



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias, Mención
Microbiología

**Evaluación de una vacuna quimérica multiepítipo basada en autotransportadores
codificados en la isla de patogenicidad SHI-1 de *Shigella flexneri* 2a y rol en la
patogenicidad del autotransportador Sap.**



YRVIN ALEXANDER LEÓN RENGEL

Tesis presentada a:

Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción

Para optar al Grado de:

Doctor en Ciencias, Mención Microbiología

CONCEPCION (Chile), 2020

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Profesor Guía Dr. Ángel Oñate
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Gerardo Gonzales
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dra. Coralia Rivas
Universidad de Concepción

Dra. Cecilia Toro
Universidad de Chile

Director Victor Campos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agradecimientos

A Dios, por ser la fuente de todo conocimiento y a mi niño interior que desde la infancia soñó con hacer una vacuna.

A CONICYT y a la Universidad de Concepción por su apoyo a lo largo de mi doctorado.

A la Dra. María Soledad por todas las herramientas psicológicas que me enseñó, las cuales forman el pilar fundamental de todo mi avance.

A mi tutor, Dr. Ángel Oñate, por abrir las puertas del laboratorio con el proyecto Fondecyt 1180122.

A la Dra. Christina Faherty de Harvard, por enseñarme a conquistar montañas más altas.

A la Dra. Eleinis Ávila, por su guía fundamental en todo mi trabajo científico.

Al laboratorio de Biofármacos Recombinantes por su desinteresado apoyo en la expresión de este candidato vaccinal.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Lionel, Raúl, Carla y Leo.

A mis padres Iraida y Cruz, mis hermanas y amigos que permanecen en la distancia día a día.

Al comité evaluador por su aporte en el mejoramiento de este trabajo.

Índice de contenido

Resumen	11
Abstract	13
1. Introducción.....	15
1.1. Características generales del género <i>Shigella</i> y manifestación clínica de la infección.....	17
1.2. Aspectos moleculares de la patogénesis producida por <i>Shigella</i> spp.....	18
1.3. Islas de patogenicidad (IPA) y organización molecular de la IPA SHI-1 de <i>Shigella flexneri</i>	21
1.4. Autotransportadores y mecanismos de virulencia.....	23
1.5. Características moleculares de los autotransportadores Error! Bookmark not defined.	
1.6. Mecanismos utilizados por las células hospederas en la detección de <i>Shigella</i> spp	26
1.7. Modulación de los eventos celulares en la invasión por <i>Shigella</i> spp.....	29
1.8. Desarrollo de nuevas estrategias en la erradicación de la shigelosis.....	31
1.9. Proteínas de choque térmicos y su potencial como adyuvante en la elaboración de vacunas	35
1.10. Autotransportadores en el desarrollo de vacunas	36
2. Hipótesis de trabajo	38
3. Objetivos	40
3.1. Objetivo General.....	40
3.2. Objetivos Específicos	40
4. Materiales y Métodos.....	41
4.1. Cepas bacterianas y cultivo celular.....	43

4.2.	Modelo animal.....	44
4.3.	Técnicas básicas de biología molecular	45
4.3.1.	Extracción de DNA cromosomal y plasmidial.....	45
4.3.2.	Amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 45	
4.3.3.	Transformación con plasmidios o productos de PCR	45
4.4.	Objetivo 1. Determinar los epítomos inmunodominantes y diseñar una vacuna multiepítomo en base a los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap, codificadas en los genes de la isla de patogenicidad SHI-1 de <i>Shigella flexneri</i> 2a. 47	
4.4.1.	Predicción de los epítomos inmunodominantes de las proteínas SigA, Pic y Sap 47	
4.4.2.	Predicción de epítomos de células B	48
4.4.3.	Predicción de epítomos de células T	48
4.4.4.	Predicción de epítomos inductores de Interferón-gamma	49
4.4.5.	Evaluación de los parámetros fisicoquímicos	50
4.4.6.	Modelamiento de la proteína quimérica multiepítomo.....	50
4.4.7.	Validación de la estructura terciaria de la proteína quimérica.....	50
4.4.8.	Interacción molecular entre la proteína quimérica diseñada con el receptor tipo toll-2 (TLR2)	51
4.4.9.	Adaptación de codones y construcción del gen.....	52
4.4.10.	Expresión, aislamiento y purificación de la proteína quimérica multiepítomo 53	
4.5.	Objetivo 2. Evaluar la inducción de respuesta inmune (IgA e IgG) y el perfil de citoquinas (IL-4, IFN- γ y TNF- α) inducida por la vacuna multiepítomo en base a los epítomos inmunodominantes de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap en ratones BALB/c.....	55

