes. Las DC tienen la capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos propios y extraños a células T, lo que las convierte en células de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis ya que, por un lado, pueden contribuir en la prevención de una respuesta autoinmune y, por otro lado, pueden presentar antígenos provenientes de agentes patógenos y activar la respuesta adaptativa. En 1868 Paul Langerhans descubrió este tipo de células en la piel, sin embargo, pensó que se trataban de un tipo de células nerviosas. No fue sino hasta 1973 que Ralph Steinman y Zanvil A. Cohn, tras 3 años estudiando estas células, que comenzaron a llamarlas células dendríticas (Vázquez et al., 2012). Los trabajos de Steinman se centraron en demostrar que las DC no eran únicamente células accesorias y que tenían un papel fundamental en la respuesta inmune. Sus estudios demostraron que las DC eran altamente eficaces en la activación de las células de bazo a través de las proteínas presentes en su membrana hoy conocidas como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y clase II (MHC-I, MHC-II) y moléculas coestimuladoras. Estos hallazgos establecieron el punto de partida para investigaciones posteriores, de tal forma que hoy en día se sabe que las DC son el punto de unión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, lo que actualmente las vuelve en un campo de investigación relevante con distintos objetivos principalmente en modelos que nos permitan tener un mayor conocimiento de la respuesta inmune y el diseño de mejores tratamientos para algunas enfermedades (Fucikova et al., 2019; Reyes Martín et al., 2013; Vázquez et al., 2012).

Las DC se han ido clasificando a lo largo del tiempo, tomando en cuenta distintas características. Se clasifican con base en la región en la que se encuentren (piel, intestino, pulmón, etc.), dependiendo su origen (mieloide o linfoide) o sus funciones. Sin embargo, la forma más aceptada actualmente para la clasificación de las DC es la expresión diferencial de diferentes marcadores que expresan en la membrana plasmática. Todas las DC tienen la capacidad de expresar moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II y moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40. Además, también cuentan con diferentes marcadores en su superficie y receptores de quimiocinas (Gardner, de Mingo Pulido, & Ruffell, 2020; Kaur & Secord, 2019; Qian & Cao, 2018; Punt et al. 2020). Las DC de origen mieloide son originadas a partir de progenitores hematopoyéticos medulares CD34+ gracias a la acción de la proteína tirosina cinasa similar a FMS (Flt3) y por el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Estas dos citocinas inicialmente inducirán la formación de un progenitor común de célula dendrítica el cual saldrá de la médula ósea y continuará desarrollándose en la circulación hasta formar una célula dendrítica inmadura (DCi) capaz de alojarse en una zona específica. Esta DCi tendrá la característica de tener una gran capacidad para capturar antígenos y una vez que haya captado alguno comenzará a madurar hacia un fenotipo de presentación de antígenos donde la expresión de moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras en la superficie aumentará. Diversas investigaciones han establecido modelos *in vitro* para la obtención de DC a partir de precursores de células de médula ósea, monocitos y granulocitos al ser expuestos a una combinación de citocinas en las que se incluya GM-CSF, FLT3 e IL-4 (esta última no es indispensable para la diferenciación de DC de ratón) (Vázquez et al., 2012). Las células precursoras de DC poseen receptores de quimiocinas CCR1, CCR5 y CCR6 que les permiten moverse una vez que salen de la médula ósea hacia diferentes tejidos (bazo, hígado, pulmón, corazón, riñones y mucosas) donde se encuentran sus ligandos. Una vez establecidos en esos tejidos comienzan con su función de captación y presentación de antígenos (Qian & Cao, 2018; Stagg, 2018; Vázquez et al., 2012; Punt et al. 2020).

Las DC, macrófagos, neutrófilos y células cebadas, son los encargados de establecer la primera respuesta inmune celular contra agentes extraños con el fin de eliminar o disminuir la amenaza. Por otro lado, las DC comenzarán con el procesamiento y presentación de antígenos para la activación de la respuesta inmune adaptativa, misma que protegerá en

futuros encuentros contra ese patógeno. Las DC inmaduras tienen como función principal la captación de grandes cantidades de antígenos mediante pinocitosis, fagocitosis o por endocitosis mediada por algunos receptores. Estos antígenos pueden provenir de bacterias, virus, células necróticas o apoptóticas, proteínas o inmunocomplejos (Qian & Cao, 2018; Vázquez et al., 2012; Punt et al. 2020). Una vez que han captado estos antígenos, las DC maduran y aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, así como citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, INF $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , entre otras, dependiendo el tipo de DC y tipo de estímulo. Cuando las DC comienzan a madurar sufren un cambio de fenotipo de captación de antígenos a uno de presentación de antígenos en el que disminuye la expresión de PPRs. Además, también puede disminuir la expresión de CCR1 y CCR5 y aumentar la expresión de CCR7 y CCR9, los cuales pueden encontrar su ligando en los ganglios linfáticos. Gracias a esto las DC tienen la capacidad de viajar a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos, donde presentaran al antígeno captado y procesado asociado a las moléculas del MHC-I o MHC-II. Los péptidos generados durante el procesamiento del antígeno pueden unirse a moléculas del MHC clase II (reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup>). Este complejo será reconocido por el receptor de células T (TCR) y será el primero de los tres estímulos necesarios para la activación de la célula T naïve. Posteriormente se llevará a cabo una segunda señal por parte de las moléculas coestimuladoras que pueden ser CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 y CD86, las cuales interactúan con el receptor linfocitario CD28. Por último, la tercer señal fundamental en el inicio de la respuesta inmune adaptativa es la producción de citocinas, las cuales dependerán del tipo de estímulo que activó e hizo madurar a la DC (Gardner et al., 2020; Hasegawa & Matsumoto, 2018; Kaur & Secord, 2019; Qian & Cao, 2018; Vázquez et al., 2012; Punt et al., 2020). La respuesta de los linfocitos T generada por las DC puede verse influenciada por la concentración de complejos MHC-péptido presentes en la superficie de la DC, la afinidad del receptor de la célula T por MHC-antígeno, el tiempo de interacción de la DC con el linfocito, la maduración de la DC (células inmaduras producen una respuesta de menor duración) y el estímulo que hizo madurar a la DC. Las interleucinas secretadas por la DC definen el tipo de respuesta de células T, linfocitos expuestos IL-12, IL-18 e INF- $\gamma$  se activarán hacia un perfil tipo Th1; los expuestos a TGF- $\beta$  e IL4 a un perfil tipo Th2; si son expuestas a IL-6, IL-23 y TGF- $\beta$  tendrán un perfil tipo Th17; y si se exponen a IL-2 y TGF-

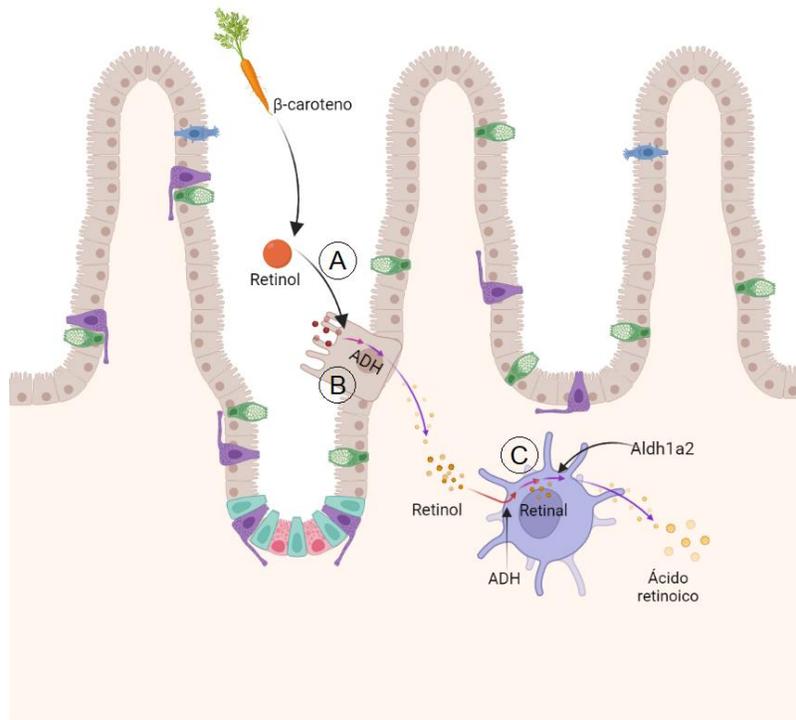
$\beta$  establecerán un perfil tipo T<sub>REG</sub>. Las citocinas producidas por las DC dependen del subtipo de célula, de su localización, la cantidad de antígeno captado y del tipo de estímulo que las hace madurar (Hasegawa & Matsumoto, 2018; Vázquez et al., 2012; Punt et al., 2020).

### 1.2.3 Células dendríticas intestinales.

Debido a la constante exposición con antígenos externos, incluyendo microorganismos y antígenos provenientes de los alimentos, el intestino posee un sistema inmune con características particulares como la capacidad de reaccionar de manera diferencial a agentes que puedan poner en riesgo al organismo. El GALT, es un sistema altamente regulado, ya que tiene la capacidad de distinguir entre los productos necesarios para el mantenimiento de las funciones metabólicas normales (nutrientes, por ejemplo) y aquellos agentes que puedan poner en riesgo la salud. Las DC intestinales poseen características especiales que les permiten interactuar, capturar y procesar un gran cantidad de antígenos que entran en contacto a través de las placas de Peyer y establecer una tolerancia (Stagg, 2018; Tian Sun et al., 2020). En el intestino, las DC pueden encontrarse distribuidas en los ganglios linfáticos mesentéricos, en las placas de Peyer y en la lámina propia, donde tienen un papel importante en la captación y presentación de antígenos a células T. A nivel intestinal existen distintas poblaciones de células dendríticas intestinales (DC<sub>i</sub>) que pueden ser clasificadas tomando en cuenta su origen, sus funciones o la expresión de diferentes marcadores presentes en su superficie, siendo sus marcadores la principal forma de clasificar a las DC<sub>i</sub> (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Nakawesi et al., 2020; Stagg, 2018; Steimle & Frick, 2016; Tian Sun et al., 2020). Las poblaciones de DC en el intestino se clasifican en dos grupos, células dendríticas clásicas tipo 1 (cDC1) y células dendríticas clásicas tipo 2 (cDC2), tomando en cuenta la expresión del marcador CD11b, las cDC1 no lo expresan, mientras que las cDC2 sí. La expresión de CD11b se ha relacionado con DC que durante su desarrollo expresan el factor de transcripción de interferón 4 (IRF4). Así mismo, tanto las cDC1 como las cDC2 pueden presentar el marcador CD103 (integrina  $\alpha$ E) característico de mucosas, este marcador se une a E-cadherina y le da la capacidad a la DC de extender sus dendritas a través del epitelio intestinal, para capturar antígenos del lumen sin comprometer su integridad. En

conjunto, cDC1 y cDC2 trabajan en el mantenimiento de la homeostasis intestinal promoviendo un ambiente tolerogénico en condiciones normales. Diversas investigaciones han mostrado el rol que tienen los diferentes tipos de DC, Flores-Langarica A. et al en el 2018 utilizando un modelo de respuesta inmune intestinal con flagelina soluble de *Salmonella* (sFlic), mostraron que las cDC2 tienen un papel importante en la inducción de la respuesta Th2 y Th17. Además, mostraron que son necesarias para la activación de las células B intestinales para la generación de anticuerpos IgA e IgG. Esto lo comprobaron, ya que observaron que tras un encuentro secundario con sFlic ratones carentes de cDC2 tenían niveles de IgG 90% menores y carecían de IgA, lo cual puede explicarse debido a que al no poseer cDC2 los niveles de TGF- $\beta$  eran menores y esta citocina es importante en la inducción del cambio de clase de IgM a IgA (Adriana Flores-Langarica et al., 2018). Otras investigaciones, utilizando diferentes patógenos, han logrado determinar que las cDC1 son importantes en la inducción de la respuesta Th1 (Nakawesi et al., 2020; Potiron et al., 2019; T. Sun et al., 2017). Gracias a esto, actualmente se tiene un mejor conocimiento de la respuesta de las diferentes poblaciones de DC. Sin embargo, debido a que el estudio de las DC *in vivo* es complicado bajo diferentes estímulos e infecciones, es necesario seguir investigando para comprender los mecanismos inmunes responsables de inducir respuestas eficientes y protectoras a largo plazo.

El intestino es un ambiente rico en vitamina A proveniente de la dieta y del hígado, y se ha descrito un tipo de DC con una gran capacidad para metabolizar el retinol (un metabolito de la vitamina A) y producir ácido retinoico (AR) gracias a que expresan la enzima retinaldehído deshidrogenasa 2 (Aldh1a2 o Raldh2), en la figura 1 se observa un esquema del metabolismo de la vitamina A.

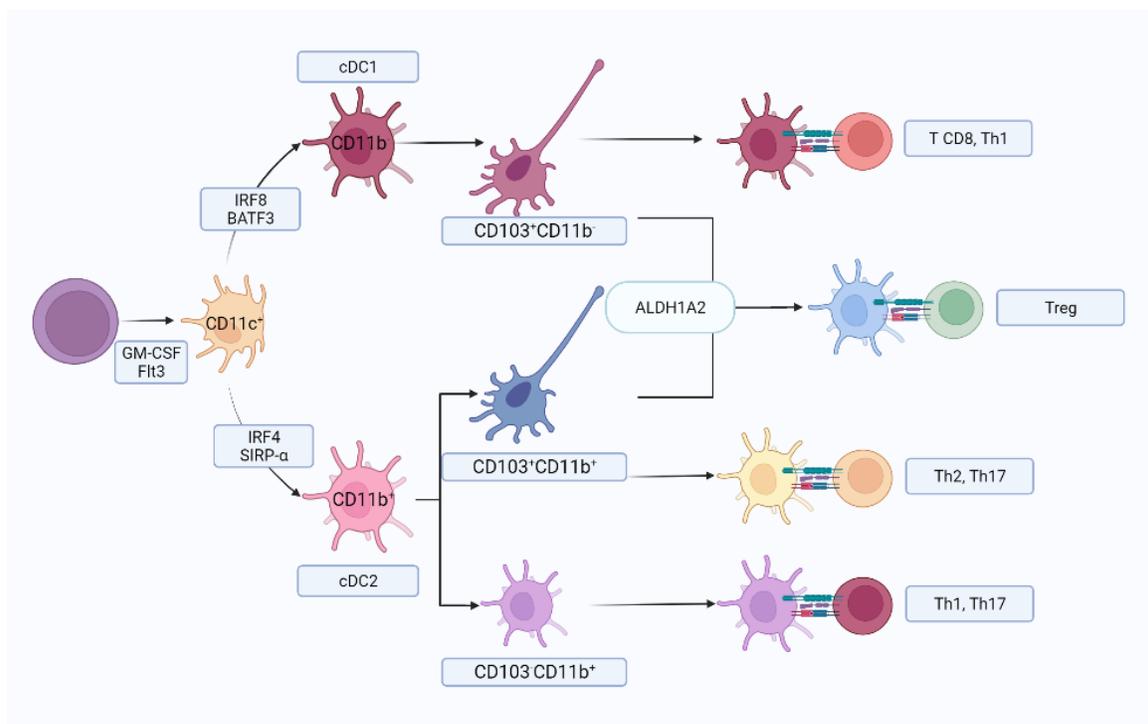


**Figura 1. Metabolismo de vitamina A.** Proceso de transformación de vitamina A/retinol hasta su forma activa en forma de ácido retinoico. A) La vitamina A es obtenida a través de la dieta en forma de β-carotenos o retinol. B) La vitamina A es absorbida por enterocitos y transformada en retinol por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). C) El retinol absorbido por los enterocitos es captado por las DC y transformado en retinal por la enzima ADH, posteriormente la enzima retinaldehído deshidrogenasa 2 (Aldh1a2) transforma el retinal en AR.

Las DC con una mayor capacidad para metabolizar el retinol, pueden ser cDC1 y cDC2, siendo las cDC2 las más comunes y han sido relacionadas con la inducción de la respuesta T<sub>REG</sub>. Cuando las DC se desarrollan en un ambiente rico en AR, aumentan la expresión de la integrina CD103 y la producción de TGF-β, lo cual contribuye al mantenimiento del ambiente tolerogénico en el intestino. En diversos estudios se ha logrado la obtención *in vitro* de células con características de DC intestinales, tras ser cultivadas en presencia de AR. Trabajos como el de Roe M. et al han mostrado que las células cultivadas en conjunto con AR muestran una mayor expresión de CD103 y un perfil antiinflamatorio determinado principalmente por la producción de TGF-β (Roe et al., 2017). Gracias a la influencia del AR sobre la diferenciación de DC se ha propuesto utilizar este metabolito de la vitamina A en el desarrollo *in vitro* de DC que nos permitan obtener células con características semejantes a las de las DC<sub>i</sub> como la expresión de CD103 y el perfil antiinflamatorio. En el laboratorio pueden obtenerse DC a partir de células de sangre periférica o células hematopoyéticas

obtenidas de medula ósea mediante su exposición a las citocinas Flt3L y a GM-CSF. No obstante, las DC obtenidas no muestran características de DCi. Sin embargo, trabajos previos han observado que, si además las células de medula ósea son expuestas a AR, desarrollaran características típicas de DCi, como una mayor expresión de CD103 y mayor producción de citocinas antiinflamatorias. El desarrollo *in vitro* y el entendimiento del efecto de las DCi en la presentación de antígenos a células T, puede ayudarnos en el desarrollo de nuevas estrategias en el combate de patógenos y en el diseño de nuevas vacunas (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Czarnewski et al., 2017).

En la figura 2 muestra un esquema de la clasificación de las DCi tomando en cuenta los diferentes marcadores presentes en las poblaciones. (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Hasegawa & Matsumoto, 2018; Nakawesi et al., 2020; Stagg, 2018; Steimle & Frick, 2016; Tian Sun et al., 2020). Además del AR, la microbiota intestinal juega un papel muy importante en la inducción de la tolerancia mediada por las DCi y la función de estas, en específico los ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota intestinal pueden tener un efecto sobre la diferenciación de las DC de una manera similar al AR (Aliberti, 2016; Tian Sun et al., 2020).



**Figura 2: Clasificación de células dendríticas intestinales.** Clasificación de las DCi con base en la expresión de las integrinas y factores de transcripción que intervienen en su diferenciación: ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con

Fms (Flt3L), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor regulador de interferón 4 (IRF4), factor regulador de interferón 8 (IRF8), factor de transcripción zipper de leucina básico similar ATF 3 (BATF3), proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP $\alpha$ ), retinaldehído deshidrogenasa 2 (Aldh1a2). Se muestran dos tipos de células CD103<sup>+</sup>: células dendríticas clásicas tipo 1 (cDC1) y células dendríticas clásicas tipo 2 (cDC2), ambos tipos son poblaciones de DCi.

### **1.3 Inmunidad adaptativa.**

La inmunidad adaptativa tiene como características principales una alta especificidad y que tras un encuentro con algún agente extraño desarrolla memoria inmunológica, lo que le permitirá establecer una respuesta secundaria más rápida y eficaz ante subsecuentes encuentros. La inmunidad adaptativa suele aparecer entre 5-6 días después de un primer encuentro con un agente extraño. Las APC son de gran importancia en la respuesta adaptativa ya que se encargan del procesamiento y presentación de antígenos a las células T (Cadavid & Ph, 2010; Reyes Martín, Prieto Martín, Díaz Martín, & Álvarez-Mon Soto, 2013; Punt et al., 2020). La respuesta inmune adaptativa esta mediada por dos tipos celulares, linfocitos B y T. En el caso de los linfocitos B estos son los responsables de la inmunidad humoral, es decir, se encargan de la producción de anticuerpos como la IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. Los linfocitos T constituyen la respuesta inmune mediada por células, y pueden ser divididos en dos poblaciones principales de acuerdo con la expresión de dos marcadores, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. La función principal de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es promover la activación de otras poblaciones celulares como los linfocitos B productores de anticuerpos como la eliminación de células infectadas por las células T CD8<sup>+</sup>, desencadenando una serie de eventos que culminan con la eliminación del patógeno, la reparación de los tejidos dañados y la protección ante futuras reinfecciones. (Cadavid & Ph, 2010; Reyes Martín et al., 2013; Punt et al., 2020).