4.5.1.	Inmunización de los ratones	55
4.5.2.	Determinación de anticuerpos específicos en sangre periférica	55
4.5.3.	Determinación de IgA de secreción	56
4.5.4.	Linfoproliferación de linfocitos	57
4.5.5.	Evaluación de citoquinas.....	58
4.6.	Objetivo 3. Evaluar la efectividad de protección de la vacuna multiepítipo en ratones BALB/c frente a dosis letal de <i>Shigella flexneri</i> 2a	59
4.6.1.	Desafío de los ratones inmunizados frente a <i>S. flexneri</i>	59
4.6.2.	Carga bacteriana en pulmones.....	59
4.7.	Objetivo 4. Determinar el efecto de la proteína Sap en los mecanismos de formación de biopelículas, autoagregación y adherencia, de <i>Shigella flexneri</i> 2a en líneas celulares inmortalizadas	60
4.7.1.	Construcción de la mutante <i>Shigella flexneri</i> 2a del dominio pasajero del gen <i>sap</i> por intercambio alélico	60
4.7.2.	Elaboración de curvas de Crecimiento	62
4.7.3.	Ensayo de formación de biopelículas en superficie sólida	62
4.7.4.	Ensayo de autoagregación bacteriana.....	63
4.7.5.	Ensayo de adherencia a línea celular.....	63
4.8.	Análisis estadístico	64
5.	Resultados	65
5.1.	Análisis inmunoinfomático.....	65
5.1.1.	Predicción de epítomos para células B	65
5.1.2.	Predicción de epítomos para linfocitos T citotóxico	67
5.1.3.	Predicción de epítomos para linfocitos T colaboradores	68
5.1.4.	Predicción de epítomos inductores de interferón-gamma.....	69

5.1.5.	Diseño completo de la vacuna multiepítipo	70
5.1.6.	Parámetros fisicoquímicos y evaluación de antigenicidad	71
5.1.7.	Refinamiento y validación de la estructura modelada.....	73
5.1.8.	Interacción molecular entre la proteína quimérica multiepítipo y el TLR2..	76
5.2.	Construcción del gene, clonamiento y producción de la proteína quimérica recombinante multiepítipo.....	78
5.3.	La proteína quimérica multiepítipo rMESF induce fuerte respuesta inmune humoral y de mucosas.....	81
5.5.	La proteína quimérica multiepítipo rMESF induce una fuerte respuesta linfoproliferativa.....	85
5.6.	La proteína quimérica multiepítipo rMESF confiere respuesta protectora contra <i>Shigella flexneri</i> 2457T.....	87
5.7.	La carga bacteriana en pulmones disminuye en los ratones vacunados.....	88
5.8.	Construcción y análisis conformacional de la mutante <i>S. flexneri</i> 2457TΔsap.....	90
5.9.	La eliminación del dominio pasajero del gen sap en <i>S. flexneri</i> 2457T no interfiere en la formación de biopelículas	92
5.10.	La eliminación del dominio pasajero del gen sap en <i>S. flexneri</i> 2457T afecta el mecanismo de autoagregación.....	93
5.11.	La eliminación del dominio pasajero del gen sap en <i>S. flexneri</i> 2457T afecta el mecanismo de adherencia de la bacteria a células HT-29	94
6.	Discusión.....	96
7.	Conclusiones.....	110
8.	Referencias bibliográficas	112

Índice de figuras

Figura 1. Estructura y organización típica de un autotransportador serino-proteasa.....	26
Figura 2. Diagrama del constructo final de la proteína quimérica multiepítipo basado en los dominios pasajeros de SigA, Pic y Sap, y la HSP GroEL de <i>S. typhi</i>	71
Figura 3. Perfil de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle para el constructo de la proteína quimérica multiepítipo	73
Figura 4. Evaluación ProSA-web de la estructura tridimensional de la proteína quimérica multiepítipo después del refinamiento estructural	74
Figura 5. Validación de la estructura 3D de la proteína quimérica multiepítipo después del proceso de refinamiento usando el punto Ramachandran	75
Figura 6. Estructura 3D modelada por el servidor I-TASSER después del proceso de refinamiento visualizada a través de Chimera 1.1	76
Figura 7. Patrones de frustración en el TLR2.....	77
Figura 8. Modelo de interacción entre el TLR2 y la proteína multiepítipo realizado a través del servidor ClusPro y visualizado con el software de PyMOL.....	78
Figura 9. Clonamiento del gen quimérico (MESF), expresión y purificación de la proteína recombinante multiepítipo (rMESF).....	80
Figura 10. Títulos de anticuerpos en suero de ratones controles e inmunizados	82
Figura 11. Título de anticuerpo de IgA fecal en ratones controles e inmunizados	83
Figura 12. Niveles de citoquinas cuantificados con ELISA tipo sándwich	85
Figura 13. Linfoproliferación	86
Figura 14. Eficacia protectora de la proteína quimérica multiepítipo rMESF en ratones...	88
Figure 15. Carga bacteriana en pulmones después del ensayo de desafío en ratones controles e inmunizados	89
Figura 16. Construcción de la cepa mutante de <i>S. flexneri</i> 2457T 2a para el dominio pasajero del gen <i>sap</i> mediante intercambio alélico	90

Figura 18. Cuantificación de la formación de biopelícula en sales de bilis 92

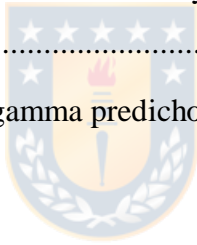
Figura 19. Análisis de la formación de autoagregación..... 94

Figura 20. Adherencia de *S. flexneri* y mutante Δsap a células HT-29 95



Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados en la expresión de la proteína quimérica multiepítopo y el desarrollo de la mutante	44
Tabla 2. Cebadores usados en la creación de la mutante 2457T Δ sap	61
Tabla 3. Principales epítomos inmunodominantes para linfocitos B de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap, de acuerdo con los servidores Bcepred y BepiPred	66
Tabla 4. Principales epítomos inmunodominantes para LTC de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap de acuerdo con los servidores nHLAPRED and IEDB	68
Tabla 5. Principales epítomos inmunodominantes para linfocitos T colaboradores de los dominios pasajeros de los autotransportadores Pic y Sap, de acuerdo con los servidores Rankep, NetMHCII 2.3 y IEDB	69
Tabla 6. Epítomos inductores de IFN-gamma predichos por el servidor IFNepitope sever .	70



Resumen

La shigelosis es una enfermedad diarreica que causa graves daños en las mucosas y muerte en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. Los países más afectados son aquellos pobres y en vías de desarrollo. La resistencia a la terapia de antibióticos ha ido incrementando y la Organización Mundial de la Salud promueve el desarrollo de una vacuna segura y de bajo costo contra el agente etiológico más común de la shigelosis, *Shigella flexneri*. Este patógeno para causar la enfermedad utiliza factores de virulencia cromosomales como los autotransportadores SigA, Pic y Sap que están bien conservados dentro de *Shigella* spp. y otras *E. coli* patogénicas. Algunos de estos autotransportadores se han descrito como proteínas altamente inmunogénicas. En este trabajo, se realizó un diseño *in silico* de una vacuna usando los epítomos más antigénicos e inmunodominantes presentes en el dominio pasajero de estos autotransportadores, y la proteína GroEL como adyuvante. Para hacer la predicción de la estructura terciaria de la proteína quimérica se usó el servidor I-TASSER y se realizó un ensayo de interacción molecular con el TLR2, demostrándose una interacción estable. Además, se evaluó la inmunogenicidad y eficacia protectora de la proteína quimérica multiepítomo, nombrada rMESF, en un ensayo de infección letal con *S. flexneri*. La proteína rMESF fue administrada al modelo murino a través de la ruta intranasal (i.n.) o acompañada con el adyuvante comercial de Freund (CFA) por vía intradérmica (i.d.), subcutánea (s.c.) e intramuscular (i.m.), como también con el adyuvante Imject alum (i.m.). Todos los ratones inmunizados presentaron incremento en los títulos de IgG, IgG1, IgG2a, IgA e IgA fecal comparados con los grupos controles, PBS+CFA y PBS+alum. Sin embargo, la inmunización de los ratones por vía i.n. con rMESF sola,

presentó los mayores títulos de IgA sérica y fecal. Los niveles de citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-17) y linfoproliferación incrementaron en todos los grupos experimentales, con los mayores niveles de respuesta linfoproliferativa en los ratones inmunizados por vía i.n. con rMESF sola, en los que se observó 100% de eficacia protectora contra *S. flexneri*. La carga bacteriana en los pulmones de los grupos experimentales supervivientes mostró disminución significativa comparado con los grupos controles. En resumen, la proteína rMESF confiere inmunidad y resalta la importancia en la activación de la inmunidad de mucosas en la eliminación de *S. flexneri*. Por otro lado, el autotransportador Sap (*Shigella autotransporter-like protein*) fue parcialmente caracterizado a través de la construcción de una mutante por el método de Datsenko y Wanner y se descartó la participación de Sap en la formación de biopelícula y autoagregación. Además, se demostró la participación de Sap en el mecanismo de adherencia. Sin embargo, la construcción de una cepa complementada es requerida para llegar a conclusiones certeras. La caracterización parcial de Sap amplía el conocimiento de las múltiples proteínas que utiliza *Shigella* para ocasionar disentería bacilar. Este es el primer reporte en el que se usan autotransportadores conservados unidos a la proteína GroEL de *S. Typhi*, como candidato vaccinal contra *S. flexneri*.

Abstract

Shigellosis is a diarrheal disease that causes severe mucosal damage and death in children, elderly and immunocompromised patients. Most of affected country are poor and developing countries. The resistance strains to antibiotic therapy are increasing and the World Health Organization prompt the development of a low cost and safe vaccine against the most common etiological agent of shigellosis, *Shigella flexneri*. This pathogen to cause the disease, among other, uses chromosomal virulence factor such as SigA, Pic and Sap autotransporters that are well conserved among *Shigella* spp. and others pathogenic *E. coli*. Some of this autotrasporter proteins have been described as highly immunogenic proteins. We made an *in silico* vaccine design using the most antigenic and immunodominat epitopes from the passenger domains of those autotransporters, and the GroEL protein as adjuvant. On the other hand, to predict the tertiary structure of this protein, the I-TASSER server was used and a molecular docking with TLR2 was evaluated, which demonstrated an appropriate and stable interaction. Also, we evaluated the immunogenicity and protective efficacy of the chimeric multiepitope protein named rMESF in mice against lethal infection with *S. flexneri*. rMESF was administrated to mice model alone through intranasal (i.n.) route or accompanied with commercial Freund's adjuvant (CFA) intradermically (i.d.), subcutaneously (s.c.) and intramuscular (i.m.), as well as with Imject alum (i.m.). All immunized mice increased IgG, IgG1, IgG2a, IgA and fecal IgA titers compared to PBS+CFA and PBS+alum control groups. Furthermore, i.n. immunization of mice with rMESF alone presented the highest titers of serum and fecal IgA. Cytokine levels (IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-17) and lymphocyte proliferation increased in all experimental groups, with the highest lymphoproliferative response in i.n. mice immunized with rMESF alone, which presented 100% protection against *S. flexneri*. Organ burden studies showed

significant decrease in lung infection as compared to control groups. In summary, this vaccine vests protective immunity and highlights the importance of mucosal immunity activation for the elimination of *S. flexneri*. On the other hand, the Sap autotransporter (*Shigella autotransporter-like protein*) was partially characterized through the mutant construction with Datsenko and Wanner method and a possible role of Sap in biofilm formation and self-aggregation was discarded. Furthermore, the role of Sap in cell adherence was demonstrated but a mutant complemented of *sap* gene is required for conclusive experiments. The partial characterization of Sap amplifies the knowledge concerning the multiples proteins used by *Shigella* to cause bacillary dysentery. This is the first report using different conserved autotransporters bound to GroEL protein of *S. Typhi*, as a vaccine candidate against *S. flexneri*.