Las células T inicialmente se encuentran en ganglios linfáticos como células T naïve, una vez que una APC captura un antígeno puede comenzar a migrar hacia los ganglios donde presentará el antígeno unido a moléculas del MHC, el cual será reconocido por el TCR de una célula T lo que desencadenará su activación. La célula T activada comenzará a sufrir una serie de cambios como la expresión de receptores de quimiocinas, que le permitirán movilizarse hasta las regiones necesarias donde comenzará con la eliminación del patógeno,

de las células infectadas o células alteradas. En el caso de las células B, a diferencia de las células T, pueden reconocer un agente extraño, ya sea toxina o proteína de manera soluble, sin la necesidad del procesamiento y presentación de antígeno por parte de una APC. Este reconocimiento directo se lleva a cabo por el receptor de célula B (BCR) lo que desencadenara su activación y la secreción de IgM específica, y gracias a la influencia de las células T CD4 activadas, la célula B hace cambio de isotipo necesario para hacer más eficiente la respuesta inmune, por lo que comienza a producir IgG, la cual es una inmunoglobulina mucho más eficiente, duradera y con mayor afinidad hacia el antígeno. Dentro de estas células B activadas, se generaran algunas clonas que permanecerán en los ganglios y médula ósea como células de memoria a largo plazo, cuya respuesta será más rápida y eficiente ante un futuro reencuentro con el mismo antígeno (A. Flores-Langarica et al., 2018; Adriana Flores-Langarica et al., 2018; Hilpert et al., 2019).

Una vez eliminado el patógeno, comienza a restablecerse la homeostasis en el sistema inmune por lo que el número de células T y B efectoras disminuye y se formará un grupo de células de memoria. Éstas servirán para establecer la respuesta contra el patógeno en caso de un encuentro subsecuente. El entendimiento de la inmunidad adaptativa ha permitido el desarrollo de estrategias para la prevención de enfermedades, tal es el caso de la vacunación. La vacunación es una estrategia que aprovecha estos mecanismos para la generación de memoria inmunológica y así prevenir el desarrollo de enfermedades graves causadas por infecciones (Bennett et al., 2015; Klarquist et al., 2021; Petersone et al., 2018).

### 1.3.1 Células T.

Las células T son las encargadas de la inmunidad adaptativa mediada por células, y estas son incapaces de reconocer de manera directa un agente patógeno. Para que la célula se active son necesarias tres señales; reconocimiento de complejo MHC-péptido por parte del TCR, moléculas coestimuladoras y citocinas. Estas tres señales son brindadas por una APC. Al interactuar el TCR con los antígenos presentados por las APC y con sus moléculas coestimuladoras. Las células T comienzan a diferenciarse y a proliferar para llevar a cabo su función, dependiendo del mensaje que reciban por parte de las APC (Hilpert et al., 2019).

Las células T maduran en el timo y salen hacia la circulación como células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> naïve, las cuales serán activadas cuando se encuentren con un antígeno específico para su TCR presentado por una APC. Cada célula T madura expresa un receptor de antígeno diferente producido por el reordenamiento de genes al azar durante su maduración en el timo. Esta expresión de un receptor diferente en cada célula T le confiere la capacidad de poder interactuar con algún antígeno procesado por las APC que no se haya visto anteriormente y le permitirá generar una respuesta contra un agente infeccioso extraño. No obstante, se estima que únicamente 1 de cada 10<sup>5</sup> células T naïve posee un receptor específico para un antígeno dado, sin embargo, una vez que una célula T naïve encuentre un antígeno específico que la active esta proliferará y se convertirá en una célula efectora. El marcador CD28, presente en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es una glucoproteína que puede unirse a los ligandos CD80 y CD86 pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas en las APC y funcionan como moléculas coestimuladoras, donde las DC son las mejores presentadoras de antígenos y por tanto, son las mejores activadoras de células T (Lee & Lee, 2018; Sharma & Rudra, 2018; Punt et al., 2020). Además de los complejos de MHC-péptido y las moléculas coestimuladoras, las DC tienen la capacidad de producir citocinas necesarias para la correcta activación de las células T. Una de las citocinas más estudiadas es la IL-2, la cual tiene un papel muy importante cuando la cantidad de antígenos y moléculas coestimuladoras son escasas. Las citocinas estimuladoras son conocidas como citocinas polarizantes y también pueden ser producidas por otras células T, células asesinas naturales (NK), entre otras (Punt, et al 2020).

Una vez que la célula T ha sido activada, comenzará su diferenciación la cual se llevará a cabo entre 1 o 2 días después del reconocimiento del antígeno. La célula T se convertirá en una célula blasto, iniciando con su división celular haciéndolo dos o tres veces cada 24 h durante un periodo de 4 a 5 días. Esto tendrá como resultado clonas de células diferenciadas con poblaciones de células de memoria y efectoras, pero que reconocen un solo péptido sobre el MHC con una gran afinidad y especificidad. Las poblaciones de células T son las T cooperadoras (T<sub>H</sub>) y células T citotóxicas (T<sub>C</sub>) que pueden actuar de manera directa o indirecta sobre un patógeno para su eliminación (Okeke & Uzonna, 2019; Sharma & Rudra, 2018; Punt et al., 2020). Las células citotóxicas CD8<sup>+</sup> salen de los tejidos linfoides y se dirigen directamente hacia el sitio de infección donde reconocen y eliminan células

infectadas. En el caso de las células cooperadoras  $CD4^+$ , una parte de estas puede permanecer en los tejidos linfoides secundarios con la finalidad de regular la respuesta. La otra parte puede salir del tejido linfoide y secretar citocinas con la finalidad de dirigir la actividad de otras células involucradas en la respuesta. Existe evidencia que detalla que las células  $T_H$  pueden diferenciarse en al menos 5 grupos, siendo  $T_H1$  y  $T_H2$  las primeras en ser descubiertas. Las células  $T_H$  suelen diferenciarse por las citocinas que producen,  $T_H1$  puede secretar IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  y tiene funciones como la activación de linfocitos T y macrófagos.  $T_H2$  produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y puede regular la diferenciación y actividad de células B (Punt et al., 2020). Otras de las células cooperadoras identificadas son las subpoblaciones  $T_H17$ ,  $T_{REG}$  y las  $T_{FH}$  y al igual que las  $T_H1$  y  $T_H2$  cada una se diferencia por las citocinas que puede producir. Además, la diferenciación de cada subgrupo dependerá del tipo de infección que se produzca, por ejemplo, células T  $CD4^+$  que responden a parásitos, se diferenciarán hacia  $T_H2$  y en el caso de una infección por virus se diferenciarán hacia  $T_H1$ . Esto es importante ya que dependiendo del tipo de células T que se genere será el tipo de citocinas producidas y con ello se tendrán diferentes funciones (como, por ejemplo, estimulación de células B para producir anticuerpos o la estimulación de células T  $CD8^+$  citotóxicas necesarias para la eliminación de células infectadas) lo cual es importante para la eliminación del patógeno. Si bien el tipo de perfil de las células T es específica para cada tipo de patógeno, estas pueden establecer una respuesta general. En el caso de  $T_H2$  pueden contribuir estimulando a las células B para que produzcan anticuerpos para la eliminación de patógenos extracelulares (Sharma & Rudra, 2018; Punt et al., 2020). Por último, en el caso de las células  $T_{REG}$  surgen a partir de células T naïve en presencia de TGF- $\beta$  que induce la expresión del factor de transcripción FoxP3, el cual es un regulador transcripcional del que depende la actividad de las  $T_{REG}$ . Estas células secretan IL-10 y TGF- $\beta$ , de este modo se regula la inflamación teniendo un efecto sobre APC, con otras células T y sobre la zona en la que se encuentren (Punt et al., 2020).

## 1.4 Modelos de generación de células dendríticas *in vitro*.

Las DC son conocidas como las APC más potentes, debido a que tienen una gran capacidad para la inducción de la respuesta inmune adaptativa, es por esto por lo que resulta importante determinar los diferentes mecanismos por los cuales contribuyen a establecer la respuesta inmune. Uno de los problemas que se presentan en el estudio de las DC es la dificultad para su aislamiento a partir de órganos. Sin embargo, se han propuesto distintos métodos que nos permitan obtener una mayor cantidad de DC diferenciándolas a partir de precursores hematopoyéticos aislado de sangre periférica o de medula ósea. Actualmente existen diversas investigaciones enfocadas en la obtención *in vitro* de DC a partir de monocitos aislados de sangre periférica o de células precursoras obtenidas de medula ósea mediante su exposición a GM-CSF, Flt3 e IL-4, las cuales son citocinas importantes que dirigen la diferenciación de las DC. La obtención de DC utilizando estas técnicas nos permite tener un mejor conocimiento de los distintos procesos en los que se ven involucradas. Trabajos como el de Rui-Jún et al, se han centrado en la obtención de DC a partir de monocitos humanos mediante su exposición a GM-CSF e IL-4. Por otro lado, también existen trabajos en los que se generan DC utilizando medula ósea de ratón, pudiendo así diferenciar de una forma más precisa células que muestran características únicas de DC. Existen otras investigaciones que han observado que la exposición de las células a AR permite obtener un mayor número de células con un fenotipo de DC clásicas tipo 1 y 2 que poseen una expresión elevada del marcador CD103. Por tal motivo se ha propuesto el uso de AR en cultivo celulares de diferenciación de DC para la generación de DC tipo intestinales (DCti) (Adriana Flores-Langarica et al., 2018; Li et al., 2021; Rampal et al., 2016; Roe et al., 2017).

### 1.4.1 Modelos para el estudio de células dendríticas intestinales.

Las DC son un componente importante de la respuesta inmune siendo el punto de unión entre la inmunidad innata y adaptativa. Debido a la importancia de las DC en la regulación y respuesta del sistema inmune, existen investigaciones centradas en el aislamiento y generación *in vitro* de estas células que nos permitan tener una mejor comprensión de los

mecanismos y respuestas de las DC (A. Flores-Langarica et al., 2018; Adriana Flores-Langarica et al., 2018; Garcias López et al., 2020; Iwabuchi et al., 2021; Redpath et al., 2018; Roe et al., 2017). Una de las técnicas más utilizadas para el estudio de las DC intestinales es su aislamiento a partir de la lámina propia y placas de Peyer del intestino de ratones, lo cual se hace utilizando distintas enzimas que eliminan la capa de células epiteliales y con ayuda de microperlas magnéticas dirigidas a los marcadores de DC CD11c, MHC-II, CD11b y CD103 se logran aislar diferentes poblaciones de las células de interés, ya sean cDC1, cDC2 o ambas poblaciones, sin embargo, una de las limitantes de esta técnica de aislamiento de DC es que las características de las células pueden verse afectadas, ya sea la expresión de marcadores de superficie, de moléculas coestimuladoras o incluso pueden llegar a morir las células durante el proceso. (A. Flores-Langarica et al., 2018; Potiron et al., 2019).

Algunos trabajos también se han centrado en la generación de DC a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidos de donadores humanos o incluso de animales. Inicialmente células son separadas por centrifugación utilizando un medio de separación de leucocitos y posteriormente las células son cultivadas *in vitro* en un medio de cultivo adicionando GM-CSF, Flt3l e IL-4. Una de las desventajas que se han observado al utilizar esta técnica es que suelen generarse otros tipos de células como macrófagos, por tal motivo es necesario realizar una purificación de las células utilizando marcadores específicos de DC, obteniendo al final un menor número de células y que en ocasiones pueden llegar a mostrar características fenotípicas ligeramente diferentes (Roe et al., 2017). Diversos trabajos han observado que el AR puede tener un papel muy importante en la generación *in vitro* de DC con características propias de las células encontradas en el intestino, lo que permite un mejor estudio de las células, ya que se generan una mayor cantidad de cDC1 y cDC2 (Bain et al., 2017; Mayer et al., 2017; Roe et al., 2017; Zeng et al., 2016).

La vitamina A es una vitamina liposoluble que puede ser encontrada en alimentos de origen animal y vegetal. En animales está presente como retinol, el cual es una de las formas activas de esta vitamina, por otro lado, la vitamina A presente en productos de origen vegetal se encuentra en una forma inactiva conocida como carotenoide provitamina A, que una vez ingerido puede ser transformado en retinol dentro del organismo gracias a distintos procesos metabólicos. El AR es un metabolito producido a partir del retinol gracias a la acción de la

enzima Aldh1a2. Dicha enzima puede ser producida por las DC cuando estas se desarrollan en un ambiente con AR. El AR cumple una función en la regulación del sistema inmune actuando sobre diversas células promoviendo un ambiente antiinflamatorio. Diversas investigaciones han demostrado que puede cumplir diferentes funciones en los seres vivos como la modulación de la diferenciación y proliferación celular, lo que puede ser atribuido a la interacción del AR con receptores de ácido retinoico (RAR) donde podemos encontrar tres tipos de RAR conservados en vertebrados (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ ), estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y funcionan en conjunto formando heterodímeros con los receptores X de retinoide (RXRs) y pueden promover el aumento de la expresión de CD103 y la expresión de factores de transcripción como FoxP3 (Rhinn & Dollé, 2012; Stagg, 2018).

Se ha observado que el AR puede actuar en la diferenciación de las DC. Un ejemplo de esto es que el AR puede aumentar la expresión de CD103 en DC clásicas tipo 1 y 2, principalmente en la lámina propia del intestino delgado, donde los niveles de AR son mayores. El AR puede encontrarse en grandes cantidades en el intestino, esto en parte puede atribuirse a que la vitamina A es obtenida por medio de la dieta, además de que puede estar presente en secreciones biliares. Esto es muy importante, ya que sugiere que el AR puede tener un papel importante promoviendo un ambiente antiinflamatorio a nivel intestinal. Se ha observado que una deficiencia de vitamina A puede tener efectos perjudiciales en la salud, principalmente aumentando la susceptibilidad a enfermedades infecciosas en aquellas personas que tienen una dieta deficiente en vitamina A, esto sugiere que el AR tiene un papel muy importante en la respuesta inmune (Aliberti, 2016; Czarnewski et al., 2017; Zeng et al., 2016).

## **1.5 Respuesta inmune en infecciones virales.**

El sistema inmune tiene la capacidad de establecer una respuesta coordinada contra agentes patógenos a través de diferentes mecanismos, los cuales dependerán del tipo de patógeno. Los virus son patógenos intracelulares compuestos por ácidos nucleicos con una cubierta de proteína o lipoproteínas a los que nos enfrentamos todos los días. Es por esto que el

organismo cuenta con una serie de mecanismos que nos permiten establecer una respuesta para su contención y eliminación (Greene & Zuniga, 2021; Johansson et al., 2007; Kolawole et al., 2016). En la respuesta inmune contra los virus, intervienen componentes tanto de la inmunidad innata como adaptativa. La inmunidad innata en muchos casos tiene la capacidad de prevenir o eliminar una infección viral antes de que se activen componentes de la inmunidad adaptativa por medio de la secreción de interferones de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ). Entre ellos están la formación del inflamasoma, la activación de complemento o gracias a células de la inmunidad innata como las NK. Las células del sistema inmune reconocen virus gracias a que poseen distintos receptores que les permiten identificarlos o a componentes de estos. Algunos de estos receptores son: TLR3, que reconoce ARN de doble cadena (dsARN); TLR4, reconoce al virus sincitial respiratorio (RSV) y al virus de la estomatitis vesicular (VSV); TLR7 y TLR8, que reconocen ARN monocatenario (ssARN); TLR9, reconoce herpes virus; TLR13, que reconoce VSV. Los TLR reconocen a los virus de manera extracelular ya que estos receptores son encontrados en la superficie de las células, sin embargo, también pueden ser reconocidos intracelularmente dentro de los endosomas donde son endocitados los virus. Dentro de la célula, existen otros receptores capaces de reconocer e iniciar una respuesta contra los virus, entre estos receptores citosólicos se encuentran los receptores tipo NOD (NLR), principalmente NOD2, también están los receptores tipo AIM2 (ALR), los cuales se unen a ADN citosólico viral y también están los receptores miembros de RIG-I (RLR) que reconocen ARN viral. Una vez que un receptor ha reconocido un virus o componente de este, comienza una cascada de señalización que finalizará en la activación de los factores de transcripción de interferón IRF3 e IRF7, lo que iniciara la producción de interferones de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (Greene & Zuniga, 2021; Punt et al., 2020).

Los interferones producidos tienen la capacidad de inducir varios tipos de respuestas que se encargan de combatir la infección viral. La mayoría de las células tiene la capacidad de reconocer los interferones de tipo I a través del receptor de interferones IFNAR, lo que llevará a la activación de las proteínas cinasas JAK1 y TYK2, la cuales fosforilan a STAT1 y STAT2 que estimulan la expresión de proteínas con efectos antivirales. Las proteínas que contribuyen a la defensa de la infección viral son: *I*) proteína cinasa R (PKR), esta proteína se une a dsARN y posteriormente inhibe la actividad del factor de iniciación de la traducción de eIF2; *II*) la 2',5'-oligoadenilato A sintetasa, el cual se une a dsARN en el citosol, posteriormente

se une a una ARNasa e induce la degradación del ARN viral; *III*) las proteínas del grupo Mx tienen la capacidad de inhibir la transcripción de genes virales así como inhibir el ensamblaje de partículas virales; *IV*) y por último, las proteínas inducidas por IFN con repeticiones de tetratricopéptidos (IFIT) tienen la capacidad de unirse a dsARN, lo que bloquea la traducción del ARN viral. En conjunto, todos estos mecanismos son una de las primeras respuestas antivirales que se desencadenan ante una infección viral. (Cook et al., 2000; Greene & Zuniga, 2021; Johansson et al., 2007; Kolawole et al., 2016; Punt et al., 2020).

En la neutralización y eliminación de los virus también intervienen anticuerpos y células T. Los virus tienen la capacidad de ingresar en las células del hospedero utilizando receptores de superficie para los cuales han desarrollado especificidad y cuando se encuentran dentro de la célula utilizan la propia maquinaria de la célula para su replicación. Los anticuerpos neutralizantes son generados tras un primer encuentro con el antígeno viral y son principalmente IgA e IgG (Franco & Greenberg, 1995; Greene & Zuniga, 2021; Ibrahim et al., 2017; Nakawesi et al., 2020). Estos anticuerpos tienen la capacidad de reconocer regiones específicas de un virus y unirse a ellas lo que impedirá el ingreso del virus a la célula. Además, la unión de los anticuerpos puede activar al sistema de complemento, desencadenando lisis del patógeno. Por otro lado, algunos anticuerpos también tienen una capacidad opsonizante, que facilita la fagocitosis mediada por receptores Fc o C3b. El papel de los anticuerpos en la inmunidad contra virus tiene una gran relevancia durante las primeras fases de la infección. Sin embargo, la eliminación de la infección ya establecida dependerá en gran medida de células T CD8<sup>+</sup> y T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> (Greene & Zuniga, 2021; Ibrahim et al., 2017; Labastida-Conde et al., 2018; Nakawesi et al., 2020).

Las células T<sub>H</sub>1 tienen la capacidad de secretar citocinas necesarias para la respuesta antiviral, principalmente IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , las cuales pueden actuar de manera directa o indirecta. La secreción de IFN- $\gamma$  induce un estado antiviral en las células cercanas, mientras que la IL-2 tiene un papel importante en la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) lo que generará una población de células T citotóxicas. Además, tanto IFN- $\gamma$  como IL-2, son capaces de inducir la respuesta de las células NK. Otra de las actividades que poseen las células T<sub>H</sub>1 es que pueden inducir la presentación cruzada en APC, como las DC, lo que conducirá a un aumento de la activación de células T CD8<sup>+</sup> capaces de eliminar células

propias que estén infectadas. En conjunto, todos estos mecanismos, tanto los pertenecientes a la inmunidad innata, como los anticuerpos y células T contribuirán a la eliminación del virus y las células infectadas con el objetivo de reestablecer la homeostasis (Cook et al., 2000; Johansson et al., 2007; Kolawole et al., 2016; Livanos et al., 2021; Marie et al., 2018).