1. Introducción

Shigella spp. es el agente etiológico de la shigelosis enfermedad que ha sido reportada en casi todos los países, especialmente en aquellos en vías de desarrollo (Ministerio de salud de Chile, 2009). Afecta principalmente a niños menores de 5 años de edad (Kotloff y col., 1999), y a todos los grupos etarios durante la aparición de brotes (Nygren y Bowen, 2013; Kozyreva y col., 2016). Está relacionada con un 5% a 18% de los pacientes que presentan la diarrea del viajero (Heiman, 2014). En 2015, la organización de Estudios de la Carga Global de la Enfermedad (*Global Burden of Disease Study*), reporta que el 12,5 % de las muertes por enfermedades diarreicas (1,3 millones), se correlacionaron con *Shigella* como agente causal; un 98,5 % de los casos se presentaron en países pobres y en vías de desarrollo y un 33 % de las muertes en niños menores de 5 años (GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2016). Por tal motivo, se posiciona a *Shigella* como uno de los mayores agentes causales de diarrea.

Shigella fue descrita hace más de un siglo por el japonés Shiga y reconocida en 1890 como el agente etiológico de la disentería bacilar. En cuanto a su clasificación, las cuatro especies conocidas de *Shigella* son realmente una sola especie, junto con *Escherichia coli* pertenecen al género *Escherichia*, esto basado en la similitud de su ADN. Además, estas taxas se diferencian con dificultad por los métodos bioquímicos y la patogenicidad no genera una separación definitiva, ya que algunas cepas de *E. coli* pueden ocasionar diarrea tipo disentería. Sin embargo, estas especies permanecen separadas para evitar confusión en la microbiología médica (Castellani y Chambers (1919); <http://www.bacterio.net/shigella.html>). A pesar de lo anteriormente descrito, se han reportado cuatro serogrupos; A, B, C y D, los cuales comprenden a *S. dysenteriae* (12

serotipos), *S. flexneri* (6 serotipos), *S. boydii* (18 serotipos) y *S. sonnei* (1 serotipo) respectivamente, esto es en base a las propiedades bioquímicas y la especificidad antigénica presentes en el antígeno-O (Oany y col., 2017). El principal serogrupo causal de la enfermedad en países desarrollados es *S. sonnei*, con 77 % de los casos, y en países en vía de desarrollo *S. flexneri*, con 60 % de los casos (Hale y Keusch, 1996; Oany y col., 2017). Por otro lado, las infecciones causadas por *S. boydii* y por *S. dysenteriae* son de baja frecuencia.

Chile posee escasos registros de correlación entre las diarreas reportadas y *Shigella* spp. como agente etiológico. Sin embargo, los estudios sustentan que el 95 % de las shigelosis diagnosticadas en la Región Metropolitana del país, entre los años 2004-2005 fueron atribuidos a *S. sonnei* y *S. flexneri* serotipo 2a (Hamilton y col., 2007). Por otro lado, en el verano del año 2009 la prevalencia en los casos de shigelosis tenía como agente causal a *S. sonnei* (Ministerio de Salud de Chile, 2009). El Instituto de Salud Pública de Chile entre los años 2010 y 2015, confirmó la presencia de 2.364 cepas de *Shigella* spp. provenientes de muestras clínicas, observándose una cierta estacionalidad en la presencia de las cepas. El mayor número de cepas fue detectado entre los meses de enero a junio y la mayor prevalencia fue encontrada en la región metropolitana con un 31,1 % (el 70 % de éstas procedía de laboratorios privados), luego Tarapacá con un 19,5 % y Antofagasta con un 17,9 %. La mayor parte de las muestras se concentraron en los grupos etarios entre los 0 a 4 años de edad (19,2 %) y en niños desde los 5 a 9 años de edad (19,7 %). En estos estudios se detectaron las cuatro cepas de *Shigella* con la mayor prevalencia de *S. sonnei* (53,6 %) y *S. flexneri* (43 %). En menor porcentaje se detectó a *S. boydii*, con un 2,8 %, *S. dysenteriae* con un 0,4 % y *Shigella* spp. un 0,3 %. Por otro lado, los serotipos encontrados

de *S. flexneri* corresponden a 2a (43,6 %), 3b (11,9 %) y en menor porcentaje 1b (11,7 %) (Instituto de Salud Pública de Chile, 2016). El conocimiento del serotipo de mayor frecuencia de las shigellas relacionadas con diarrea en Chile y en cualquier país, permite el desarrollo de vacunas direccionadas al mayor agente causal.

Con lo que respecta al tratamiento utilizado en el control de la shigelosis, se enfoca básicamente al uso de antibióticos. Dentro de los más comunes destacan la ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, ácido nalidíxico y sulfametoxazol-trimetoprim (Dutta y col., 2002). La ciprofloxacina y las fluoroquinolonas de tercera generación son utilizadas con mayor éxito en el tratamiento de la enfermedad (Salam y col., 1998). Sin embargo, en los últimos años se ha observado la multirresistencia a antibióticos como la cefalosporina y la azitromicina usados en el tratamiento contra *Shigella* (Taneja y col., 2012; Karlsson y col., 2013). Por ejemplo, se ha observado en países del sur de Asia, clones dentro de la población bacteriana que son resistentes a las fluoroquinolonas (Talukder y col., 2004; Talukder y col., 2006). Los eventos de multirresistencia a los antibióticos, suponen la búsqueda de terapias alternativas en la erradicación y control de la disentería bacilar. Como consecuencia de la multirresistencia, la Organización Mundial de la Salud, ha priorizado el desarrollo de una vacuna segura y efectiva contra el mayor agente causal de shigelosis en el mundo, *S. flexneri* (Kotloff y col., 1999; Jennison y Verma, 2004).