### 1.5.1 Células dendríticas e infecciones virales.

Las DC son un grupo diverso de células conocidas como las mejores APC profesionales pertenecientes a la inmunidad innata y tienen un papel muy importante en la respuesta inmune contra infecciones virales. Las DC se encargan de la captura y presentación de antígenos a células T para su activación y diferenciación. Contra los virus, la diferenciación hacia un perfil Th1 ayuda a la activación de células T CD8<sup>+</sup> que sirven para la eliminación de células infectadas, y también tienen un papel importante en la respuesta de las células B mejorando la producción de anticuerpos (A. Flores-Langarica et al., 2018; Adriana Flores-Langarica et al., 2018; Kirkling et al., 2018; Roe et al., 2017). Ante una infección viral, las DC reconocen a los virus o componentes de estos gracias a los PRRs que poseen. El reconocimiento de los PAMPs provenientes de virus puede llevarse a cabo de manera extracelular por medio de receptores como TLR4 o de manera intracelular en endosomas por medio de TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 o y/o TLR9, además, en el citoplasma receptores como los RIG-I, NLR, entre otros, reconocen ARN y ADN viral, lo que desencadena la respuesta de IFN de tipo I. Uno de los efectos que tienen los IFN de tipo I es el aumento de la expresión de moléculas del MHC de clase I, lo que aumenta la presentación cruzada y la activación de células T naïve CD8<sup>+</sup>. Las DC plasmocitoides (pDC) tienen una gran capacidad para producir interferones de tipo I e IFN de tipo III como el IFN-λ, lo que las hace la población de DC mejor capacitadas para establecer una respuesta antiviral. A nivel intestinal las cDC1 son las células más importantes para la respuesta contra virus debido a su capacidad para inducir la respuesta de células T<sub>H</sub>1 y T CD8<sup>+</sup>, en el caso de las cDC2, estas también pueden establecer un respuesta antiviral pero tienen una mayor eficiencia en la inducción de las respuestas T<sub>H</sub>2 y T<sub>H</sub>17 (Deal et al., 2013; Huang et al., 2021; Johansson et al., 2007; Nakawesi et al., 2020; Rampal et al., 2016; Vlasova et al., 2013).

Una vez que las DC reconocen un virus lo procesan para su presentación en moléculas del MHC de clase II, comienzan con la secreción de citocinas y aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y algunas células migran hacia ganglios linfáticos donde residen células T naïve. Las DC no solo tienen la capacidad de activar células T CD4<sup>+</sup>, sino que también es necesario que activen células T CD8<sup>+</sup>, esto logran hacerlo a través de un fenómeno denominado presentación cruzada. Para que la presentación cruzada se lleve a cabo, es necesario que se envíe un antígeno internalizado en un fagosoma a la maquinaria responsable de cargar los antígenos a moléculas del MHC de clase I. Esto resultara en la presentación de esos antígenos en moléculas del MHC de clase I y de este modo la DC tendrá la capacidad para activar células T naïve CD8<sup>+</sup> (Garcias López et al., 2020; Jamwal et al., 2017; Johansson et al., 2007; Silvin et al., 2017; T. Sun et al., 2017). Las DC también tienen la capacidad de mejorar la respuesta de las células B, en el 2020 Nakawesi y colaboradores demostraron que estos efectos son atribuidos a la producción de los factores BAFF, APRIL y a la secreción de la citocina TGF- $\beta$  que promueve el cambio de clase en las células B (Garcias López et al., 2020; Goverse et al., 2017; Nakawesi et al., 2020).

El papel de las DC, no solo intestinales, tiene una gran relevancia en la respuesta antiviral ya que activan no solo a células de la inmunidad adaptativa, sino también a células de la inmunidad innata como las NK y en conjunto induciendo una respuesta antiviral (Cook et al., 2000; Deal et al., 2013; Garcias López et al., 2020; Greene & Zuniga, 2021; Jamwal et al., 2017; Johansson et al., 2007; Rodríguez et al., 2012; Silvin et al., 2017; T. Sun et al., 2017).

## **1.6 Rotavirus.**

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) causan al menos 500,000 muertes al año a nivel mundial y representan una de las 5 principales causas de muerte en infantes menores de 5 años, siendo el rotavirus (RV) el principal agente patológico responsable de estas enfermedades (Collada et al., 2020; Crawford et al., 2017; Pérez-Ortín et al., 2019). Los RV son un tipo de virus de ARN que poseen 11 segmentos de ARN de doble cadena (dsARN, por sus siglas en inglés) el cual se encuentra rodeado por 3 cápsides las cuales son necesarias

para determinar la especificidad de su hospedero y así poder ingresar a sus células para poder llevar a cabo su ciclo replicativo (Carvalho & Gill, 2019; Crawford et al., 2017; Gómez-Rial et al., 2020). Los 11 segmentos de ARN presentes en RV codifican las 6 proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 Y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1-6) características de este virus. Existen 10 tipos de RV (A-J) siendo el tipo A el más común en las infecciones en niños (Collada et al., 2020; Sattar et al., 2018). Desde el año 1973 fueron identificadas partículas virales en muestras de duodeno y en heces de niños con diarrea aguda. Poco tiempo después se identificó al rotavirus como el agente causal de diarrea aguda en niños menores de 5 años, al cual se le dio ese nombre debido a su forma redonda (Crawford et al., 2017). Actualmente, se han logrado identificar distintos tipos de RV, el mecanismo por el cual infectan y desencadenan la enfermedad, como está conformado, tratamientos y además también se han podido generar diferentes vacunas para el control de este virus (Deal et al., 2013; Franco & Greenberg, 1995; Delia V. Lopez-Guerrero et al., 2010; Vlasova et al., 2013).

En los años 80s en México las EDA representaban la principal causa de muerte en niños, lo que llevó al diseño de distintas investigaciones y estrategias con el fin de controlar estas enfermedades. No fue sino hasta el año 2000 que dieron inicio diversos programas de vacunación con el fin de controlar este problema de salud pública. En el año 2006 la secretaria de salud implementó un programa de vacunación contra RV comenzando con la administración de la vacuna monovalente (Rotarix, GSK) y para el año 2011 comenzó a implementarse la vacuna pentavalente (Rotateq, MSD) de manera alternativa (Collada et al., 2020). En el año 2016 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó que el 73% de los niños menores de 1 año habían sido vacunados con al menos una dosis de la vacuna contra RV y que niños de 12-35 meses de edad el 87% había sido vacunado al menos una vez (Collada et al., 2020; Romero-Martínez et al., 2016). Gracias las estrategias de vacunación de ha observado una disminución en los índices de mortalidad y morbilidad, siendo que los años previos a la vacunación existía una media de 1,806 muertes por EDA y actualmente se tiene una media anual de 837 muertes. En el caso de hospitalizaciones relacionadas con RV en los años pre-vacunación, se tenía una media de 17,842 pacientes al año y en los años posteriores a las campañas de vacunación la media anual de hospitalizaciones relacionadas con EDA es de 11,996 casos. Sin embargo, es importante recalcar que actualmente las EDA

ocupan el segundo lugar entre las visitas médicas ambulatorias (Collada et al., 2020; Crawford et al., 2017; Luna-Casas et al., 2019).

El RV ingresa a los enterocitos gracias a sus proteínas estructurales VP4 y VP7, que se encuentran en la parte externa del virus, cuando el dominio VP8\* de la proteína VP4 es reconocida por receptores en la superficie celular el virus se une a la célula. Posteriormente, el dominio VP5\* de VP4 y la proteína VP7 interactúan con más receptores y, dependiendo de la cepa de RV, este es internalizado por vías de endocitosis dependientes o no de clatrina e independientes de caveolina formando un endosoma. El endosoma que contiene al virus es destruido y es lanzada la partícula transcripcional de doble capa (DLP) al citoplasma donde gracias a las proteínas NSP2 y NSP5 se formará el viroplasma. mRNA viral es utilizado durante la replicación del genoma para la formación de RNA nuevo el cual posteriormente es empacado nuevamente en DLP y reconocido por NSP4 para ser llevado al retículo endoplasmático (RE) donde se le agregaran las proteínas VP4 y VP7 para posteriormente ser lanzadas mediante lisis celular o por medio del aparato de Golgi (Carvalho & Gill, 2019; Crawford et al., 2017). A pesar de ser un virus para el cual hay vacuna, aún falta conocimiento sobre el tipo de respuesta que genera este virus en el intestino, así como los componentes más relevantes en esta respuesta. El diseño de modelos murinos nos permitirá obtener un mayor conocimiento y entendimiento de la respuesta inmune a RV y esto servirá para diseñar mejores estrategias vacunales en el combate a las infecciones por RV (Labastida-Conde et al., 2018; Lappalainen et al., 2015; D. V. Lopez-Guerrero et al., 2018; Rosales-Martinez et al., 2016).

## 2. ANTECEDENTES.

Las DC son un grupo amplio de células pertenecientes a la respuesta inmune innata, que tienen como principal función ser el punto de comunicación entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. A nivel intestinal, las DC se encargan de capturar, procesar y presentar antígenos a las células T, que, bajo condiciones normales, inducen un perfil tipo T<sub>REG</sub> promoviendo un ambiente tolerogénico. El estudio de las DC ha sido de gran importancia durante mucho tiempo, sin embargo, resulta complicado llevarlo a cabo debido a que las DC representan únicamente entre el 2-5% del total de las células presentes en el intestino. Por este motivo, diversas investigaciones se han centrado en la obtención de DC *in vitro* que nos permitan obtener una mayor cantidad de células facilitando así su estudio (Feng et al., 2010; Lutz et al., 1999; Yashiro et al., 2018; Yokota et al., 2009). Desde el año 1999 Lutz y colaboradores describieron un modelo de generación de DC a partir de médula ósea de ratón, las cuales eran cultivadas en presencia de GM-CSF (Lutz et al., 1999). En años posteriores surgieron una gran cantidad de investigaciones que trabajaron en la generación de DC realizando algunas variantes como en la concentración de GM-CSF que podía ir desde los 5-25 ng/mL para su desarrollo. También existieron trabajos que se encargaron de identificar las características fenotípicas y de expresión de diferentes genes en las células generadas mediante esta técnica (Feng et al., 2010; Lutz et al., 1999; Yokota et al., 2009). Además, dichos modelos han sido utilizados para la generación de modelos de respuesta inmune que permiten tener una mejor comprensión de los distintos procesos que involucra la respuesta inmune contra distintos patógenos.

El AR es un metabolito de la vitamina A, el cual se ha demostrado que tiene un papel importante sobre las DC, principalmente a nivel intestinal, debido a que es una zona rica en vitamina A y sus metabolitos como el retinol proveniente de la dieta. Esto llevó a la creación de investigaciones centradas en determinar el rol del AR en el desarrollo de las DC en modelos *in vitro* (Feng et al., 2010; Ohoka et al., 2014; Yashiro et al., 2018). Las investigaciones demostraron que la generación de DC en presencia de GM-CSF y AR confiere a las células características típicas de DC intestinales como lo son aumento en la expresión de la enzima Aldh1a2, una mayor expresión de los marcadores CD103,  $\alpha 4\beta 7$ ,

$\alpha\beta 8$ , menor expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y una mayor producción de TGF- $\beta$  (A. Flores-Langarica et al., 2018; Ohoka et al., 2014; Qiang et al., 2017; Roe et al., 2017; Yashiro et al., 2018). Por otra parte, y centrándonos en la importancia del AR, existe evidencia de que una ingesta inadecuada de vitamina A conlleva a alteraciones en la respuesta inmune. Un ejemplo de esto son las investigaciones realizadas por Flores y colaboradores en donde observaron que una disminución en las células CD103<sup>+</sup> afecta la respuesta de anticuerpos intestinales (A. Flores-Langarica et al., 2018). Así mismo, existen otras investigaciones que describen fenómenos similares y relacionándolo con una disminución en las cantidades de TGF- $\beta$  secretada, ya que esta citocina es importante para el cambio de clase de los anticuerpos y tener una secreción óptima de IgA (Feng et al., 2010; A. Flores-Langarica et al., 2018; Adriana Flores-Langarica et al., 2018; Qiang et al., 2017; T. Sun et al., 2017). Actualmente, también existen investigaciones que señalan la importancia de las DC y del AR en la respuesta de las células T. Se ha observado que un aporte inadecuado de vitamina A en modelos murinos afecta la respuesta antiviral. Sin embargo, aun hace falta describir con mayor detalle la respuesta inducida por las DC en las células T contra el RV en un modelo de respuesta inmune *in vitro* (Adriana Flores-Langarica et al., 2018; Kim et al., 2019; Delia V. Lopez-Guerrero et al., 2010; Mattiuz et al., 2021).

Con base en la información existente, en el laboratorio se estableció un modelo de generación de DC a partir de células de médula ósea, utilizando GM-CSF y AR, esto con la finalidad de diseñar un modelo de respuesta inmune intestinal contra RV *in vitro*.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El intestino es un sitio con alta exposición a antígenos, además de ser un portal de entrada para muchos patógenos. El número de DC a nivel intestinal es reducido, lo que dificulta su estudio, por esto se han desarrollado técnicas *in vitro* que nos permitan establecer modelos de respuesta inmune intestinal. Actualmente se cuenta con modelos *in vitro* de generación de DC con características muy similares a las que presentan *in vivo*, facilitando el análisis profundo del tipo de respuesta, ya que permiten el análisis de las citocinas y moléculas que se expresan en respuesta a los antígenos de los patógenos.

El establecimiento de un modelo *in vitro* enfocado en la diferenciación de DC tipo intestinales que evalúe la respuesta generada en células T específicas tras la presentación de antígenos puede contribuir a mejorar el entendimiento de los diferentes mecanismos moleculares que determinan la respuesta inmune *in vivo*. Los conocimientos obtenidos podrían aplicarse en el mejoramiento de terapias enfocadas al sistema inmune, así mismo, contribuye al diseño de vacunas con una mayor eficiencia debido a que en un modelo *in vitro* de respuesta inmune intestinal podría determinarse con mayor precisión los elementos clave para desarrollar una respuesta protectora inducida en una infección natural. Por esta razón y siendo el rotavirus, una infección aguda del intestino delgado, decidimos evaluar el tipo de respuesta que inducen las DC generadas a partir de médula ósea de ratones sanos, sobre poblaciones de células T específicas contra rotavirus utilizando a la proteína VP6, la proteína más abundante e inmunogénica del virión.

## **4. OBJETIVOS.**

### **4.1 Objetivo general.**

Evaluar la respuesta de células T específicas contra rotavirus activadas por células dendríticas convencionales y tipo intestinales, derivadas de médula ósea, cargadas con antígenos de rotavirus en un modelo *in vitro*.

### **4.2 Objetivos específicos.**

- Determinar el grado de proliferación de células T de bazo, específicas contra rotavirus, inducida mediante la presentación de antígeno por células dendríticas convencionales en comparación con células dendríticas tipo intestinal cargadas con VP6 de rotavirus.
- Determinar el perfil de citocinas producidas por las células T de bazo, inducida por la presentación de antígeno por células dendríticas convencionales en comparación con células dendríticas tipo intestinal cargadas con VP6 de rotavirus.

## 5. HIPÓTESIS.

Las células T provenientes de bazo de ratones infectados con rotavirus en presencia de células dendríticas tipo intestinal derivadas de médula ósea *in vitro* cargadas con antígenos de rotavirus, desarrollaran un perfil tipo T<sub>REG</sub> aumentando la producción de citocinas antiinflamatorias y teniendo una menor proliferación, en comparación con las células dendríticas convencionales, cuyo perfil será predominantemente T<sub>H</sub>1.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 Ratones.**

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 5 a 8 semanas de nacidos, libres de patógenos específicos, los cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, se mantuvieron en condiciones estándares de bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, agua y comida *ad libitum*.

### **6.2 Extracción de células de médula ósea de ratón.**

Los ratones utilizados fueron sacrificados por dislocación cervical y utilizando tijeras y pinzas de disección se extrajeron los fémures y tibias. Con la ayuda de gasas estériles se retiró el exceso de tejido muscular y una vez limpios los huesos se colocaron en 10 mL de PBS (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) estéril. Posteriormente, y bajo condiciones estériles (campana de flujo laminar BSL2), se colocaron los huesos en etanol al 70% por 5 minutos para desinfectarlos y después fueron enjuagados en 10 mL PBS por 1 minuto, con la finalidad de eliminar el etanol. Una vez lavados los huesos, se cortaron ambas epífisis con la ayuda de tijeras y pinzas y se hizo pasar medio RPMI por la luz del hueso para extraer la médula ósea, esto en una caja de Petri estéril. Una vez obtenida la médula ósea se homogeneizó cuidadosamente en el medio RPMI por pipeteo y se filtró con la ayuda de mallas estériles de 100 µm. El medio que contenía las células fue centrifugado a 2,500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón de células obtenidas fue resuspendido en 4 mL de medio RPMI, se tomaron 10 µL del medio, se colocó en una relación 1:1 con azul de tripano y se contaron las células viables en una cámara de Neubauer, descartando las células muertas para nuestro ensayo.

### **6.3 Diferenciación de precursores de médula ósea a células dendríticas tipo intestinales.**

Las células viables obtenidas a partir de médula ósea fueron contadas y cultivadas en medio RPMI<sup>+</sup> (GIBCO) suplementado con 10% de SFB en cajas Petri Corning Incorporated de 10 mL de baja adherencia a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por mL. La concentración de GM-CSF (GIBCO, recombinante de ratón) utilizada para la diferenciación de las DC fue de 10 ng/mL. Las condiciones para desarrollar DC tipo intestinales (DC-AR) fueron las mismas, sin embargo, se adicionó AR al medio de cultivo procurando tener una concentración final de 0.5M de AR. Las células fueron cultivadas por 7 días procurando cambiar el medio de cultivo cada tercer día.

#### **6.3.1 Estimulación de células dendríticas derivadas de la médula ósea y carga de antígenos de rotavirus.**

Al día 7 de diferenciación las DC de ambas condiciones fueron colectadas. Se colectaron únicamente las células que no estaban adheridas a la placa y para obtener un mayor número de células las placas fueron lavadas cuidadosamente con 3 mL de medio RPMI<sup>+</sup>. Las células colectadas en el medio de cultivo fueron centrifugadas por 5 minutos a 2,500 rpm. El botón celular fue resuspendido y se contaron las células viables tiñéndolas con azul tripano en una cámara de Neubauer. Por último, las células fueron sembradas a una concentración de  $1 \times 10^6$  y estimuladas en placas de 12 pozos Corning Costar de baja adherencia donde se tuvieron 4 condiciones distintas para cada tipo de DC (convencionales y células con AR): DC sin estimular y DC estimuladas con 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, por un periodo de 48 h. En el caso de las DC cargadas con antígenos de rotavirus, inicialmente fueron estimuladas con 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS y además, se agregó 1  $\mu\text{g/mL}$  de proteína VP6 o péptido por 48 h, esto con la finalidad de que las DC captaran los antígenos y los presentaran.

## 6.4 Purificación de ARN.

La purificación de ARNm se realizó utilizando la técnica de Trizol-cloroformo. Cuarenta y ocho horas después de la estimulación de las DC se tomó el sobrenadante y se centrifugó por 5 minutos a 2,500 rpm, se separaron las células del sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu$ L de Trizol en cada muestra de DC y se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo. Se dejó incubar por 5 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugadas las muestras, se formaron 3 fases, para la purificación de ARN se tomó la fase acuosa ya que es donde se puede encontrar el ARN, se le agregaron 800  $\mu$ L de isopropanol y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el tubo por 20 minutos. Por último, se resuspendió la muestra en 20  $\mu$ L de agua DEPC y se verificó su integridad en un gel de Agarosa al 2%. Las muestras fueron cuantificadas utilizando el Nanodrop en una dilución 1:500 marca BioDrop (V1.0.4).

### 6.4.1 Obtención de cDNA.

Una vez obtenido el ARN total se tomaron de 0.5 a 1 g de muestra y se mezcló con 1  $\mu$ L de oligo dT a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L de agua DEPC y se incubó por 5 minutos a 65°C en baño María. Posteriormente se agregó a cada muestra 7  $\mu$ L de un coctel compuesto por; 2.4  $\mu$ L de buffer de reacción (5X), 0.125  $\mu$ L de inhibidor de RNAsas (Ribolock 40 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de dNTPs (10 mM), 0.125  $\mu$ L de enzima transcriptasa reversa (200 U/ $\mu$ L) (Second Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen) y 3.35  $\mu$ L de agua libre de RNAsas, esto dio un volumen total de 15  $\mu$ L de cada muestra. Por último, cada muestra se incubó a 42°C por 1 h en baño María, esto nos permitió obtener cDNA a partir de ARNm. Quedando una reacción final como se muestra en la **tabla 1**.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para la obtención de cDNA.