1.1. Características generales del género *Shigella* y manifestación clínica de la infección.

Shigella spp., es una bacteria Gram-negativo y patógena-estricta intestinal del humano. Es un microorganismo no mótil y clasificado como anaerobio facultativo (Pasetti y col., 2020). Están relacionadas genéticamente con *Escherichia coli*, pero poseen mecanismos de

patogenicidad, fisiología y respuesta serológica diferentes (Ud-Din y Wahid, 2014). La vía de transmisión de *Shigella* es fecal-oral, de persona a persona y con el consumo de agua o alimentos contaminados con la bacteria. El inóculo necesario para causar una infección está entre 10 y 100 bacterias (DuPont y col., 1989) y el primer síntoma en la shigelosis es la diarrea. La diarrea es producida cuando la bacteria llega al intestino delgado y ocurre la colonización del epitelio del colon, lo cual causa una reacción inflamatoria (Ashida y col., 2015). Además, algunos de los síntomas clínicos de la shigelosis se manifiestan como consecuencia directa de la sobreexpresión de citoquinas (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ , TNF- β , IL-4, IL-10, TGF- β y IL-8) (Jennison y Verma, 2004). Sin un tratamiento efectivo, la shigelosis conlleva al desarrollo de complicaciones secundarias tales como; septicemia, neumonía y síndrome hemolítico urémico (Jennison y Verma, 2004). *Shigella* junto con *Listeria*, *Mycobacterium* y *Salmonella* representan las bacterias invasoras más estudiadas que atraviesan la membrana plasmática. El mecanismo de invasión de *Shigella* es similar al utilizado por otras bacterias Gram-negativo, pero diferente del mecanismo utilizado por *Salmonella* y *Mycobacterium* ya que *Shigella* escapa rápidamente de la vacuola y logra moverse libremente en el citosol. Esto permite el paso de la bacteria de una célula a otra, siendo una característica compartida con la bacteria Gram-positivo *Listeria* (Killackey y col., 2016).

1.2. Aspectos moleculares de la patogénesis producida por *Shigella* spp.

La invasión del intestino es uno de los primeros eventos relacionados con la patogénesis de *Shigella*. *Shigella* atraviesa las células M del epitelio intestinal llegando a la superficie basolateral de los enterocitos, desde donde puede invadir las células que forman el colon (Phalipon y Sansonetti, 2007). Además, una vez que alcanza el espacio intraepitelial,

Shigella flexneri puede ser fagocitada por los macrófagos, promoviendo la apoptosis y la liberación de IL-1 β , que funciona como proteína quimioatrayente de polimorfonucleares, los cuales migrarán y ocasionarán la disrupción del tejido epitelial, amplificando la invasión por *Shigella* (Jennison y Verma, 2004). Allí, la bacteria libera alrededor de 25 proteínas efectoras, como el conjunto de proteínas Ipa, dentro de las células epiteliales a través de una estructura tipo aguja conocida como el sistema de secreción tipo 3 (SST3) (Schroeder y Hilbi, 2008). Las proteínas que forman el SST3 se encuentran codificadas en un plásmido de virulencia de alrededor 220 kb (Killackey y col., 2016) y el ensamblaje final de la estructura tipo aguja, es promovida por las sales biliares como el desoxicolato (Stensrud y col., 2008). Luego de la liberación de las proteínas efectoras, se produce la adhesión de la bacteria a la célula diana a través de proteínas de adhesión no clásicas (Zumsteg y col., 2014; Killackey y col., 2016). Este proceso de adhesión es facilitado por la proteína de superficie IcsA, la cual al ser activada por las sales biliares favorece la interacción con la membrana de la célula eucariota, luego de la activación del SST3 (Zumsteg y col., 2014). Por otro lado, las sales biliares promueven la secreción de las proteínas OspE1 y OspE2, las cuales permanecen en la membrana externa incrementando la adherencia a las células polarizadas (Faherty y col., 2012 citado por Killackey y col., 2016). *Shigella* en condiciones de anaerobiosis, bloquea la secreción de efectores a través del SST3 por medio de las enzimas fumarato y nitrato reductasa (FNR), que inhiben la transcripción de los genes *spa32* y *spa33*. La detección de O₂ en la región adyacente a la barrera epitelial inhibe los reguladores de metabolismo anaerobios (FNR) y conlleva a la activación transcripcional de los genes *spa32* y *spa33*, finalizando en la activación del SST3 y en una eficiente invasión (Marteyn y col., 2010).