Reactivo	Volumen
RNA	6 $\mu\text{L}$
Oligo dT (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
Buffer (5X)	2.4 $\mu\text{L}$
Ribolock (40 U/ $\mu\text{L}$ )	0.125 $\mu\text{L}$
dNTP's (10 mM)	1 $\mu\text{L}$
Transcriptasa reversa (200 U/ $\mu\text{L}$ )	0.125 $\mu\text{L}$
Agua DEPC	4.25 $\mu\text{L}$
<b>Volumen total de reacción</b>	<b>15 <math>\mu\text{L}</math></b>

#### 6.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) nos permite la amplificación *in vitro* de un segmento específico de ADN, por lo tanto, se llevó a cabo esta técnica para la determinación de la expresión de genes de citocinas. Se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (2 $\mu\text{g}$ ) obtenido previamente y se mezcló con 1  $\mu\text{L}$  de oligo forward (+) (10 pmol), 1  $\mu\text{L}$  de oligo reverse (-) (10 pmol), 0.5  $\mu\text{L}$  de enzima Taq polimerasa (200 U/ $\mu\text{L}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  de MgCl (1.5mM), 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2.5mM), 2  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción (10X) con KCl y se llevó a un volumen de 20  $\mu\text{L}$  agregando 11  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Una vez hecha la mezcla se realizó la reacción de PCR con las temperaturas y tiempos de reacción específicos para cada gen a determinar. Las secuencias de los oligos utilizados se pueden observar en la tabla 2.

**Tabla 2.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en PCR.

Oligo	5'	3'
B-actina	ATG-GAT-GAC-GAT-ATC-GCT	ATG-AGG-TAG-TCT-GTC-AGG-T
Aldh1a2	CAG-AGA-GTG-GGA-GAG-TGT-TCC	CAC-ACA-GAA-CCA-AGA-GAG-AAG-G
IL-10		
IL-12	AAC-AGC-	TTG-AGA-TGA-TGC-TTT-GAC-A

IFN- $\beta$	CCA-CAG-CCC-TCT-CCA-TCA-AC	TCT-CTG-CTC-GGA-CCA-CCA-TC
--------------	----------------------------	----------------------------

Los productos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis a 90 V por 45 minutos en buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 1 mM).

## 6.5 Citofluorometría.

Las células dendríticas fueron colectadas al día 8 de su diferenciación para posteriormente determinar su inmunofenotipo mediante la técnica de citometría de flujo. Se colectaron las células suspendidas en el medio de cultivo y se hizo un lavado de la placa con medio RPMI-, se centrifugó el medio de cultivo obtenido a 2,500 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ L de buffer de bloqueo (PBS/EDTA 2 mM + 2% SFB) por 20 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las células a 2,500 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 1 mL de binding buffer (PBS/EDTA 2 mM + 2% SFB + 2% suero humano), se agregaron 200  $\mu$ L de la suspensión en pozos de placas de 96 pozos de fondo en V y se incubó a 4°C por 20 min.

Se centrifugó la placa a 2,500 rpm por 5 min y cuidadosamente se eliminó el sobrenadante dejándolo caer sobre papel absorbente. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpos (CD11c APC/biotina + CD103 PE, a una concentración de 1:100) (marca eBioscience) previamente diluidos en buffer de bloqueo y se incubó la placa a 4°C por 20 minutos cubierta de la luz. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 100  $\mu$ L de buffer de lavado (PBS/EDTA 2mM) y se centrifugó la placa a 2,500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células agregando 100  $\mu$ L de buffer de lavado y se centrifugó la placa a 2,500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 100  $\mu$ L de estreptavidina APC y se incubó la placa a 4°C por 15 minutos y pasado ese tiempo se realizó un lavado de las células como se hizo previamente. Por último, las células fueron fijadas en 400  $\mu$ L de paraformaldehído al 2% hasta su análisis.

El análisis de las células se realizó en un citómetro de flujo y mediante el software Cytobank Community que puede ser encontrado en la siguiente página web: <https://community.cytobank.org>.

## **6.6 Obtención de células T CD4<sup>+</sup> de bazo de ratón.**

Para la determinación de la proliferación inducida sobre las células T CD4<sup>+</sup> por parte de las DC y las DC-AR, se utilizaron células de bazo de dos ratones hembra de la cepa BALB/c, uno previamente inmunizado vía oral contra RV con la vacuna Rotarix y retado con el virus EDIMwt (42 días post-infección) y otro sin inmunizar. Se purificaron positivamente células T CD4<sup>+</sup> por columna utilizando un anticuerpo acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi-Biotec).

Los bazos de ratones sin tratamiento o inmunizados y retados con el virus EDIMwt fueron homogeneizados en medio RPMI con la ayuda una malla metálica, las células obtenidas fueron centrifugadas por 5 min a 2,500 rpm. Se decantó el medio RPMI y las células obtenidas fueron resuspendidas en 2 mL de buffer de lisis (Cerlardane) por 10 minutos para eliminar eritrocitos, posteriormente se centrifugaron las células a 2,500 rpm y se resuspendieron en PBS/EDTA 2 mM 2 veces para eliminar el buffer de lisis, se llevó a centrifugación nuevamente y se agregaron 2 mL de buffer de bloqueo (PBS/EDTA 2 mM + 2% SFB + 2% suero humano) por 15 min a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se llevó a centrifugación y las células fueron resuspendidas en 1 mL de buffer de bloqueo (PBS/EDTA 2 mM + 2% SFB) con anticuerpo MACS anti-CD4 a una concentración de 1:20 y se incubó por 15 min a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se agregó 1 mL extra de buffer de bloqueo, se llevó a centrifugación por 5 min y se lavaron las células con 1 mL de buffer de bloqueo. Una vez lavadas las células fueron resuspendidas en 1 mL de buffer de bloqueo y se hicieron pasar por una columna donde las células marcadas por el anticuerpo serian separadas de las células no marcadas con la ayuda de un imán. Una vez que el buffer dejo de caer por la columna esta se separó del imán, se agregó 1 mL más de buffer y con la ayuda de un embolo las células fueron recuperadas en un tubo. Por último, las células viables fueron

contabilizadas mediante la tinción con azul de tripano en una relación 1:1 en una cámara de Neubauer.

## 6.7 Ensayo de proliferación.

Las células T CD4<sup>+</sup> obtenidas previamente fueron teñidas con Carboxifluoresceína (CFSE) y posteriormente cultivadas en presencia con DC o DC-AR cargadas con diferentes antígenos. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos, con medio RPMI<sup>+</sup> por 72 h a 37°C en una relación de 10:1 (células T:DC). Pasado el tiempo de incubación, se colectó el medio de cultivo de cada condición en conjunto con las células T. Por último, se centrifugaron las muestras, se separó el sobrenadante de las células y se fijaron las células en 400 µL paraformaldehído al 2% hasta su análisis por citometría de flujo.

**Tabla 3.** Clasificación de cultivos celulares con base en el antígeno utilizado.

RATÓN UTILIZADO	TIPO DE CÉLULA DENDRÍTICA	ANTÍGENO
RATÓN INMUNIZADO	DC	Sin estímulo
		LPS
		Proteína VP6 de RV
		Péptido 289-302 de proteína VP6
	DC-AR	ConA
		Sin estímulo
		LPS
		Proteína VP6 de RV
RATÓN NO INMUNIZADO	DC	Péptido 289-302 de proteína VP6
		ConA
		Sin estímulo
		LPS
	DC-AR	Proteína VP6 de RV
		Péptido 289-302 de proteína VP6
		LPS
		Sin estímulo

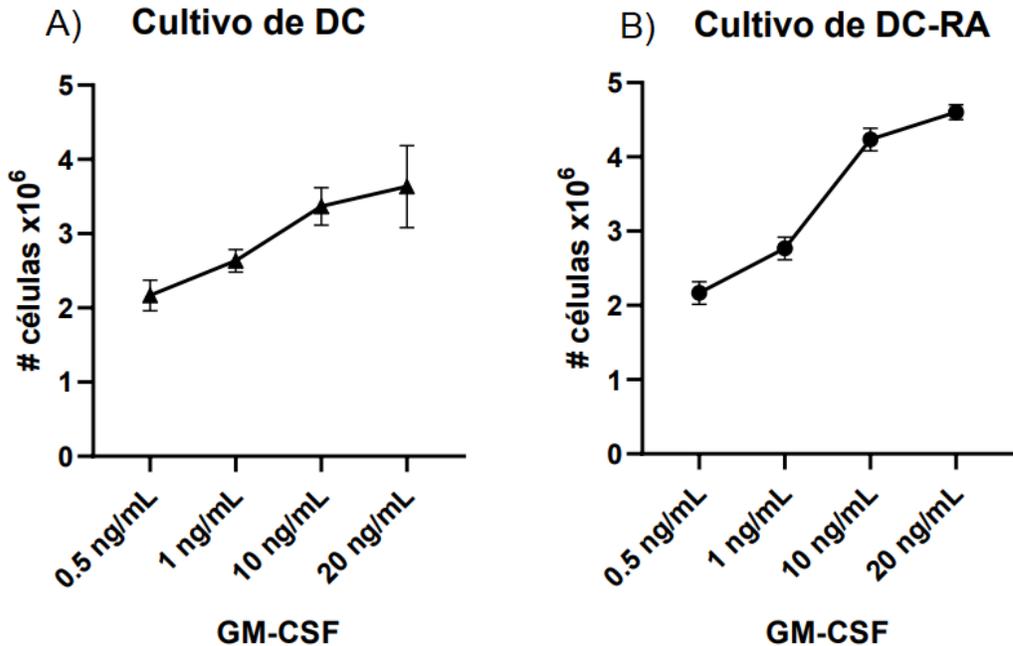
## 6.8 Determinación de TNF- $\alpha$ por ELISA.

La determinación de la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$  se realizó a partir del medio de cultivo colectado donde fueron cultivadas los diferentes tipos de células dendríticas utilizando el kit de ELISA para la terminación de TNF de ratón (Thermo). Se centrifugó el medio con células a 2,500 rpm por 5 minutos y se tomó el sobrenadante. Posteriormente, mediante inmunoensayos de ELISA se determinó la concentración de TNF- $\alpha$ . Se sensibilizó una placa de ELISA de 96 pozos de alta adherencia con anticuerpo de captura para citocinas de ratón toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (PBS+Tween 0.05%), se secó la placa y se bloqueó por 1 h con diluyente ELISA (PBS+SFB) a temperatura ambiente. Se lavó la placa una vez con buffer de lavado y se realizó la curva de citocinas agregando 100  $\mu$ L de estándar de TNF- $\alpha$  haciendo diluciones seriadas. Por otro lado, se agregaron 100  $\mu$ L de muestra por duplicado en diferentes pozos y se incubó toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se realizaron 4 lavados con buffer de lavado, se secó la placa y se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de detección anti-TNF- $\alpha$  de ratón con biotina y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa 4 veces y se agregaron 100  $\mu$ L de Avidina-HRP, se cubrió la placa y se incubó por 30 minutos. Después de este periodo se lavó la placa 5 veces procurando que cada lavado tuviera una duración de 1-2 minutos y se agregaron 100  $\mu$ L de sustrato TMB, se cubrió la placa y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 50  $\mu$ L de solución de detención (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se leyó la placa a una longitud de onda de 450 nm.

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1 Generación de DC y DCi *in vitro* a partir de precursores de MO.**

El método de generación de DC *in vitro* de Lutz se basa en añadir factores de crecimiento para la diferenciación de los precursores de médula ósea obtenidas a partir de fémures y tibias de ratones sanos de 6 a 8 semanas de edad. El método consiste en agregar la citocina GM-CSF ensayo de titulación de GM-CSF para determinar la concentración que permitiera obtener una mayor cantidad de células viables y diferenciadas. Las células de médula ósea obtenidas fueron cultivadas con diferentes concentraciones de GM-CSF (0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL y 20 ng/mL), colocando un total de 5 millones por caja Petri y fueron incubadas durante 6 días, alimentándolas con medio fresco cada 2 días, esto con la finalidad de renovar el GM-CSF consumido. Además, se utilizó el método modificado en donde se agrega AR para obtener DC con un fenotipo intestinal. En este caso, además del GM-CSF, las células de MO se cultivaron en presencia de AR en una concentración de 0.5M. Bajo estas condiciones, se observó que las concentraciones de 10 y 20 ng/mL de GM-SCF, fueron las óptimas para generar una mayor cantidad de células viables tanto como para DC y DC-AR (Figura 3). Por lo anterior, para los experimentos posteriores se utilizaron 10 ng/mL de GM-CSF.



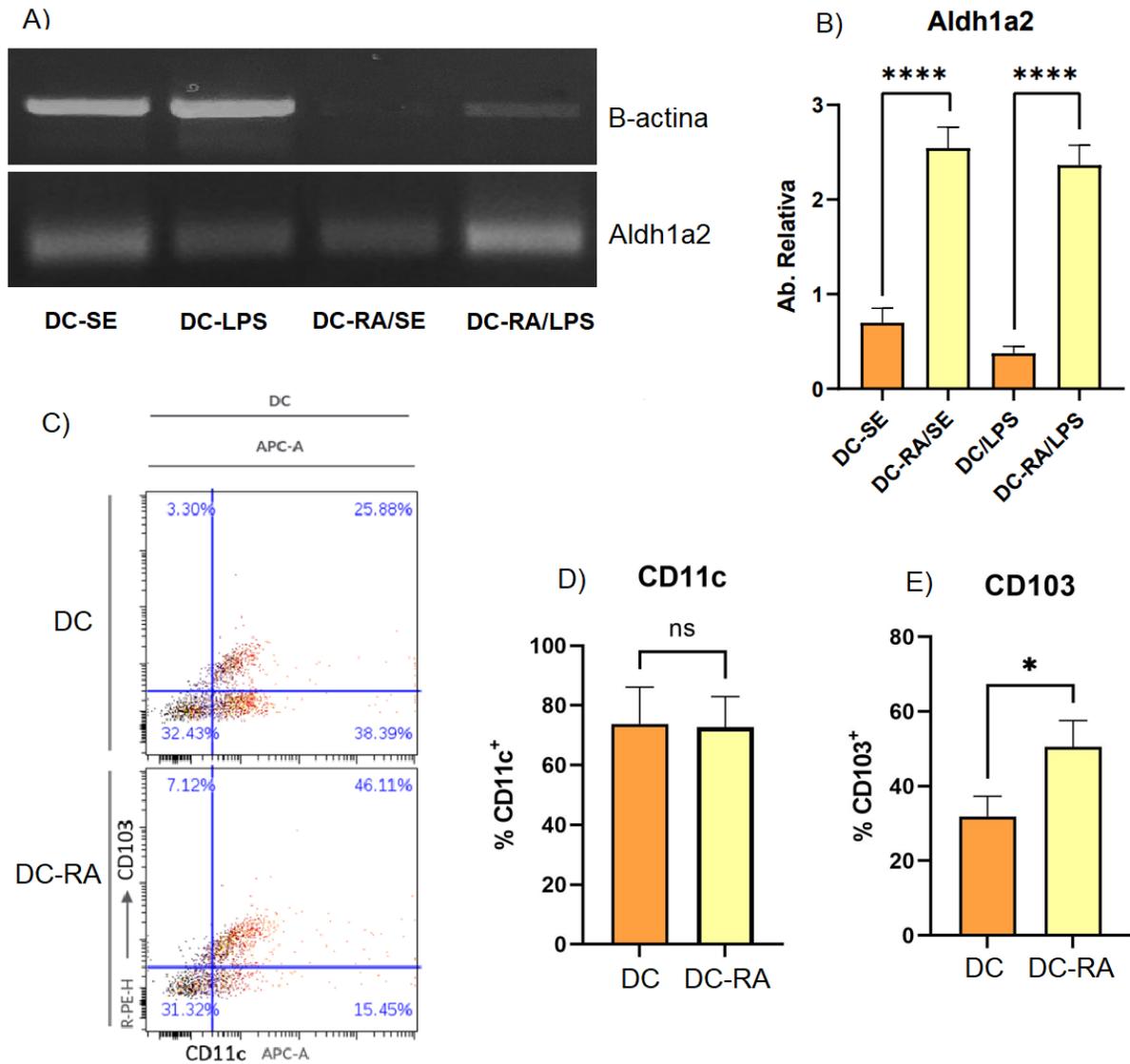
**Figura 3. Titulación del GM-CSF para la diferenciación de DC a partir de precursores de MO.** Se utilizaron concentraciones de 0.5, 1, 10 y 20 ng/ml de GM-CSF en 10<sup>6</sup> células precursoras de MO en cajas Petri Costar de 10 mL. A) Número de células viables a los 7 días post-diferenciación a diferentes concentraciones de GM-CSF. B) Número de células viables a los 7 días post-diferenciación a diferentes concentraciones de GM-CSF con 0.5 M de AR.

## 7.2 Generación y caracterización de las DC derivadas de MO en presencia de AR.

Una vez establecida la concentración de GM-CSF óptima para la generación de DC convencionales, se caracterizaron por medio de citofluorometría de flujo y PCR. Para determinar si las DC se estaban diferenciando a DCi en presencia de AR, Se realizó la técnica de PCR para para detectar el ARNm para enzima Aldh1a2. La abundancia relativa fue normalizada tomando en cuenta la síntesis del ARNm para el gen de  $\beta$ -actina, el cual es constitutivo. La purificación de ARN total se realizó a partir de cultivos de DC sin estimular y estimuladas con LPS en presencia y ausencia de AR. Inicialmente se determinó la expresión de genes de  $\beta$ -actina con la finalidad de demostrar que se había logrado la obtención de cDNA a partir del RNA purificado. Una vez demostrado que se contaba con la presencia del ARNm para  $\beta$ -actina en las muestras, se realizó la técnica de PCR para la enzima Aldh1a2. La expresión de Aldh1a2 pudo ser observada tanto en DC como en las DC-AR, y tras analizar

la abundancia relativa se determinó que la expresión de la enzima fue mayor en las DC que habían sido cultivadas en presencia de AR (Figura 4).