La interacción entre el SST3 y la membrana de la célula eucariota es facilitada por tres proteínas bacterianas (IpaB, IpaC e IpaD), que componen el extremo final de la estructura tipo aguja del SST3 (Veenendaal y col., 2007). La naturaleza hidrofóbica de IpaB e IpaC permite su inserción dentro de la membrana plasmática de la célula blanco y la formación del poro por el que pasarán las distintas proteínas efectoras bacterianas (Veenendaal y col., 2007; Blocker y col., 1999). Sin embargo, antes de la inserción de la aguja en la membrana; ésta permanece bloqueada por IpaB, lo que evita la secreción de los efectores. La remoción de IpaB se produce luego de la inserción de la aguja a través de la membrana (Roehrich y col., 2010) con la consecuente liberación de los efectores dentro del citoplasma, que conlleva a un rearrreglo del citoesqueleto como consecuencia de la polimerización/despolimerización de los filamentos de actina (Killackey y col., 2016). El rearrreglo del citoesqueleto es causado principalmente por los efectores IpgB1 y IpgB2, que actúan como factores de intercambio de nucleótidos de guanina, con las proteínas Rac y RhoA involucradas en el remodelamiento de la actina (Huang y col., 2009). Finalmente, este proceso ocasiona el plegamiento de la membrana (*ruffles*), lo que permite el anclaje de *Shigella*, la internalización y formación de la vacuola de entrada en el punto de contacto (Izard y col., 2006). Inmediatamente después de la internalización, sucede el escape de la bacteria desde la vacuola, por los poros formados en la membrana debido a la acción de las proteínas efectoras IpaB y IpaC (Killackey y col., 2016). La entrada de *Shigella* al citoplasma celular viene acompañada de diferentes condiciones de estrés, a las que la bacteria responde con mecanismos fisiológicos específicos. Una de las condiciones más estudiadas es la limitación de hierro en el citoplasma de la célula eucariota, que se acentúa con las proteínas de unión a hierro de la célula invadida (Killackey y col., 2016). Sin embargo, *Shigella* sintetiza moléculas conocidas como sideróforos y sistema de transporte

de hierro, que permiten la captura del hierro intracelular (Payne y col., 2006) para ser utilizado en procesos como la replicación del ADN y la respiración (Wei y Murphy, 2016).

En el desarrollo de la patogénesis por *Shigella*, la diseminación de la bacteria de una célula a otra es necesaria para la expansión de la infección. El paso de *Shigella* a las células subyacentes no infectadas permite el aumento de la infección y el aumento del número de bacterias, lo cual es consecuencia del manejo de la polimerización de la actina por parte del patógeno (Killackey y col., 2016). En este caso, el efector VirG (IcsA) juega un rol importante ya que interviene en la activación de la proteína neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome (N-WASP), cuya actividad está involucrada en el reclutamiento de las proteínas de polimerización de la actina (Arp2/3) (Egile y col., 1999). Sin embargo, el conocimiento es escaso acerca del mecanismo utilizado por *Shigella* en la migración de una célula a otra, pero se sabe que está involucrada otra proteína bacteriana como IcsB, cuya función ha sido referida en la evasión de la autofagia (Kayath y col., 2010). En su conjunto, todos estos procesos permiten conocer la versatilidad y adaptación de *Shigella* en respuesta a los ambientes cambiantes, desde el lumen intestinal hasta el citoplasma de la célula invadida.

1.3. Islas de patogenicidad (IPA) y organización molecular de la IPA SHI-1 de *Shigella flexneri*

Las islas de patogenicidad (IPA) representan elementos génicos variables que se encuentran dentro del cromosoma o en plásmidos y se encuentran relacionadas con el mecanismo de patogenicidad de la bacteria (Al-Hasani y col., 2001). Las IPA poseen una estructura genética característica asociadas a genes de ARNt o secuencias de inserción y presentan elementos móviles como las transposasas e integrasas (Hacker y col., 1999). Hasta la fecha se han descrito cinco IPA en *Shigella* spp.: SHI-O, SHI-1, SHI-2, SHI-3 y SRL (Sasakawa,

1997). La IPA SHI-O se encuentra en *Shigella flexneri* 1a y codifica los genes relacionados con la conversión del serotipo (Schmidt y Hensel, 2004), la IPA SHI-2 está relacionada con la captura de hierro (Moss y col., 1999; Vokes y col., 1999), la IPA SRL que es conocida como locus de resistencia de *Shigella* (*SRL*, por sus siglas en inglés), confiere resistencia a cuatro antibióticos (Turner y col., 2003) y la IPA *she* (SHI-1) que se encuentra localizada en el cromosoma de *Shigella flexneri* 2a, en la cual la mayoría de las proteínas codificadas en esta isla permanecen sin explorar y sin función conocida (Rajakumar y col., 1997). La IPA SHI-1, comprende una región genómica de 46.603 pb situada al extremo 3' terminal del gen de ARNt *pheV* (Al-Hasani y col., 2000). El primer marco de lectura abierto corresponde a una integrasa (*int*), cuya secuencia posee similitud con otras integrasas, incluyendo una integrasa tipo bacteriófago P4. La presencia de este gen en las regiones limitantes de SHI-1 es una característica compartida con otras IPAs (Al-Hasani y col., 2000). Además, SHI-1 contiene regiones similares presentes en otras bacterias, como es el caso de los marcos de lectura abiertos *orf7* y *orf9*, los cuales presentan alta similitud (mayor a 99%) con L0015, asociado a un profago putativo designado 933L dentro de la IPA *locus of enterocyte effacement* (LEE) de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157H7. Sin embargo, cuando los *orf7* y *orf9* son comparados con L0015 muestran regiones truncadas (Al-Hasani y col., 2000). Por otro lado, un conjunto de genes codificados en SHI-1 han sido asociados con algún rol en la virulencia. Entre ellos se encuentran los genes *setIA* y *setIB* que codifican dos subunidades de la enterotoxina ShET-1 (Fasano y col., 1995; Schroeder y Hilbi, 2008), que se relaciona con la acumulación de líquido intestinal y aumento de la fase acuosa de la diarrea (Fasano y col., 1997; Schroeder y Hilbi, 2008), dos autotransportadores codificados en los genes *pic* y *sigA* (pertenecientes a la familia SPATE); PIC, el cual es expresado en *S. flexneri* 2a, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteropatogénica y *E. coli*