Además, el fenotipo de las células en ambas condiciones fue analizado por citofluorometría de flujo. Para ello se determinó la expresión del marcador CD11c y CD103 sobre las células derivadas de la MO. Las DC y DC-AR mostraron una expresión similar del marcador CD11c y tras el análisis estadístico no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (figura 4C, D). A pesar de que el porcentaje de CD11c era similar para ambas condiciones, el grupo de DC-AR tuvo en promedio un 20% de células CD103<sup>+</sup> (figura 4 C, E), lo que indica que el AR tiene un papel importante en la inducción de la expresión de esta integrina. Cuando se realizó el análisis estadístico entre las poblaciones CD103<sup>+</sup> de DC y DC-AR se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



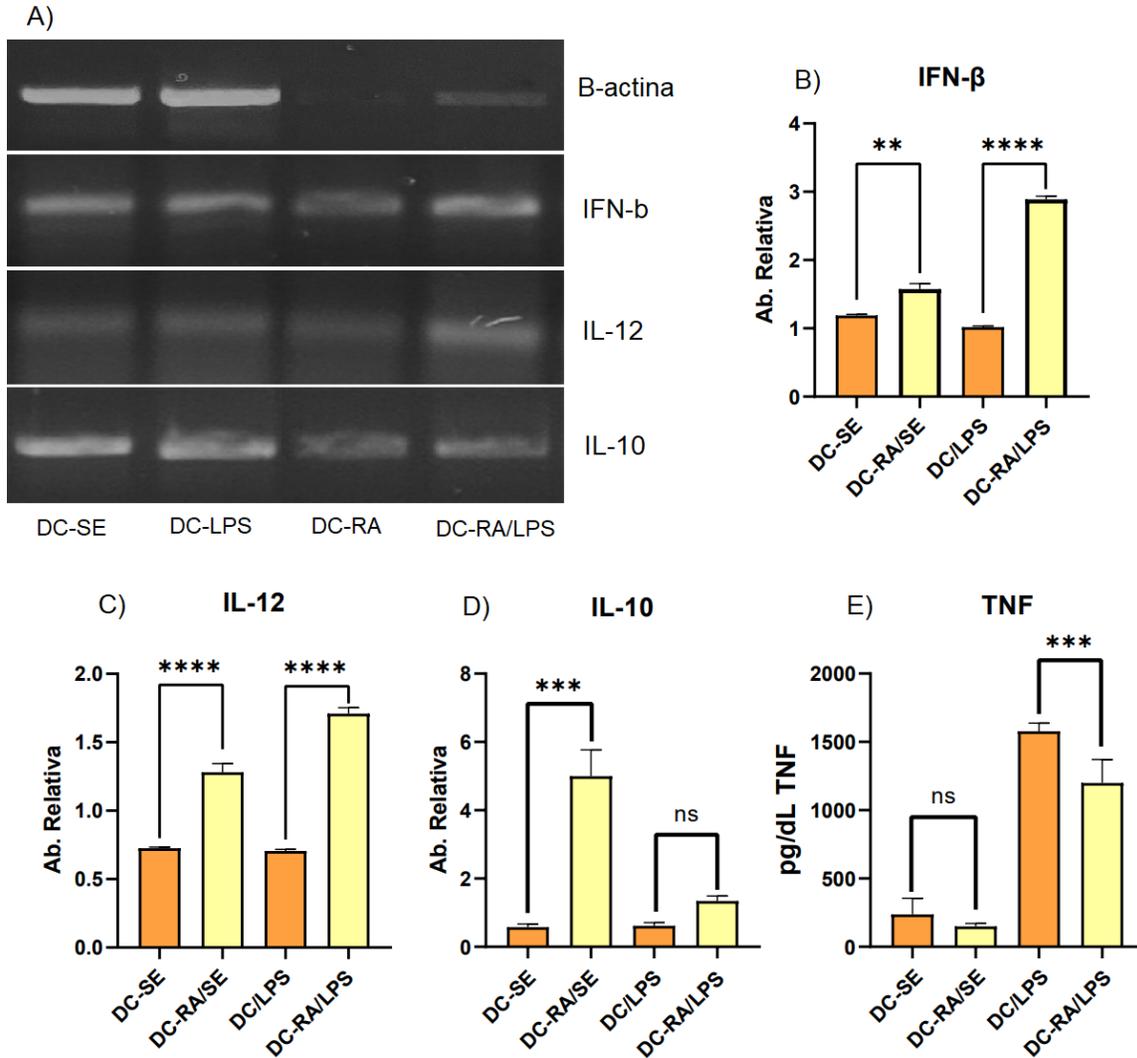
**Figura 4. Caracterización de células dendríticas.** A) Gel de agarosa donde se observa la presencia de ARNm para la enzima Aldh1a2, se tomaron DC sin estimular (SE) y estimuladas con LPS (LPS). B) abundancia relativa de ARNm para la enzima Aldh1a2. C) Dotplot donde se pueden observar las poblaciones de DC CD11<sup>+</sup> y CD103<sup>+</sup>. D) Porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> en cultivos de DC y DC-AR. E) Porcentaje de células CD103<sup>+</sup> en cultivos de DC y DC-AR. \*p=0.02.

### 7.3 Detección de citocinas en DC y DC-AR mediante PCR punto final y ELISA.

Para la determinación del perfil de citocinas se determinó la síntesis de ARNm para las citocinas IL-12, IFN- $\beta$  e IL-10. Se observó que tanto en las DC como en las DC-AR sin

estimular y estimuladas con LPS tuvieron ARNm para las citocinas de interés (figura 5A). Se determinó la abundancia relativa de ARNm tomando en cuenta la abundancia de  $\beta$ -actina. Las células DC-AR sin estímulo y estimuladas con LPS tuvieron una mayor abundancia relativa de ARNm para IFN- $\beta$  e IL-12, caso contrario a lo que se esperaba (figura 5B, C). En el caso de IL-10, se observó que las DC-AR también tuvieron abundancia relativa mayor, en comparación con las DC, lo que indicaría que la administración de AR en la diferenciación de las DC contribuye a que muestren un perfil más antiinflamatorio (figura 5D). También se pudo observar que cuando las DC-AR eran estimuladas con LPS disminuía la síntesis de IL-10, que, aunque era mayor que en las DC sin tratamiento, no había una diferencia significativa entre ambos grupos como se puede observar en la figura 5D.

Así mismo, se determinó la concentración de TNF presente en el medio de cultivo donde fueron diferenciadas y estimuladas las DC, esto se realizó mediante el inmunoensayo de ELISA. Las DC-AR tuvieron una producción ligeramente menor de TNF en condiciones basales, sin embargo, no hubo una diferencia significativa en comparación con las DC. Cuando las células fueron estimuladas con LPS se observó que la concentración de TNF en el medio de cultivo aumentó en ambas condiciones, sin embargo, el aumento fue menor en las DC-AR, evidenciando que, aunque estas células tienen la capacidad de responder a un estímulo, este es menos inflamatorio (figura 5E).

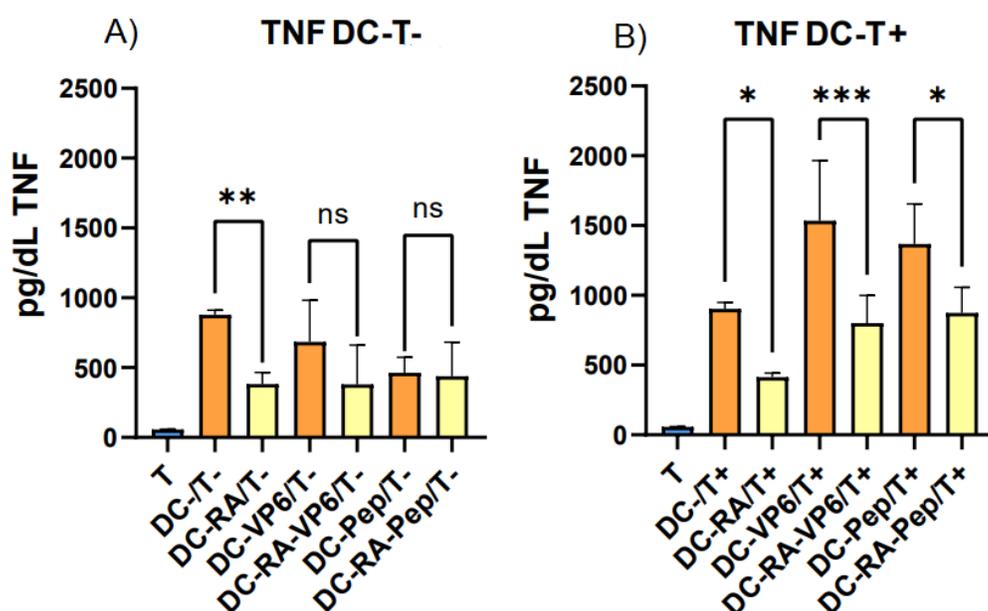


**Figura 5. Perfil de citocinas de DC y DC-AR.** Se muestra la presencia de ARNm para citocinas IFN- $\beta$ , IL-12 e IL-10, así como concentración de TNF en medio de cultivo para DC y DC-AR sin estimular (SE) y estimuladas con LPS (LPS). A) gel de agarosa que muestra la presencia de ARNm. B) abundancia relativa de ARNm para IFN- $\beta$ . C) abundancia relativa de ARNm para IL-12. D) abundancia relativa de ARNm para IL-10. E) concentración en pg/dL de TNF presente en sobrenadante donde fueron cultivadas y estimuladas las DC. \* $p=0.01$ .

#### 7.4 Los co-cultivos de células T con DC-AR tuvieron una menor producción de TNF.

Una vez establecido el modelo de generación de DC se realizaron co-cultivos utilizando células T CD4<sup>+</sup> provenientes de ratón previamente inmunizado con la proteína VP6 de RV (R+) y células T de ratón sin inmunizar (T-). Una vez pasadas 72 h de incubación se colectó

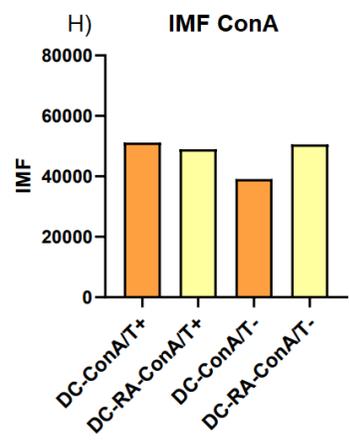
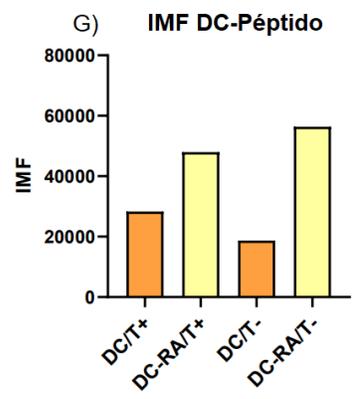
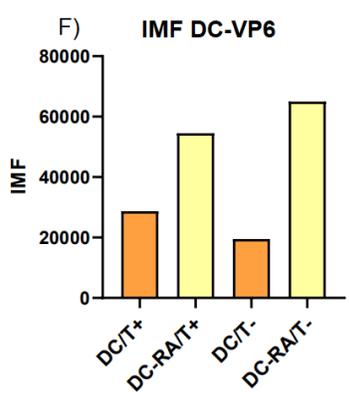
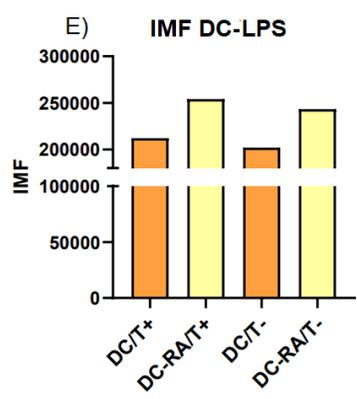
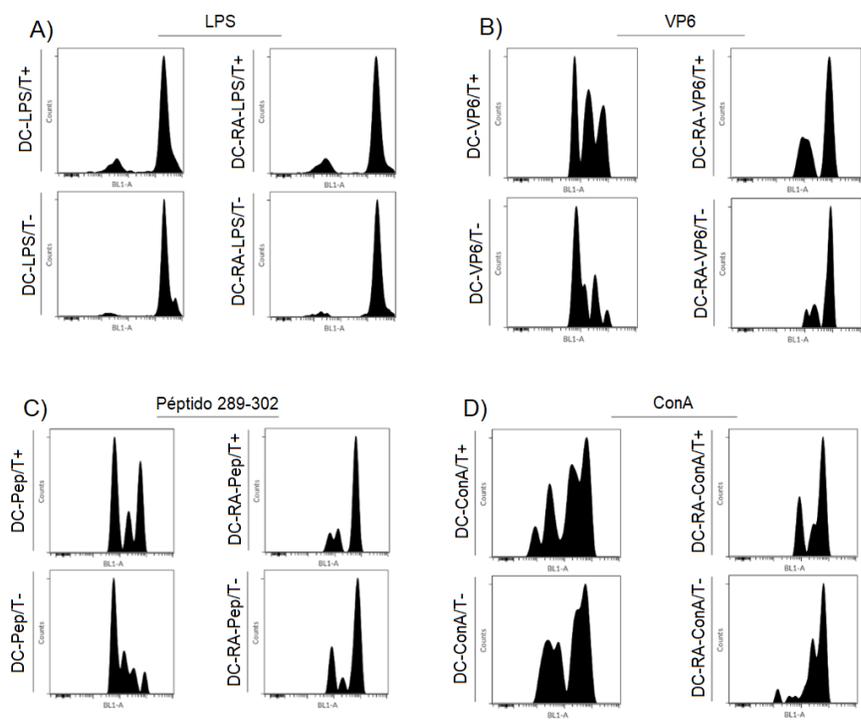
el medio de cultivo y se determinó la concentración de TNF mediante ensayo de ELISA. Como control se tuvieron cultivos de DC estimuladas con LPS sin células T y, por otro lado, cultivos únicamente con células T. En todas las condiciones las DC fueron estimuladas con LPS y posteriormente cargadas con el antígeno. En la figura 5E se puede observar la concentración de TNF en los cultivos de DC estimuladas con LPS sin células T, bajo estas condiciones los cultivos de DC tuvieron una mayor cantidad de TNF en comparación con las DC-AR, lo que indica que las DC-AR tienen un perfil menos inflamatorio. En la figura 6A se observan los cultivos de DC con células T provenientes de ratón sin inmunizar (T-). Los cultivos de DC-AR-T- sin antígenos de RV tuvieron una menor concentración de TNF en comparación con los cultivos de DC-T-, en el caso de las DC-T- con antígenos de RV, se observó que, aunque los niveles de TNF fueron mayores en este grupo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los cultivos de DC-AR (figura 6A). Por otro lado, se realizaron co-cultivos de DC con células T provenientes de ratones previamente inmunizados (T+), bajo estas condiciones se observó que, en todos los casos, hubo una menor concentración de TNF cuando las células T+ se cultivaban con DC-AR como se puede observar en la figura 6B.



**Figura 6. Concentraciones de TNF en co-cultivos de DC con células T.** Se observa la concentración de TNF en cultivos de DC sin antígeno con células T (DC-T), DC cargadas con VP6 (DC-VP6) y DC cargadas con péptido 289-302 (DC-Pep). A) concentraciones de TNF en cultivos de DC con células T-. B) concentraciones de TNF en cultivos de DC con células T+. \*p=0.002.

## **7.5 Proliferación de células T específicas contra rotavirus en presencia de DC y DC-AR cargadas con la proteína VP6 y el péptido 289-310 de rotavirus.**

Para determinar si las DC y DC-RA inducen la proliferación de las células T de memoria de bazo de ratones previamente infectados con RV EDIM WT, se realizó un ensayo de proliferación, en donde las células T de bazo fueron teñidas con CFSE y expuestas a DC cargadas con la proteína VP6 de RV o con el péptido 289-302 de la proteína VP6, un epítipo específico de células T CD4<sup>+</sup>. El ensayo consiste en co-cultivar las DC o DCi en presencia de células T de memoria o de ratones control y medir la dilución de la fluorescencia del CFSE incorporado al ADN de las células T, que cuando se dividen, por lo que entre mayor sea la disminución de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células T, se interpreta como una mayor proliferación y por lo tanto en una mayor estimulación. Las condiciones para este experimento están descritas en la tabla 2 en la sección de metodología. Los datos obtenidos fueron analizados con el software gratuito Cytobank realizando un histograma donde se observa la IMF de las células. Los histogramas obtenidos se muestran en la figura 7A-D. Como control negativo se tenían cultivos de células T con DC estimuladas con LPS y sin antígenos de RV, en estos cultivos no se observó proliferación de las células, evidenciado por una IMF alta (figura 7A, E). Los co-cultivos de DC cargadas con la proteína VP6 con células T (tanto T+ como T-), mostraron una mayor proliferación en comparación con las células T cultivadas con DC-AR (figura 7B, F). De manera similar en los cultivos de células T+ y T- con DC cargadas con el péptido 289-302, se observó una mayor proliferación de las células T, en comparación con los cultivos con DC-AR (figura 7C, G). Como control positivo se utilizó ConA, se pudo observar que hubo proliferación en todos los co-cultivos, sin embargo, las células T cultivadas con DC-AR tuvieron una menor proliferación (figura 7D, H). Los valores obtenidos de la IMF de cada grupo fueron comparados en una gráfica, donde se puede observar que los co-cultivos tanto de células T+ como T- con DC tuvieron una IMF menor, lo que indica una mayor proliferación de las células T en comparación con los grupos de DC-AR (figuras 7E-H).



**Figura 7. Ensayo de proliferación de células T cultivadas con DC y DC-AR.** A) histograma de cultivos de DC estimuladas con LPS co-cultivadas con células T- y T+. B) histograma de cultivos de DC cargadas con VP6 co-cultivadas con células T. C) histograma de cultivos de DC cargadas con péptido 289-302 co-cultivadas con células T. D) histograma de control positivo, células cultivadas con ConA. E) IMF control negativo, DC estimuladas con LPS y cultivadas con células T. F) IMF cultivos de DC cargadas con VP6, co-cultivadas con células T. G) IMF cultivos de DC cargadas con péptido 289-302, co-cultivadas con células T. H) IMF control positivo, DC con células T, en presencia de ConA.

## 8. DISCUSIÓN.

Las DC son células que poseen una gran capacidad para captar, procesar y presentar antígenos de cualquier origen a linfocitos T, activándolos y dirigiendo la respuesta hacia diferentes perfiles como son el tipo inflamatorio, antiinflamatorio o tolerogénico, gracias a la gran cantidad de receptores que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), además de otras moléculas. Esto les permiten dirigir el tipo de respuesta convirtiéndolas en el enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Así mismo, contribuyen al óptimo funcionamiento de las células B, productoras de anticuerpos, produciendo citocinas y otros factores como BAFF y APRIL, cuyos ligandos se expresan en las células B. Las DC se encuentran distribuidas en todo el organismo, sin embargo, cobran mayor relevancia en las mucosas ya que representan los principales sitios de entrada de los patógenos. Particularmente en el intestino, la cantidad de antígenos alimenticios y de microorganismos comensales, es necesario un ambiente altamente regulado y tolerogénico y bajo condiciones normales, las DC contribuyen al establecimiento de este ambiente a través de la secreción de TGF- $\beta$ , lo que induce el desarrollo de los linfocitos T locales hacia un perfil tipo T<sub>REG</sub> productores de TGF- $\beta$  e IL-10 (Feng et al., 2010; Ferris et al., 2020; Jamwal et al., 2017; Wohn et al., 2020). Sin embargo, el estudio de las DC *in vivo* en los diferentes órganos y ambientes es muy complicado, esto debido a la heterogenicidad de las poblaciones, el número absoluto de células y a que los métodos de purificación suelen alterar el estado de activación de las células. Por esta razón, es importante diseñar estrategias que permitan la generación de células con características similares a las DC *in vivo*, a fin de poder describir los mecanismos involucrados en estados de tolerancia e inflamación cuando estas entran en contacto con antígenos, en este caso de un virus como rotavirus. En el método desarrollado por Lutz y cols., es posible generar grandes cantidades de DC a partir de precursores de médula ósea agregando factores como las citocinas Flt3 y GM-CSF al medio de cultivo, en un tiempo de 5 a 10 días de diferenciación, para posteriormente añadir moléculas inmunogénicas como LPS que inducen la maduración de las DC (Feng et al., 2010; Lutz et al., 1999; Ohoka et al., 2014; Yashiro et al., 2018). Este modelo ha sido modificado por Feng y cols., en el cual, gracias a la adición de AR, es posible generar una población de DC con un fenotipo y características similares a las DC<sub>i</sub>, induciendo la expresión de la integrina

CD103 y la enzima Aldh2, necesaria para metabolizar el retinal obtenido del medio en AR (metabolito activo), haciendo de las DCi productoras de este metabolito. La presencia del AR en el intestino de los mamíferos proviene principalmente de la dieta, en donde la Vitamina A, en forma de retinal o retinol, es absorbida por los enterocitos del intestino, para que posteriormente se asocien a proteínas transportadoras, se distribuya a todos los órganos a través del torrente sanguíneo y finalmente sean metabolizados en hígado, obteniendo el metabolito activo (all-trans retinoic acid o ácido retinoico) para su posterior utilización y eliminación del organismo. Aunque esta sería la principal vía para la obtención del metabolito activo, en el intestino, las DCi tienen la capacidad de metabolizarlo y secretarlo, y éste tiene un efecto sobre las células T intestinales, generando poblaciones tolerogénicas con una baja proliferación celular y una alta producción de citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-10.

El mecanismo de acción del AR presente en el medio de cultivo de diferenciación de los precursores de MO es que una vez dentro de las células, éste es reconocido por receptores nucleares denominados como RAR, cuyas funciones radican en modular la expresión de algunos genes (RAREs). En el caso de los precursores que darán origen a las DCi, el AR es captado y reconocido por el receptor nuclear RAR $\alpha$ , el cual induce la expresión de la integrina CD103 y una mayor producción de TGF- $\beta$ , así mismo, cuando el AR señala en las células T, induce la expresión del factor de transcripción FoxP3 característico de las células T<sub>REG</sub> (Feng et al., 2010; A. Flores-Langarica et al., 2018; A. Flores-Langarica et al., 2018; Ohoka et al., 2014; Roe et al., 2017, 2020; T. Sun et al., 2017). Teniendo la experiencia previa de este modelo en nuestro laboratorio, decidimos generar poblaciones de DC a partir de precursores de MO en presencia de AR, esto con la finalidad de obtener cantidades mayores de células DC con características intestinales que nos permitan evaluar los efectos de la interacción de éstas células con las células T de memoria, y determinar si existen diferencias en la inducción de proliferación, activación y diferenciación de las células T específicas en un modelo murino.