uropatogénica (Ruiz-Pérez y col., 2011), posee actividad mucinasa y hemaglutinina (Henderson y col., 1999) y SigA que actúa como una proteasa citopática en las células Hep-2 y afecta la acumulación de fluido intestinal (Al-Hasani y col., 2000). *Shigella autotransporter-like protein (sap)*, es otro ORF relacionado con un autotransportador (87% de similitud con el gen que codifica el autotransportador de superficie Antígeno 43 de *E. coli*), pero su función real en *Shigella* permanece desconocida, así como la posible intervención de éste en el desarrollo de inmunidad (Al-Hasani y col., 2000). El estudio de los autotransportadores codificados en SHI-1, sumado al rol establecido en la inducción de inmunidad, tal como está descrito para el autotransportador SigA (Al-Hasani y Navarro-García, 2009), y la intervención en el desarrollo de la patogénesis, hacen atractivo pensar en el uso del conjunto de proteínas codificadas en SHI-1, como una herramienta en el diseño de vacunas que confieren protección contra esta bacteria y otras enterobacterias mencionadas arriba.



1.4. Autotransportadores y mecanismos de virulencia

Como mecanismo de supervivencia las bacterias sintetizan proteínas que permiten la invasión de un organismo o la modulación de los eventos fisiológicos que suceden en una célula infectada. Por lo general, las proteínas son secretadas al exterior de la bacteria por medio de estructuras moleculares complejas, denominadas sistemas de secreción. En bacterias Gram-negativo, hasta la fecha se han descrito siete sistemas de secreción; I- VII, los cuales varían en estructura y modo de funcionamiento. Muchos de los sistemas de secreción se encuentran codificados en IPAs y destaca el sistema de secreción tipo V o autotransportadores (SST5). Entre los autotransportadores más estudiados por su importancia en la virulencia y en la adhesión bacteriana destacan la pertactina (en

Bordetella pertussis), Hap (en *Haemophilus influenzae*) y el antígeno 43 (Ag43, en *Escherichia coli*) (Wells y col., 2007). A diferencia de otros sistemas de secreción, el SST5 no requiere de la intervención de otras proteínas accesorias para la secreción de proteínas, sino que distintas partes del polipéptido que formarán el SST5 cumplen distintas funciones en la secreción (Restieri y col., 2007). Por otro lado, los autotransportadores han sido relacionados con funciones de virulencia tales como; adhesión, invasión, agregación, formación de biopelículas y toxicidad, lo cual ha permitido utilizarlos como constituyentes de vacunas humanas en experimentación (Wells y col., 2007). En *Shigella flexneri*, los autotransportadores serino-proteasa SigA (Al-Hasani y col., 2000; Al-Hasani y Navarro-García, 2009) y Pic (Ruiz-Pérez y col., 2011), han sido descrito como estructuras claves en la virulencia y desarrollo de inmunidad, siendo considerados blancos en el desarrollo de vacunas contra este patógeno (Oany y col., 2017;). Sin embargo, aún no se termina por comprobar la eficacia de protección de péptidos construidos a partir de SigA. Por otro lado, la proteína tipo-autotransportador Sap de *S. flexneri* parece estar más relacionada con el Ag43 de *E. coli*, con un 87 % de identidad, que con los autotransportadores serino-proteasa (Al-Hasani y col. 2000). En *E. coli* uropatogénica, el Ag43 permite la manifestación de fenotipos como la autoagregación, adhesión y formación de biopelículas que mejoran el mecanismo de virulencia (Ulett y col., 2007; Wells y col., 2007). Además, el fenotipo de autoagregación permite la aglomeración de células, lo cual está relacionado con la evasión de diversos mecanismos del sistema inmune, como el complemento y la fagocitosis, de forma más eficiente en comparación con bacterias que no presentan autoagregación (Ochiai y col., 1993; Berge y col., 1997; Wells y col., 2007). Al mismo tiempo el Ag43, a través de su manifestación fenotípica, confiere protección contra diversas condiciones ambientales como el estrés oxidativo, la reducción de oxígeno local y protección frente agentes

oxidantes como el H₂O₂ (Schembri y col., 2004; Wells y col., 2007). Sin embargo, ninguno de estos eventos relacionados al Ag43 en *E. coli* han sido caracterizados en Sap, por lo que representa un campo nuevo en el otorgamiento de funciones a este autotransportador.