Para demostrar que la presencia de AR en el medio de cultivo generaban DC tipo intestinal, se realizó una PCR punto final para determinar la presencia del ARNm que codifica para la enzima Aldh1a2, la cual se ha demostrado que participa en la producción de AR por parte de

las DCi, siendo una de las principales características. Este ARNm se ve aumentado en el grupo de DC-AR, aunque también en las DC convencionales se encuentra este mensajero, Diversas investigaciones han observado que la generación de DC con una concentración de entre 10-25 ng/mL de GM-CSF induce la expresión de la enzima Aldh1a2, sin embargo, cuando además se cultivan en presencia de una concentración alta de AR, la expresión de la enzima aumenta considerablemente (Feng et al., 2010; Lutz et al., 1999; Ohoka et al., 2014). Así mismo, se realizaron PCR punto final para determinar la cantidad relativa de ARNm para citocinas proinflamatorias, encontrando que cuando las DC-AR están en condiciones basales y se estimulan con LPS sintetizan una mayor cantidad de ARNm para citocinas IFN- $\beta$ , IL-10 e IL-12. El aumento de la síntesis de ARNm de citocinas IFN- $\beta$  e IL-10 tras un estímulo, en este caso LPS, y la disminución de la expresión de IL-12 en el caso de las DC-AR, coinciden con lo reportado en 2020 por Garcias López y cols., donde tras estimular únicamente con Poli (I:C) las DC aumentaron los niveles de expresión de citocinas (Garcias López et al., 2020).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo reportado, y en un futuro sería conveniente utilizar otros métodos de detección más exactos para demostrar la capacidad de las DC-RA para metabolizar el retinol y producir AR, la cual puede ser determinada utilizando el ensayo ALDEFLUOR por ELISPOT (A. Flores-Langarica et al., 2018; Ko et al., 2020; Roe et al., 2017). Otro de los resultados observados en el establecimiento del modelo de generación de DC, fue que las DC-AR tuvieron una mayor expresión de la integrina CD103 en comparación con las DC sin AR y se relaciona con la activación de genes que codifican para este marcador por la activación de los RAR. La expresión de esta molécula está definida desde los precursores de DC que expresan los factores de transcripción IRF4 e IRF8, y por lo tanto, no es de sorprenderse que aún sin adicionar AR al medio se observe la expresión de la molécula CD103 (Roe et al., 2017, 2020; Zeng et al., 2016). Una vez demostrada la diferenciación de los precursores de MO a células DCi, se determinó la producción de TNF por el método de ELISA en el sobrenadante de las células con y sin estímulo encontrando que las células en presencia de AR tuvieron una menor producción de esta citocina inflamatoria, sugiriendo que estas células tienen un perfil menos inflamatorio que las células cultivadas sin AR (Nakawesi et al., 2020; Qiang et al., 2017). Con los resultados obtenidos se puede inferir, que el establecimiento del modelo de

generación de DC tipo intestinal es similar a lo reportado anteriormente, ya que la expresión de la enzima Aldh1a2, la expresión de CD103 y la producción de citocinas concuerda con lo reportado por diversos autores (A. Flores-Langarica et al., 2018; Qiang et al., 2017; Roe et al., 2017, 2020; Yashiro et al., 2018).

Para la siguiente fase de nuestro estudio se realizaron ensayos de proliferación utilizando células T. Para esto, se purificaron mediante selección positiva por el método de MACS, el cual consiste en utilizar un anticuerpo anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas, para posteriormente pasarlas a través de una columna acoplada a un magneto, de tal manera que las células positivas quedaran atrapadas en la columna. Esta columna era separada del magneto y agregando solución de elución y posteriormente, aplicando presión se separaban las células marcadas. Las células T CD4<sup>+</sup> provinieron de bazos de ratones previamente inmunizados con la vacuna contra RRV y retados con el rotavirus murino silvestre EDIM. Los bazos fueron extraídos a los 21 días post reto, por lo que esperamos que las células T anti-RV se encontrarán enriquecidas. Una vez purificadas las células T CD4<sup>+</sup> se contaron las células viables, utilizando una tinción de azul de tripano y se cultivaron en presencia de DC o DC-AR en una relación de 1:10 (1 DC por cada 10 linfocitos) en placas de 96 pozos de baja adherencia de fondo redondo por 96 h, cabe mencionar que las DC con o sin AR fueron cargadas con diferentes antígenos utilizando VP6 como el antígeno a reconocer por las células T. Esto debido a que la proteína VP6 es la más conservada entre los diferentes serotipos de RV y tiene muchos epítomos para las células T CD4<sup>+</sup>. A partir de estos co-cultivos, se analizaron dos variables, por un lado, la producción de TNF en el sobrenadante bajo diversos estímulos, así como la proliferación inducida en las células T CD4<sup>+</sup>. Para esta última, las células purificadas CD4<sup>+</sup>, fueron marcadas con CFSE antes de ponerlas en contacto con las DC, con y sin estímulo. Como células control se utilizaron CD4<sup>+</sup> provenientes de bazo de ratón sin inmunizar. Los resultados mostraron que, tanto de las células CD4<sup>+</sup> de ratón inmunizado como de ratón sin inmunizar contra RV, tuvieron una mayor cantidad de TNF- $\alpha$  en comparación con los cultivos donde estaban las DC-AR, lo que indica que las DC indujeron un perfil tipo Th1 debido a que había una mayor cantidad de esta citocina inflamatoria, esto debido a que, según lo reportado, es muy probable que las DC con fenotipo intestinal tengan un papel regulador en el intestino. El análisis de la proliferación inducida demostró que las células T tuvieron una mayor proliferación en los cultivos de DC,

esto evidenciado por una mayor cantidad de picos de proliferación y una IMF menor en comparación con los cultivos de células T con DC-AR, estos resultados coinciden con los observados en el 2017 Flores-Langarica y colaboradores donde observaron que las células dendríticas son capaces de reclutar y promover la proliferación de las células T en un modelo respuesta inmune en el que utilizaban flagelina de *Salmonella* soluble induciendo una mayor proliferación de células T cuando no son cultivadas con AR (A. Flores-Langarica et al., 2018). A pesar de que se pudo observar que hubo una respuesta por parte de las células T a las DC, tanto DC como DC-AR, el número de células analizadas fue reducido. Existen dos posibles causas para explicar el hecho de la baja cantidad de células T analizadas, la primera es que la estimulación de los linfocitos fue tan alta y el periodo de cultivo fue demasiado y como resultado las células comenzaron a morir, de tal manera que al momento de ser analizadas había poca cantidad de células viables. La segunda causa, y la más probable, es que las células utilizadas para nuestro experimento fueron obtenidas de ratones inmunizados contra RV utilizando la vacuna oral Rotarix, lo que generó una respuesta de memoria específica con una baja frecuencia contra los antígenos utilizados para cargar las DC. Los antígenos que utilizamos para realizar nuestro experimento fueron la proteína VP6, producida en batería y purificada por columna de GST y el péptido 289-302 de la proteína VP6 de RV, el cual proviene de una síntesis *in vitro*. Estos antígenos son altamente conservados en diferentes serotipos de rotavirus. En el control de antígeno irrelevante, en donde se utilizó únicamente LPS, no se observó una proliferación basal de células CD4<sup>+</sup> al medir la dilución de la CFSE en el citofluorómetro, lo cual coincide con lo esperado al no haber un antígeno para presentar a las células T. Bajo las condiciones de nuestros experimentos, se observó que las células T provenientes de ratones sin inmunizar, también mostraron proliferación, lo cual es atribuido a una sobreestimulación de las DC por parte del LPS. Esta es una limitante de nuestro estudio, ya que muchos de los reactivos y de los antígenos utilizados probablemente tengan contaminación con antígenos como el LPS, el cual contribuye de manera indirecta en la proliferación inespecífica aumentando el fondo de los experimentos. Por esta razón, es importante utilizar polimixina B en el medio de cultivo, un antibiótico que secuestra al LPS impidiendo que este, ya sea residual o contaminante, señalice induciendo la proliferación de manera inespecífica. Por otra parte, el enriquecimiento de las células T CD4<sup>+</sup> contra la proteína VP6 podría favorecerse inmunizando ratones por vía subcutánea o intraperitoneal,

en dos o más ocasiones con la proteína VP6 o con el péptido 289-302 en presencia de adyuvante. Esto nos permitiría tener una mayor cantidad de células T de memoria específicas para los antígenos con los que disponemos. Otra de las alternativas sería utilizar en nuestro ensayo DC cargadas con el virus completo presente en la vacuna Rotarix, de tal forma que las células T específicas contra rotavirus aisladas de bazo de estos ratones, reconocerán más epítopes en el virus completo, por lo que la proliferación específica sería más evidente. Por otra parte, sería conveniente el medir la cantidad de IL-2, ya que la producción de esta citocina es proporcional a la proliferación que se observa. La medición de IL-2 puede llevarse de manera directa mediante un ELISA o de manera indirecta, usando una línea celular indicadora dependiente de IL-2 para su proliferación. La línea celular utilizada sería CTLL-2, las cuales proliferan únicamente en presencia de IL-2, de esta manera cuando las CTLL-2 se cultivan con el medio sobrenadante de los co-cultivos de DC y de células CD4<sup>+</sup>, su proliferación será proporcional a la cantidad de IL-2 que contengan, por lo que a mayor cantidad de IL-2 tendrán una mayor proliferación de las células CTLL-2. Si bien la proliferación de células T por producción de IL-2 puede ser considerada como una medida de regulación. En el 2017 Qiang y colaboradores observaron que las DC cultivadas con AR también muestran una buena capacidad para inducir la proliferación de células T, pero dirigiéndolas hacia un perfil T<sub>REG</sub>, en el que aumenta la expresión del factor FoxP3, así como una mayor expresión de las integrinas  $\alpha 4\beta 7$  (Qiang et al., 2017), por tanto, en experimentos futuros enfocados en determinar la proliferación celular, se plantea medir la expresión del factor FoxP3 sobre las células T CD4<sup>+</sup>, ya que este es un factor de transcripción característico de las células T<sub>REG</sub>, por tanto, se esperaría una mayor cantidad de expresión de FoxP3 en cultivos celulares con DC-RA. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos nos sugieren que las DC sin AR son capaces de inducir una mayor proliferación de células T e inducir una mayor producción de citocinas inflamatorias, evidenciado principalmente por una mayor producción de TNF- $\alpha$ , por otro lado, cuando las DC son cultivadas en un ambiente rico en AR tienden a inducir una proliferación menor e inducir una menor producción de TNF- $\alpha$ , por último, cabe mencionar que aunque estas DCi generadas *in vitro*, pueden acercarnos a tener un mejor entendimiento de cómo funcionan estas células en el intestino, sigue siendo un modelo con variables controladas que permite el análisis de diferentes factores que impactan en la diferenciación de otras células que conllevan a mantener la

homeostasis a nivel intestinal, controlando el estado de inflamación que podría comprometer la integridad del organismo. Debido a la complejidad y diversidad de las poblaciones de DC, es necesario el continuar con las investigaciones que permitan elucidar los mecanismos de respuesta en infecciones virales y en distintos ambientes, esto con la finalidad de desarrollar mejores estrategias en la generación de vacunas utilizando a las DC como células blanco resaltando su importancia como iniciadoras de la respuesta inmune adaptativa.

## 9. CONCLUSIONES.

La diferenciación de precursores de médula ósea a DC en un ambiente con una concentración de 10 ng/mL de GM-CSF y 0.5 M de AR, aumenta la síntesis del ARNm para la enzima Aldh1a2 y el marcador CD103, fenotipo descrito en poblaciones de DC intestinales.

Las DC-AR producen una menor cantidad de TNF- $\alpha$ .

Las DC-RA producen una mayor cantidad de ARNm para la IL-10.

Las DC-RA muestran una menor expresión de IFN- $\beta$  e IL-12 cuando son cargadas con la proteína VP6 de RV.

Las DC sin RA inducen una mayor producción de TNF- $\alpha$  en los co-cultivos con células T.

Las DC-RA cargadas con la proteína VP6 y el péptido 289-302 inducen una menor proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> en comparación con las DC sin AR.

## **10. PERSPECTIVAS.**

Realizar experimentos utilizando células de bazo de ratones inmunizados con la proteína VP6 con adyuvante por vía parenteral.

Utilizar el virus de la vacuna Rotarix completo para cargar a las DC en las diferentes condiciones.

Determinar por citometría de flujo el fenotipo de las células T purificadas en la columna de MACS para verificar que sean linfocitos T CD4<sup>+</sup> y determinar su estado de activación.

Realizar ensayo de proliferación utilizando células CTLL-2 cultivadas en el medio de cultivo donde fueron diferenciadas las DC.

Determinar la concentración de IL-2 producida por las DC mediante inmunoensayo.

Determinar la expresión del factor FoxP3 en las células T cultivadas con DC-RA.

## REFERENCIAS.

- Aliberti, J. (2016). Immunity and tolerance induced by intestinal mucosal dendritic cells. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2016). <https://doi.org/10.1155/2016/3104727>
- Bain, C. C., Montgomery, J., Scott, C. L., Kel, J. M., Girard-Madoux, M. J. H., Martens, L., Zangerle-Murray, T. F. P., Ober-Blöbaum, J., Lindenbergh-Kortleve, D., Samsom, J. N., Henri, S., Lawrence, T., Saeys, Y., Malissen, B., Dalod, M., Clausen, B. E., & Mowat, A. M. I. (2017). TGF $\beta$ R signalling controls CD103+CD11b+ dendritic cell development in the intestine. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00658-6>
- Bennett, N. R., Zwick, D. B., Courtney, A. H., & Kiessling, L. L. (2015). Multivalent Antigens for Promoting B and T Cell Activation. *ACS Chemical Biology*, 10(8). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00239>
- Cabezas-Wallscheid, N., Buettner, F., Sommerkamp, P., Klimmeck, D., Ladel, L., Thalheimer, F. B., Pastor-Flores, D., Roma, L. P., Renders, S., Zeisberger, P., Przybylla, A., Schönberger, K., Scognamiglio, R., Altamura, S., Florian, C. M., Fawaz, M., Vonficht, D., Tesio, M., Collier, P., ... Trumpp, A. (2017). Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell*, 169(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.018>
- Cadavid, L. F., & Ph, D. (2010). LA EVOLUCIÓN DE SISTEMAS COMPLEJOS : EL CASO DEL SISTEMA INMUNE EN ANIMALES The Evolution of Complex Systems: The Case of the Immune System in Animals. *Acta Biológica Colombiana*, 14.
- Carvalho, M. F., & Gill, D. (2019). Rotavirus vaccine efficacy: current status and areas for improvement. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1520583>
- Collada, V. R. L., Bautista-Márquez, A., Sánchez-Uribe, E., & Esparza-Aguilar, M.

- (2020). Impacto poblacional a 10 años de la vacunación contra rotavirus en México. *Salud Publica de Mexico*, 62(1). <https://doi.org/10.21149/9936>
- Cook, D. N., Prosser, D. M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N. A., Abbondanzo, S. J., Niu, X. Da, Chen, S. C., Manfra, D. J., Wiekowski, M. T., Sullivan, L. M., Smith, S. R., Greenberg, H. B., Narula, S. K., Lipp, M., & Lira, S. A. (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*, 12(5). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80201-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80201-0)
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Czarnewski, P., Das, S., Parigi, S. M., & Villablanca, E. J. (2017). Retinoic acid and its role in modulating intestinal innate immunity. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/nu9010068>
- Deal, E. M., Lahl, K., Narváez, C. F., Butcher, E. C., & Greenberg, H. B. (2013). Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *Journal of Clinical Investigation*, 123(6). <https://doi.org/10.1172/JCI60945>
- Elsevier. (2020). Tipos de inmunidad adaptativa, la respuesta “mutante” contra la infección. *ElsevierConnect*, 2020.
- Feng, T., Cong, Y., Qin, H., Benveniste, E. N., & Elson, C. O. (2010). Generation of Mucosal Dendritic Cells from Bone Marrow Reveals a Critical Role of Retinoic Acid. *The Journal of Immunology*, 185(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001233>
- Ferris, S. T., Durai, V., Wu, R., Theisen, D. J., Ward, J. P., Bern, M. D., Davidson, J. T., Bagadia, P., Liu, T., Briseño, C. G., Li, L., Gillanders, W. E., Wu, G. F., Yokoyama, W. M., Murphy, T. L., Schreiber, R. D., & Murphy, K. M. (2020). cDC1 prime and are licensed by CD4+ T cells to induce anti-tumour immunity.

*Nature*, 584(7822). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2611-3>

Flores-Langarica, A., Müller Luda, K., Persson, E. K., Cook, C. N., Bobat, S., Marshall, J. L., Dahlgren, M. W., Hägerbrand, K., Toellner, K. M., Goodall, M. D., Withers, D. R., Henderson, I. R., Johansson Lindbom, B., Cunningham, A. F., & Agace, W. W. (2018). CD103 + CD11b + mucosal classical dendritic cells initiate long-term switched antibody responses to flagellin. *Mucosal Immunology*, 11(3). <https://doi.org/10.1038/mi.2017.105>

Flores-Langarica, Adriana, Cook, C., Luda, K. M., Persson, E. K., Marshall, J. L., Beristain-Covarrubias, N., Yam-Puc, J. C., Dahlgren, M., Persson, J. J., Uematsu, S., Akira, S., Henderson, I. R., Lindbom, B. J., Agace, W., & Cunningham, A. F. (2018). Intestinal CD103+CD11b+ cDC2 conventional dendritic cells are required for primary CD4+ T and B cell responses to soluble flagellin. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02409>

Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (1995). Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *Journal of Virology*, 69(12). <https://doi.org/10.1128/jvi.69.12.7800-7806.1995>

Fucikova, J., Palova-Jelinkova, L., Bartunkova, J., & Spisek, R. (2019). Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: Mechanisms and clinical applications. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02393>

Garcias López, A., Bekiaris, V., Müller Luda, K., Hütter, J., Ulmert, I., Getachew Muleta, K., Nakawesi, J., Kotarsky, K., Malissen, B., O'Keeffe, M., Holzmann, B., Winston Agace, W., & Lahl, K. (2020). Migration of murine intestinal dendritic cell subsets upon intrinsic and extrinsic TLR3 stimulation. *European Journal of Immunology*, 50(10). <https://doi.org/10.1002/eji.201948497>

Gardner, A., de Mingo Pulido, Á., & Ruffell, B. (2020). Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00924>

- Gasteiger, G., D'osualdo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M., & Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. In *Journal of Innate Immunity* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.1159/000453397>
- Gómez-Rial, J., Rivero-Calle, I., Salas, A., & Martín-Torres, F. (2020). Rotavirus and autoimmunity. In *Journal of Infection* (Vol. 81, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.041>
- Goverse, G., Molenaar, R., Macia, L., Tan, J., Erkelens, M. N., Konijn, T., Knippenberg, M., Cook, E. C. L., Hanekamp, D., Veldhoen, M., Hartog, A., Roeselers, G., Mackay, C. R., & Mebius, R. E. (2017). Diet-Derived Short Chain Fatty Acids Stimulate Intestinal Epithelial Cells To Induce Mucosal Tolerogenic Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 198(5), 2172–2181. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600165>
- Greene, T. T., & Zuniga, E. I. (2021). Type i interferon induction and exhaustion during viral infection: Plasmacytoid dendritic cells and emerging covid-19 findings. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/v13091839>
- Guermónprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
- Hasegawa, H., & Matsumoto, T. (2018). Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00350>
- Hilpert, C., Sitte, S., Arnold, H., Lehmann, C. H. K., Dudziak, D., Mattner, J., & Voehringer, D. (2019). Dendritic Cells Control Regulatory T Cell Function Required for Maintenance of Intestinal Tissue Homeostasis. *The Journal of Immunology*, 203(11), 3068–3077. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900320>
- Huang, H. I., Jewell, M. L., Youssef, N., Huang, M. N., Hauser, E. R., Fee, B. E., Rudemiller, N. P., Privratsky, J. R., Zhang, J. J., Reyes, E. Y., Wang, D., Taylor, G. A., Gunn, M. D., Ko, D. C., Cook, D. N., Chandramohan, V., Crowley, S. D.,

- & Hammer, G. E. (2021). Th17 Immunity in the Colon Is Controlled by Two Novel Subsets of Colon-Specific Mononuclear Phagocytes. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.661290>
- Ibrahim, M. K., Zambruni, M., Melby, C. L., & Melby, P. C. (2017). Impact of childhood malnutrition on host defense and infection. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 30, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00119-16>
- Iwabuchi, R., Ide, K., Terahara, K., Wagatsuma, R., Iwaki, R., Matsunaga, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., Takeyama, H., & Takahashi, Y. (2021). Development of an Inflammatory CD14+ Dendritic Cell Subset in Humanized Mice. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643040>
- Jamwal, D. R., Ramalingam, R., Midura-Kiela, M., Ghishan, F. K., & Kiela, P. R. (2017). TGFβ' Signaling in Dendritic Cells is Required for the Maintenance of CD8 + CD103 + Regulatory T Cell Pool. *Gastroenterology*, 152(5). [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(17\)32179-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(17)32179-0)
- Johansson, C., Wetzel, J. D., He, J. P., Mikacenic, C., Dermody, T. S., & Kelsall, B. L. (2007). Type I interferons produced by hematopoietic cells protect mice against lethal infection by mammalian reovirus. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6). <https://doi.org/10.1084/jem.20061587>
- Kaur, B. P., & Secord, E. (2019). Innate Immunity. In *Pediatric Clinics of North America* (Vol. 66, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2019.06.011>
- Kim, E. W., De Leon, A., Jiang, Z., Radu, R. A., Martineau, A. R., Chan, E. D., Bai, X., Su, W.-L., Montoya, D. J., Modlin, R. L., & Liu, P. T. (2019). Vitamin A Metabolism by Dendritic Cells Triggers an Antimicrobial Response against Mycobacterium tuberculosis. *MSphere*, 4(3), 1–14. <https://doi.org/10.1128/msphere.00327-19>
- Kirkling, M. E., Cytlak, U., Lau, C. M., Lewis, K. L., Resteu, A., Khodadadi-Jamayran, A., Siebel, C. W., Salmon, H., Merad, M., Tsirigos, A., Collin, M., Bigley, V., & Reizis, B. (2018). Notch Signaling Facilitates In Vitro Generation of Cross-Presenting Classical Dendritic Cells. *Cell Reports*, 23(12).

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.068>

Klarquist, J., Cross, E. W., Thompson, S. B., Willett, B., Aldridge, D. L., Caffrey-Carr, A. K., Xu, Z., Hunter, C. A., Getahun, A., & Kedl, R. M. (2021). B cells promote CD8 T cell primary and memory responses to subunit vaccines. *Cell Reports*, 36(8). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109591>

Ko, H. J., Hong, S. W., Verma, R., Jung, J., Lee, M., Kim, N., Kim, D., Surh, C. D., Kim, K. S., Rudra, D., & Im, S. H. (2020). Dietary Glucose Consumption Promotes RALDH Activity in Small Intestinal CD103+CD11b+ Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01897>

Kolawole, A. O., Gonzalez-Hernandez, M. B., Turula, H., Yu, C., Elftman, M. D., & Wobus, C. E. (2016). Oral Norovirus Infection Is Blocked in Mice Lacking Peyer's Patches and Mature M Cells. *Journal of Virology*, 90(3). <https://doi.org/10.1128/jvi.02872-15>

Labastida-Conde, R. G., Ramírez-Pliego, O., Peleteiro-Olmedo, M., Lopez-Guerrero, D. V., Badillo-Godinez, O. D., Gutiérrez-Xicoténcatl, M. de L., Rosas-Salgado, G., González-Fernández, Á., Esquivel-Guadarrama, F. R., & Santana, M. A. (2018). Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine*, 36(29), 4188–4197. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.005>

Lappalainen, S., Pastor, A. R., Malm, M., López-Guerrero, V., Esquivel-Guadarrama, F., Palomares, L. A., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2015). Protection against live rotavirus challenge in mice induced by parenteral and mucosal delivery of VP6 subunit rotavirus vaccine. *Archives of Virology*, 160(8), 2075–2078. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2461-8>

Lee, W., & Lee, G. R. (2018). Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 50, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/emm.2017.313>

Li, R. J. E., de Haas, A., Rodríguez, E., Kalay, H., Zaal, A., Jimenez, C. R., Piersma, S. R., Pham, T. V., Henneman, A. A., de Goeij-de Haas, R. R., van Vliet, S. J.,

- & van Kooyk, Y. (2021). Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Dendritic Cell- Specific STAT Signaling After  $\alpha$ 2-3-Linked Sialic Acid Ligand Binding. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.673454>
- Livanos, A. E., Jha, D., Cossarini, F., Gonzalez-Reiche, A. S., Tokuyama, M., Aydillo, T., Parigi, T. L., Ladinsky, M. S., Ramos, I., Dunleavy, K., Lee, B., Dixon, R. E., Chen, S. T., Martinez-Delgado, G., Nagula, S., Bruce, E. A., Ko, H. M., Glicksberg, B. S., Nadkarni, G., ... Mehandru, S. (2021). Intestinal Host Response to SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Outcomes in Patients With Gastrointestinal Symptoms. *Gastroenterology*, 160(7). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.056>
- Lopez-Guerrero, D. V., Arias, N., Gutierrez-Xicotencatl, L., Chihu-Ampan, L., González, A., Pedroza-Saavedra, A., Rosas-Salgado, G., Villegas-Garcia, J. C., Badillo-Godinez, O., Fernandez, G., Lopez, S., & Esquivel-Guadarrama, F. (2018). Enhancement of VP6 immunogenicity and protective efficacy against rotavirus by VP2 in a genetic immunization. *Vaccine*, 36(22), 3072–3078. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.104>
- Lopez-Guerrero, Delia V., Meza-Perez, S., Ramirez-Pliego, O., Santana-Calderon, M. A., Espino-Solis, P., Gutierrez-Xicotencatl, L., Flores-Romo, L., & Esquivel-Guadarrama, F. R. (2010). Rotavirus Infection Activates Dendritic Cells from Peyer's Patches in Adult Mice. *Journal of Virology*, 84(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.02640-08>
- Luna-Casas, G., Juliao, P., Carreño-Manjarrez, R., Castañeda-Prado, A., Cervantes-Apolinar, M. Y., Navarro-Rodriguez, R., Sánchez-González, G., Cortés-Alcalá, R., & DeAntonio, R. (2019). Vaccine coverage and compliance in Mexico with the two-dose and three-dose rotavirus vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 15(6). <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1540827>
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., &

- Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*, 223(1), 77–92. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-X)
- Marie, C., Ali, A., Chandwe, K., Petri, W. A., & Kelly, P. (2018). Pathophysiology of environmental enteric dysfunction and its impact on oral vaccine efficacy. In *Mucosal Immunology* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0036-1>
- Mattiuz, R., Brousse, C., Ambrosini, M., Cancel, J. C., Bessou, G., Mussard, J., Sanlaville, A., Caux, C., Bendriss-Vermare, N., Valladeau-Guilemond, J., Dalod, M., & Crozat, K. (2021). Type 1 conventional dendritic cells and interferons are required for spontaneous CD4+ and CD8+ T-cell protective responses to breast cancer. *Clinical and Translational Immunology*, 10(7). <https://doi.org/10.1002/cti2.1305>
- Mayer, J. U., Demiri, M., Agace, W. W., MacDonald, A. S., Svensson-Frej, M., & Milling, S. W. (2017). Different populations of CD11b+ dendritic cells drive Th2 responses in the small intestine and colon. *Nature Communications*, 8, 15820. <https://doi.org/10.1038/ncomms15820>
- Nakawesi, J., This, S., Hütter, J., Boucard-Jourdin, M., Barateau, V., Muleta, K. G., Gooday, L. J., Thomsen, K. F., López, A. G., Ulmert, I., Poncet, D., Malissen, B., Greenberg, H., Thauinat, O., Defrance, T., Paidassi, H., & Lahl, K. (2020).  $\alpha\beta 8$  integrin-expression by BATF3-dependent dendritic cells facilitates early IgA responses to Rotavirus. *Mucosal Immunology*, 14(1), 53–67. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0276-8>
- Ohoka, Y., Yokota-Nakatsuma, A., Maeda, N., Takeuchi, H., & Iwata, M. (2014). Retinoic acid and GM-CSF coordinately induce retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) expression through cooperation between the RAR/RXR complex and Sp1 in dendritic cells. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096512>

- Okeke, E. B., & Uzonna, J. E. (2019). The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00680>
- Pérez-Ortín, R., Santiso-Bellón, C., Vila-Vicent, S., Carmona-Vicente, N., Rodríguez-Díaz, J., & Buesa, J. (2019). Rotavirus symptomatic infection among unvaccinated and vaccinated children in Valencia, Spain. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4550-x>
- Petersone, L., Edner, N. M., Ovcinnikovs, V., Heuts, F., Ross, E. M., Ntavli, E., Wang, C. J., & Walker, L. S. K. (2018). T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01941>
- Potiron, L., Lacroix-Lamandé, S., Marquis, M., Lavern, Y., Fort, G., Franceschini, I., & Laurent, F. (2019). Batf3-Dependent intestinal dendritic cells play a critical role in the control of cryptosporidium parvum infection. *Journal of Infectious Diseases*, *219*(6). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy528>
- Qian, C., & Cao, X. (2018). Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. In *Seminars in Immunology* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.002>
- Qiang, Y., Xu, J., Yan, C., Jin, H., Xiao, T., Yan, N., Zhou, L., An, H., Zhou, X., Shao, Q., & Xia, S. (2017). Butyrate and retinoic acid imprint mucosal-like dendritic cell development synergistically from bone marrow cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *189*(3). <https://doi.org/10.1111/cei.12990>
- Rampal, R., Awasthi, A., & Ahuja, V. (2016). Retinoic acid-primed human dendritic cells inhibit Th9 cells and induce Th1/Th17 cell differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, *100*(1), 111–120. <https://doi.org/10.1189/jlb.3vma1015-476r>
- Redpath, S. A., Heieis, G. A., Reynolds, L. A., Fonseca, N. M., Kim, S. S. Y., & Perona-Wright, G. (2018). Functional specialization of intestinal dendritic cell subsets during Th2 helminth infection in mice. *European Journal of Immunology*, *48*(1). <https://doi.org/10.1002/eji.201747073>

- Reyes Martín, E., Prieto Martín, A., Díaz Martín, D., & Álvarez-Mon Soto, M. (2013). Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. *Medicine (Spain)*, 11(28). [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70553-5](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70553-5)
- Rhinn, M., & Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139(5). <https://doi.org/10.1242/dev.065938>
- Rodríguez, L. S., Narváez, C. F., Rojas, O. L., Franco, M. A., & Ángel, J. (2012). Human myeloid dendritic cells treated with supernatants of rotavirus infected Caco-2 cells induce a poor Th1 response. *Cellular Immunology*, 272(2). <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.10.017>
- Roe, M. M., Hashimi, M., Swain, S., Woo, K. M., & Bimczok, D. (2020). p38 MAPK signaling mediates retinoic acid-induced CD103 expression in human dendritic cells. *Immunology*, 161(3). <https://doi.org/10.1111/imm.13246>
- Roe, M. M., Swain, S., Sebrell, T. A., Sewell, M. A., Collins, M. M., Perrino, B. A., Smith, P. D., Smythies, L. E., & Bimczok, D. (2017). Differential regulation of CD103 ( $\alpha$ E integrin) expression in human dendritic cells by retinoic acid and Toll-like receptor ligands. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5). <https://doi.org/10.1189/jlb.1ma0316-131r>
- Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gómez-Humarán, I. M., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., Rivera-Dommarco, J. Á., & Hernández-Ávila, M. (2016). [Methodological design of the National Health and Nutrition Survey 2016]. *Salud Publica de Mexico*, 59(3), 299–305. <https://doi.org/10.21149/8593>
- Rosales-Martinez, D., Gutierrez-Xicotencatl, L., Badillo-Godinez, O., Lopez-Guerrero, D., Santana-Calderon, A., Cortez-Gomez, R., Ramirez-Pliego, O., & Esquivel-Guadarrama, F. (2016). Rotavirus activates dendritic cells derived from umbilical cord blood monocytes. *Microbial Pathogenesis*, 99, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.020>
- Rusek, P., Wala, M., Druszczyńska, M., & Fol, M. (2018). Infectious agents as stimuli of trained innate immunity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol.

19, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020456>

Sánchez, P. C., & Villa, J. M. M. (2015). Sistema inmunitario de la mucosa intestinal. *REDUCA (Biología)*.

Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., & Tetro, J. A. (2018). Rotavirus. In *Foodborne Disease Handbook: Volume II: Viruses, Parasites, Pathogens, and HACCP*. <https://doi.org/10.1201/9781351072106>

Sharma, A., & Rudra, D. (2018). Emerging functions of regulatory T cells in tissue homeostasis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00883>

Silvin, A., Yu, C. I., Lahaye, X., Imperatore, F., Brault, J. B., Cardinaud, S., Becker, C., Kwan, W. H., Conrad, C., Maurin, M., Goudot, C., Marques-Ladeira, S., Wang, Y., Pascual, V., Anguiano, E., Albrecht, R. A., Iannaccone, M., García-Sastre, A., Goud, B., ... Manel, N. (2017). Constitutive resistance to viral infection in human CD141+ dendritic cells. *Science Immunology*, 2(13). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aai8071>

Stagg, A. J. (2018). Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02883>

Steimle, A., & Frick, J. S. (2016). Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1958650>

Sun, T., Rojas, O. L., Li, C., Ward, L. A., Philpott, D. J., & Gommerman, J. L. (2017). Intestinal Batf3-dependent dendritic cells are required for optimal antiviral T-cell responses in adult and neonatal mice. *Mucosal Immunology*, 10(3). <https://doi.org/10.1038/mi.2016.79>

Sun, Tian, Nguyen, A., & Gommerman, J. L. (2020). Dendritic Cell Subsets in Intestinal Immunity and Inflammation. *The Journal of Immunology*, 204(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900710>

Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Dendritic cells I: Basic biology and

functions. *Inmunologia*, 31(1), 21–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2011.10.001>

Vlasova, A. N., Chattha, K. S., Kandasamy, S., Siegismund, C. S., & Saif, L. J. (2013). Prenatally Acquired Vitamin A Deficiency Alters Innate Immune Responses to Human Rotavirus in a Gnotobiotic Pig Model. *The Journal of Immunology*, 190(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203575>

Wohn, C., Le Guen, V., Voluzan, O., Fiore, F., Henri, S., & Malissen, B. (2020). Absence of MHC class II on cDC1 dendritic cells triggers fatal autoimmunity to a cross-presented self-antigen. *Science Immunology*, 5(45). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba1896>

Yashiro, T., Yamaguchi, M., Watanuki, Y., Kasakura, K., & Nishiyama, C. (2018). The Transcription Factors PU.1 and IRF4 Determine Dendritic Cell–Specific Expression of RALDH2. *The Journal of Immunology*, 201(12), 3677–3682. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800492>

Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S. Y., & Iwata, M. (2009). GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *International Immunology*, 21(4). <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp003>

Zeng, R., Bscheider, M., Lahl, K., Lee, M., & Butcher, E. C. (2016). Generation and transcriptional programming of intestinal dendritic cells: Essential role of retinoic acid. *Mucosal Immunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/mi.2015.50>

# ANEXOS.

## Protocolo GM-CSF Gibco.

**gibco**

PRODUCT INFORMATION SHEET

### Recombinant Mouse Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

Catalog Number PMC2014 (2 µg), PMC2015 (10 µg), PMC2016 (25 µg), PMC2011 (100 µg), PMC2013 (1 mg)

Pub. No. MAN0003599 Rev. A.0

#### Product specifications

<b>Lot number</b>	See product label.
<b>Molecular weight</b>	14 kDa
<b>Purity</b>	>95% as determined by SDS PAGE analysis.
<b>Biological activity</b>	ED <sub>50</sub> <0.01 ng/mL, determined by the dose dependent proliferation of MC/9 cells. Determine the optimal concentration for each specific application using an initial dose response assay.
<b>Formulation</b>	Lyophilized, carrier free.
<b>Sterility</b>	Filtered before lyophilization through a 0.22 micron sterile filter.
<b>Endotoxin</b>	<0.1 ng/µg
<b>Production</b>	Produced in <i>E. coli</i> and purified via sequential chromatography.
<b>Reconstitution recommendation</b>	Centrifuge the vial briefly, before opening to bring the contents to the bottom. Reconstitute the lyophilized protein in sterile, distilled water to a concentration of 0.1–1.0 mg/mL. Apportion the reconstituted protein into working aliquots and store at ≤ -20°C. Make any further dilutions of the reconstituted protein in low endotoxin medium or a buffered solution containing a carrier protein such as heat inactivated FCS or tissue culture grade BSA.
<b>Suggested working dilutions</b>	The optimal concentration should be determined for each specific application.
<b>Storage</b>	Store the lyophilized protein at 2–8°C, preferably desiccated. Upon reconstitution, apportion into working aliquots and store at ≤ -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
<b>Expiration date</b>	Expires one year from date of receipt when stored as instructed.
<b>References</b>	<p>Beissert, S, Hosoi, J, Grabbe, S, Asahina, A, and Granstein, RD. (1995) IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. <i>J. Immunol.</i> 154(3):1280-1286.</p> <p>Bradney, CP, Sempowski, GD, Liao, HX, Haynes, BF, and Staats, HF. (2002) Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. <i>J. Virol.</i> 76(2):517-524.</p> <p>Grabbe, S, Steinert, M, Mahnke, K, Schwartz, A, Luger, TA, and Schwarz, T. (1996) Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. <i>J. Clin. Invest.</i> 98(5):1158-1164.</p> <p>Jones, M, Komatsu, M, and Levy, RB. (2000) Cytotoxically impaired transplant recipients can efficiently resist major histocompatibility complex-matched bone marrow allografts. <i>Biol. Blood Marrow Transplantation</i> 6 (4A):456-464.</p> <p>Mackey, MF, Wang, Z, Eichelberg, K, and Germain, RN. (2003) Distinct contributions of different CD40 TRAF binding sites to CD154-induced dendritic cell maturation and IL-12 secretion. <i>Eur. J. Immunol.</i> 33(3):779-789.</p> <p>Rubinson, DA, Dillon, CP, Kwiatkowski, AV, Sievers, C, Yang, LL, Kopinja, J, Zhang, MD, McManus, MT, Gertler, FB, Scott, ML, and Van Parijs, L. (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. <i>Nature Genetics</i> 33(3):401-406.</p> <p>Stumbles, PA, Thomas, JA, Pimm, CL, Lee, PT, Venaille, TJ, Proksch, S, and Holt, PG. (1998) Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 [Th2] responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. <i>J. Exp. Med.</i> 188(11):2019-2031.</p>

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).

## Explanation of Symbols

Symbol	Description	Symbol	Description	Symbol	Description
	Manufacturer		Catalog number		Batch code
	Use by		Temperature limitation		
	Consult instructions for use		Caution, consult accompanying documents		



Life Technologies Corporation | 5781 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008

For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to [thermofisher.com/symbols-definition](http://thermofisher.com/symbols-definition).

The information in this guide is subject to change without notice.

**DISCLAIMER:** TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

**Important Licensing Information:** This product may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of this product, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2019 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

[thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support) | [thermofisher.com/askaquestion](http://thermofisher.com/askaquestion)  
[thermofisher.com](http://thermofisher.com)

28 October 2019

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Mouse TNF alpha ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for quantitative detection of mouse TNF  $\alpha$

**Catalog Numbers** BMS607-3 and BMS607-3TEN

**Pub. No.** MAN0017837 **Rev.** A.0 [30]

**WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

### Product description

The Mouse TNF alpha ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of mouse TNF alpha. Cell culture supernatant, serum, and plasma (EDTA, citrate) have been tested with this assay.

TNF alpha is a multifunctional cytokine involved in many different pathways, in homeostasis and pathophysiology of mammals. It can show opposing biological effects suggesting complex regulatory mechanisms. TNF alpha, also known as cachectin, was first detected as a cytotoxic factor inducing lysis of certain tumor cells. The TNF alpha gene is member 2 of the TNF-superfamily (consisting of at least 20 distinct members).

### Principles of the test

An anti-mouse TNF alpha coating antibody is adsorbed onto microwells.

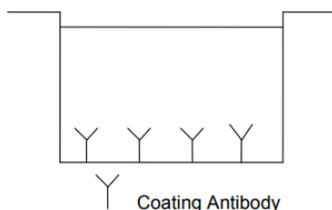


Fig. 1 Coated microwell

Mouse TNF alpha present in the sample or standard binds to antibodies adsorbed to the microwells and a biotin-conjugated anti-mouse TNF alpha antibody is added and binds to mouse TNF alpha captured by the first antibody.

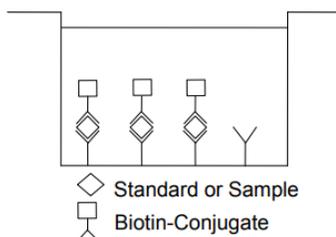


Fig. 2 First incubation

Following incubation, unbound biotin-conjugated anti-mouse TNF alpha antibody is removed during a wash step. Streptavidin-HRP is added and binds to the biotin-conjugated anti-mouse TNF alpha antibody.

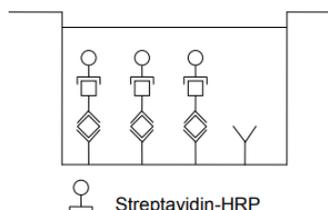


Fig. 3 Second incubation

Following incubation, unbound Streptavidin-HRP is removed during the wash step, and substrate solution reactive with HRP is added to the wells.

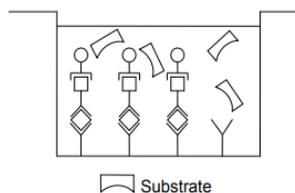


Fig. 4 Third incubation

A coloured product is formed in proportion to the amount of TNF alpha present in the sample or standard. The reaction is terminated by addition of acid and absorbance is measured at 450 nm. A standard curve is prepared from 7 TNF alpha standard dilutions and TNF alpha sample concentration determined.

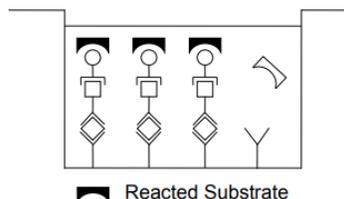


Fig. 5 Stop reaction

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Reagents provided

### Reagents for mouse TNF alpha ELISA BMS607-3 (96 tests)

1 aluminum pouch with a Microwell Plate coated with monoclonal antibody to mouse TNF alpha

1 vial (70 µL) Biotin-Conjugate anti-mouse TNF alpha polyclonal antibody

1 vial (150 µL) Streptavidin-HRP

2 vials mouse TNF alpha Standard lyophilized, 2 ng/ml upon reconstitution

1 bottle (5 mL) Calibrator Diluent

1 bottle (12 mL) Sample Diluent

1 vial (5 mL) Assay Buffer Concentrate 20x (PBS with 1% Tween™ 20, 10% BSA)

1 bottle (50 mL) Wash Buffer Concentrate 20x (PBS with 1% Tween™ 20)

1 vial (15 mL) Substrate Solution (tetramethyl-benzidine)

1 vial (15 mL) Stop Solution (1M Phosphoric acid)

4 Adhesive Films

### Reagents for mouse TNF alpha ELISA BMS607-3TEN (10 x 96 tests)

10 aluminum pouches with a Microwell Plate coated with monoclonal antibody to mouse TNF alpha

10 vials (70 µL) Biotin-Conjugate anti-mouse TNF alpha polyclonal antibody to mouse TNF alpha

10 vials (150 µL) Streptavidin-HRP

10 vials mouse TNF alpha Standard lyophilized, 2 ng/mL upon reconstitution

5 bottles (5 mL) Calibrator Diluent

6 bottles (12 mL) Sample Diluent

2 vials (5 mL) Assay Buffer Concentrate 20x (PBS with 1% Tween™ 20, 10% BSA)

7 bottles (50 mL) Wash Buffer Concentrate 20x (PBS with 1% Tween™ 20)

10 vials (15 mL) Substrate Solution (tetramethyl-benzidine)

1 vial (100 mL) Stop Solution (1M Phosphoric acid)

20 Adhesive Films

## Storage instructions – ELISA kit

Store kit reagents between 2° and 8°C. Immediately after use remaining reagents should be returned to cold storage (2° to 8°C). Expiry of the kit and reagents is stated on labels.

Expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, this reagent is not contaminated by the first handling.

## Sample collection and storage instructions

Cell culture supernatant, serum and plasma (EDTA, citrate) were tested with this assay. Other biological samples might be suitable for use in the assay. Remove serum or plasma from the clot or cells as soon as possible after clotting and separation.

Samples containing a visible precipitate must be clarified prior to use in the assay. Do not use grossly hemolyzed or lipemic samples.

Samples should be aliquoted and must be stored frozen at -20°C to avoid loss of bioactive mouse TNF alpha. If samples are to be run within 24 hours, they may be stored at 2-8°C

Avoid repeated freeze-thaw cycles. Prior to assay, the frozen sample should be brought to room temperature slowly and mixed gently.

## Materials required but not provided

- 5 mL and 10 mL graduated pipettes
- 5 µL to 1000 µL adjustable single channel micropipettes with disposable tips
- 50 µL to 300 µL adjustable multichannel micropipette with disposable tips
- Multichannel micropipette reservoir
- Beakers, flasks, cylinders necessary for preparation of reagents
- Device for delivery of wash solution (multichannel wash bottle or automatic wash system)
- Microwell strip reader capable of reading at 450 nm (620 nm as optional reference wave length)
- Glass-distilled or deionized water
- Statistical calculator with program to perform regression analysis

## Precautions for use

- All chemicals should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses, and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water. See material safety data sheet(s) and/or safety statement(s) for specific advice.
- Reagents are intended for research use only and are not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or other sources.
- Do not use kit reagents beyond expiration date on label.
- Do not expose kit reagents to strong light during storage or incubation.
- Do not pipet by mouth.
- Do not eat or smoke in areas where kit reagents or samples are handled.
- Avoid contact of skin or mucous membranes with kit reagents or samples.
- Rubber or disposable latex gloves should be worn while handling kit reagents or samples.
- Avoid contact of substrate solution with oxidizing agents and metal.
- Avoid splashing or generation of aerosols.
- To avoid microbial contamination or cross-contamination of reagents or samples that may invalidate the test, use disposable pipette tips and/or pipettes.
- Use clean, dedicated reagent trays for dispensing the conjugate and substrate reagent.
- Exposure to acid inactivates the conjugate.
- Glass-distilled water or deionized water must be used for reagent preparation.
- Substrate solution must be at room temperature prior to use.
- Decontaminate and dispose samples and all potentially contaminated materials as if they could contain infectious agents. The preferred method of decontamination is autoclaving for a minimum of 1 hour at 121.5°C.
- Liquid wastes not containing acid and neutralized waste may be mixed with sodium hypochlorite in volumes such that the final mixture contains 1.0% sodium hypochlorite. Allow 30 minutes for effective decontamination. Liquid waste containing acid must be neutralized prior to the addition of sodium hypochlorite.

## Preparation of reagents

1. Buffer Concentrates should be brought to room temperature and should be diluted before starting the test procedure.
2. If crystals have formed in the Buffer Concentrates, warm them gently until they have completely dissolved.

### Wash buffer (1x)

1. Pour entire contents (50 mL) of the Wash Buffer Concentrate (20x) into a clean 1000 mL graduated cylinder. Bring to final volume of 1000 mL with glass-distilled or deionized water. Mix gently to avoid foaming.
2. Transfer to a clean wash bottle and store at 2° to 25°C. Please note that Wash Buffer (1x) is stable for 30 days.
3. Wash Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x) (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

### Assay buffer (1x)

1. Pour the entire contents (5 mL) of the Assay Buffer Concentrate (20x) into a clean 100 mL graduated cylinder. Bring to final volume of 100 mL with distilled water. Mix gently to avoid foaming.
2. Store at 2–8°C. The Assay Buffer (1x) is stable for 30 days.
3. Assay Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (20x) (mL)	Distilled Water (mL)
1–6	2.5	47.5
1–12	5.0	95.0

## Biotin-Conjugate

**Note:** The Biotin-Conjugate should be used within 30 minutes after dilution.

For serum and plasma samples, make a 1:100 dilution of the concentrated Biotin-Conjugate solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (mL)	Assay Buffer (1x) (mL)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

For cell culture supernatant samples, make a 1:200 dilution of the concentrated Biotin-Conjugate solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (mL)	Assay Buffer (1x) (mL)
1 - 6	0.015	2.985
1 - 12	0.03	5.97

## Streptavidin-HRP

**Note:** The Streptavidin-HRP should be used within 30 minutes after dilution.

Make a 1:100 dilution of the concentrated Streptavidin-HRP solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Streptavidin-HRP (mL)	Assay Buffer (1x) (mL)
1 - 6	0.06	5.94
1 - 12	0.12	11.88

## Mouse TNF alpha standard

1. Reconstitute mouse TNF alpha standard by addition of Calibrator Diluent (for subsequent measurement of serum or plasma samples) or Sample Diluent (for subsequent measurement of cell culture supernatant samples).
2. Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial. Swirl or mix gently to insure complete and homogeneous solubilization (concentration of reconstituted standard = 2 ng/mL).
3. Allow the standard to reconstitute for 10-30 minutes. Mix well prior to making dilutions.
4. After usage remaining standard cannot be stored and has to be discarded.

### External standard dilution

1. Label 6 tubes, one for each standard point: S2, S3, S4, S5, S6, S7 (the reconstituted standard serves as S1).
2. Prepare 1:2 serial dilutions for the standard curve as follows: Pipette 130 µL of Calibrator Diluent (for subsequent measurement of serum or plasma samples) or Sample Diluent (for subsequent measurement of cell culture supernatant samples) into each tube.
3. Pipette 130 µL of reconstituted standard (S1 = 2 ng/mL) into the first tube, labeled S2, and mix (concentration of S2 = 1 ng/mL).
4. Pipette 130 µL of this dilution into the second tube, labeled S3, and mix thoroughly before the next transfer.
5. Repeat serial dilutions 4 more times thus creating the points of the standard curve (see Figure 6).

Sample Diluent serves as blank.

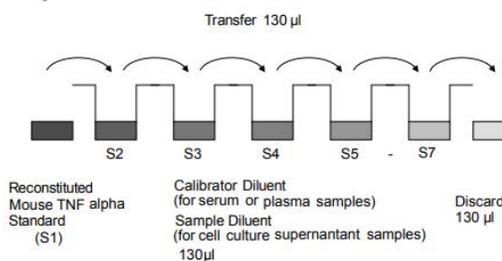


Fig. 6 Dilute standards - tubes

Constancias de asistencia a cursos durante la maestría.



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

a

**RICARDO ABAD BALBUENA SANCHEZ**

Por haber completado con éxito el

## 3er. Curso en Línea de Inmunología Básica

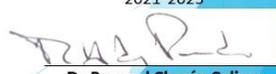
Realizado del 01 al 31 de agosto de 2021  
Valor curricular: 96 horas teóricas

*Ciudad de Aguascalientes a 31 de agosto de 2021*

  
**Dr. José Antonio Enciso Moreno**  
PRESIDENTE SMI  
2021-2023

  
**Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado**  
SECRETARIO-TESORERO SMI  
2021-2023

  
**Dra. Eva María Salinas Miralles**  
Universidad Autónoma de Aguascalientes  
ORGANIZADORA DEL CURSO

  
**Dr. Rommel Chacón Salinas**  
Instituto Politécnico Nacional  
ORGANIZADOR DEL CURSO



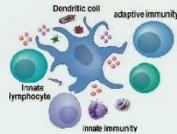
La Universidad Autónoma de Aguascalientes

Otorga la presente:

# CONSTANCIA

## A: RICARDO ABAD BALBUENA SÁNCHEZ

Por haber acreditado el:



**III CURSO INTERNACIONAL**  
**Inmunidad Innata en Salud**  
**y Enfermedades Infecciosas**

Realizado de manera virtual del 20 de septiembre al 1º de octubre de 2021.

Obteniendo una calificación de: 9-NUEVE-

Horas: 45 -cuarenta y cinco-

Créditos: 3 -tres-

Aguascalientes, Ags., México, 1º de Octubre de 2021.

Dr. en C. Francisco Javier Avelar González  
**RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA**  
**DE AGUASCALIENTES**

Dr. Daniel Scott-Algara  
**COORDINADOR DE RELACIONES DEL**  
**INSTITUTO PASTEUR CON AMÉRICA LATINA**

*"SE LUMEN PROFERRE"*



DIRECCION GENERAL DE  
DIFUSION Y VINCULACION

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



# Facultad de Nutrición

Otorga la presente



# CONSTANCIA

A

**LN. RICARDO ABAD BALBUENA SÁNCHEZ**

Por: Su participación en el "6to Encuentro de egresados"  
Sede: Facultad de Nutrición

Cuernavaca, Morelos. 03 de marzo 2022

Mtra. Jérica López Bucio Fabián  
Directora Interina de la Facultad de Nutrición

*Por una humanidad culta*

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



**30**  
1992  
2022  
ANIVERSARIO

La Comisión Nacional de Bioética  
otorga la presente

## **CONSTANCIA**

a

**Ricardo Abad Balbuena Sánchez**

Por su asistencia al foro virtual

**Ética en el uso de animales de laboratorio  
con fines de investigación en salud**

realizado el 22 de abril de 2022  
con duración de dos horas.  
Calificación 100

Ciudad de México, mayo de 2022

**Dr. Patricio Javier Santillán Doherty**  
Comisionado Nacional de Bioética





Otorga la presente

# CONSTANCIA

a

**Ricardo Abad Balbuena Sánchez**

Por haber participado en el **Taller de Farmacología en Nutrición** llevado a cabo el 30 de Julio de 2022 vía online con una duración de dos horas.



O.F.B. Déborah Alejandra  
Araujo Lopez  
Directora Académica



UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO

Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud  
Universidad de Guanajuato, Campus León

# XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

24-26 Agosto 2022

OTORGA LA PRESENTE  
CONSTANCIA

A:

**RICARDO ABAD BALBUENA  
SÁNCHEZ**

Por su asistencia a la XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas, evento híbrido con una duración de 20 horas, celebrado los días 24 al 26 de Agosto en el auditorio Jorge Ibarra en el Departamento de Estudios Culturales de la Universidad de Guanajuato, Campus León.

24, 25 y 26 de Agosto del 2022 en León, Gto.

"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

**Dr. Tonatiuh García Campos**  
Director de División de  
Ciencias de la Salud

**Dra. Claudia Luévano Contreras**  
Directora del Departamento de  
Ciencias Médicas

**Dra. Lorena del Rocio Ibarra Reynoso**  
Coordinadora de la Maestría  
en Ciencias Médicas

**Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy**  
Coordinadora del Doctorado  
en Ciencias Médicas

Constancia de presentación de proyecto en congreso.



UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO

Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud  
Universidad de Guanajuato, Campus León

# XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

24-26 Agosto 2022

OTORGA LA PRESENTE  
CONSTANCIA

A:

**RICARDO ABAD BALBUENA SÁNCHEZ**

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO LIBRE:  
**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA  
ROTAVIRUS INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS TIPO INTESTINAL EN  
UN MODELO IN VITRO.**

EN COAUTORÍA CON:  
**DELIA VANESSA LÓPEZ-GUERRERO . FERNANDO ESQUIVEL  
GUADARRAMA .**

24, 25 y 26 de Agosto del 2022 en León, Gto.

"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

Dr. Tonatiuh García Campos  
Director de División de  
Ciencias de la Salud

Dra. Claudia Luévano Contreras  
Directora del Departamento de  
Ciencias Médicas

Dra. Lorena del Rocio Ibarra Reynoso  
Coordinadora de la Maestría  
en Ciencias Médicas

Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy  
Coordinadora del Doctorado  
en Ciencias Médicas

Cuernavaca, Mor., 23 de marzo de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la  
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA ROTAVIRUS INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS TIPO INTESTINAL EN UN MODELO *IN VITRO*”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Ricardo Abad Balbuena Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**Atentamente**

**Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ** | Fecha:2023-03-28 14:50:43 | Firmante

Wli1cnnfb5Wr1eiAAkAb4t6M6Jcur8vt01QdTJFEJoZS4lKEU+1cgtlMb9e9kv3iolLtcCpeVoDmtVW43gOP7TT+Fx7PbnCLKZTcMlRhAp5MpyTivY14iOfAkJG+nF18QG+Zp6GNyJjfy  
hOTVKYwwmUigj4CFRgCwsfSLZDDKVJdsyBfOBI4FOvcib3dC2VI8eTpDwWlZvx62C6ZhpZst/pY4fkfmGC5wB+LvQVpTdloxn1kVv4Yyxs7MJLZ+insWF5erFBzx22DUHUMIWQg  
mLsxlVY7Lzp37RqKUqmYgZoTqRzGPBvEZnYhUroWzYBvehOhyQKXbQhP5MYpuBfuwg==

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



[LQ4BVTFh6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/bYwxNVLm5UMdfIt132vYtpgmXc7CtomU>



Cuernavaca, Mor., 23 de marzo de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la  
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA ROTAVIRUS INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS TIPO INTESTINAL EN UN MODELO *IN VITRO*”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Ricardo Abad Balbuena Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**Atentamente**

**Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2023-03-28 13:39:53 | Firmante**

i6VTMgeGwlFmWsvLb3yzDdfyegS7pBwubqyhPrVxYlZrNt7Uap6QoOb1EUN6gXR/OvT1I7zrIL6wpjD39YzPpS+uEvYgVRwoDL8LmeAsxISZaja1d/0D82TCS4iSFfXdQyguacfVue  
pEV/vAUfhNMADa6Y4wouoew1F99DKcPpNpUuKV6hBvmEOKoXSROoTRtGfYeWMVGnyQ99nRHuSdmlX6D4lcnzvr1CYI9vDXweJEYbYG5xE1sg6Zk2w4rEgQxj8SPuf+Zfl9pr  
x6rVrWn8QDZMUxm/Xvcfc/inftzym+UDgKVNUBWhFmggKGlpDxMN7YD885kHmxFKfR1/7FcQ==

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



[yg9rhmbZ5](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cBmJclXhG9N7WQFduKCCcJzLPmwxB87i>



Cuernavaca, Mor., 23 de marzo de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la  
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA ROTAVIRUS INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS TIPO INTESTINAL EN UN MODELO *IN VITRO*”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Ricardo Abad Balbuena Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**Atentamente**

**Dra. María Angélica Santana Calderón**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2023-03-24 10:57:36 | Firmante**

lcz5zdrCQq4WG0+3aeSJxvieHWV+S+wjpHcMKTCW4f9AU3/mpHb1BF+Ba6Y8thcikE5zSY9FUKvWjv3JrbHoln12AlFGf4IKF6CpMZURfjd5smJFRct1CAE7xuv3VM2HMvIK/nEv/it  
l1VhrMCUU1MyAbmNgB460XJ+hS6M2dhAlbBMjNqtF+ruYRbxisJ4A5+BdYvzY9Rm4iOVjLiKIER8TpQCSkZC9CA0RnqKb5Fs+WV2PSSLwWz+37HyGdpD7YNYh/nlgY4fh6a5u  
Wk2XyoB+pE6+f+CSdflyBQzOIE0jbazx3xAKazTYnGp2fO6OfRqXoZFqnK1X/eUpUGK+Q==

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



**kSRa3OrEP**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JSZWKSsyJTgnN6NXn9KjSfyuctoFb1nL>



Cuernavaca, Mor., 23 de marzo de 2023.

**Dra. Graciela Jiménez Santana**

Encargada de Despacho de la  
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA ROTAVIRUS INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS TIPO INTESTINAL EN UN MODELO *IN VITRO*”**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Ricardo Abad Balbuena Sánchez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

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

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

**Atentamente**

**Dra. Delia Vanessa López Guerrero**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-03-27 11:59:12 | Firmante**

jeMrUVukKQtYuOuqHPZmD4prYPQO7i2S3ZfVBNBRM39IFCQIs2jRjvWiqk1xVPcFBdYuzQA9jA3HuGLnqX0XCLVylM0oU3yNyqbwEj19uuMIVFKvzk6VOp/nSltI35RvwN9kOP+4Zumvc/XZ3BdWWMDSMe8bHPbd2ZEemCx2lc5MZ7XmT0cbHXOG/xGnR3WnUZEWkMVpytslqBAMMEen1gD4k8B8y2DtBc4eqQRL8d66dm+amaPbUdwd1Ezc0807ANlei2hp8DP+YTIiniVakQRoK65AvB4UOCGNyhZj0B01qlBkUnO3OfOroXZalOGcPQ97Imds40tWAVu34Clue+g==

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



[bohjR5qTI](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9y1MH3qy6XxyX1Jn88DJ7F4qnFfSDZFz>