1.5. Características moleculares de los autotransportadores

Los autotransportadores se originan a partir de una sola cadena polipeptídica, cuya secuencia de aminoácidos alberga las señales correspondientes, que permiten el paso de ésta desde el citoplasma hasta el exterior celular, en una serie de eventos sucesivos (Wells y col., 2007). La organización del polipéptido está dada por una secuencia amino-terminal, un dominio pasajero y un dominio translocador (Figura 1) (Wells y col., 2007). La secuencia amino-terminal, permite la translocación del polipéptido a través de la membrana plasmática, utilizando el translocador de proteínas Sec (Wells y col., 2007). Por otro lado, el dominio-alfa o pasajero, constituye la región más variable en los autotransportadores y está relacionada directamente con el mecanismo de virulencia (Henderson y Nataro, 2001). Finalmente, la región de unión entre el dominio alfa-hélice y el dominio carboxi-terminal, intervienen en la secreción del dominio pasajero a través de la membrana externa (Farfán y Torres, 2012). Luego de la translocación del polipéptido hacia el espacio periplásmico, el dominio β es incorporado a la membrana externa de la bacteria y adopta una conformación estructural semejante a un canal, por el que pasará el dominio alfa hacia el exterior celular (Dautin y Bernstein, 2007). Dependiendo del autotransportador, el dominio pasajero puede liberarse al exterior por medio de una proteólisis catalizada por el dominio β o permanecer anclado a la membrana externa (Dautin y Bernstein, 2007). Algunas de las funciones relacionadas con los dominios pasajeros destacan la formación de biopelículas, actividad

enzimática como peptidasas, lipasas y esterasas, actividad citotóxica e intervención en la maduración de otras proteínas de virulencia (Wells y col., 2007).

A

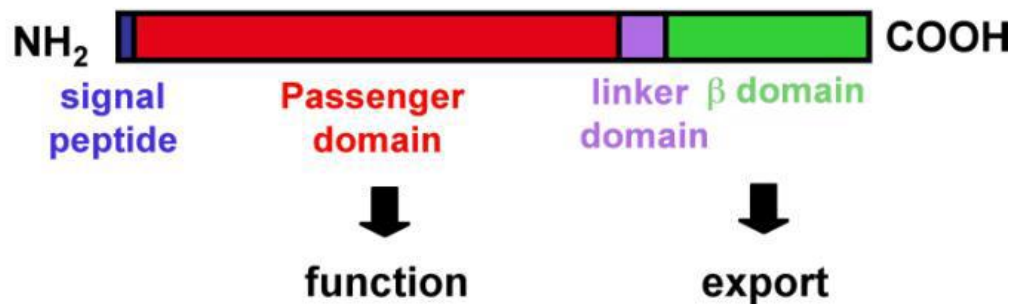


Figura 1. Estructura y organización típica de un autotransportador serino-proteasa. Se muestra la secuencia señal hacia el extremo amino-terminal (marcado en azul), seguido del dominio pasajero (marcado en rojo), luego, la región de unión entre el dominio pasajero y dominio β (marcado en morado) y por último, el dominio β hacia el extremo carboxilo-terminal (marcado en verde) (Dautin, 2010).

1.6. Mecanismos utilizados por las células hospederas en la detección de *Shigella* spp

Se han descrito distintos mecanismos en los que participan diferentes proteínas o estructuras bacterianas, que son detectados por moléculas de la célula hospedera, lo cual converge en la activación de vías proinflamatorias y liberación de citoquinas. *Shigella* es principalmente detectada por los receptores tipo toll (TLR), como el TLR4, que activan la vía de inflamación luego de la detección del lipopolisacárido, por células de linaje mieloide (Poltorak y col., 1998). Por otro lado, el ingreso de *Shigella flexneri* a las células epiteliales, conlleva a la inducción de la respuesta inflamatoria, via la activación del factor de

transcripción NF- κ B y la síntesis de la interleucina IL-8 (Philpott y col., 2000; Girardin y col., 2001). Además, macrófagos residentes que hayan fagocitado a la bacteria, no pueden eliminarla de forma eficiente, lo que conlleva a sufrir apoptosis, con la consecuente liberación de IL-18, la cual tiene como blanco a las células asesinas naturales (NK) y linfocitos T, induciendo la síntesis de IFN- γ (Jennison y Verma, 2004). El IFN- γ activa los macrófagos, los cuales pueden promover la eliminación de *S. flexneri* y la inhibición de la replicación de la bacteria dentro de las células epiteliales (Way y col., 1998; Jennison y Verma, 2004). La detección de *Shigella flexneri* dentro de las células epiteliales es llevada a cabo por los receptores tipo nod (NOD). Los receptores NOD1 y NOD2 interactúan con el péptidoglicano bacteriano y activan la proteína quinasa activada por mitógeno MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) y el factor nuclear proinflamatorio NF- κ B, que lleva a la expresión de citoquinas (Chamaillard y col., 2003; Inohara y col., 2003). Además, la interacción del péptidoglicano con NOD1 resulta en la activación de la proteína receptora 2 de NOD1 (RIP), la cual inhibe la quinasa kappa-B (IKK, inhibidor de NF- κ B) y como consecuencia, lleva a la activación de la síntesis de interleucina 8 (IL-8) (quimioatrayente de los polimorfonucleares) (Girardin y col., 2001) y de los precursores de interleucina 18 (IL-18) y IL-1 β (Killackey y col., 2016). Por otro lado, las proteínas estructurales MxiI y MxiH de la aguja del SST3 de *Shigella*, están relacionadas con la formación del inflamasoma, un complejo que promueve la maduración de las interleucinas 18 (IL-18) y IL-1 β , a través de la interacción con el dominio CARD del receptor tipo NOD NLRCD4 (Yang y col., 2013). La activación de la síntesis de interleucinas vía receptores NOD, permite la amplificación adicional de la vía inflamatoria, asegurando una respuesta rápida contra la bacteria, una vez que es detectada por diferentes sensores extracelular e intracelular (Killackey y col., 2016). Otros mecanismos de detección de patógenos son

activados por la liberación del material genético de *Shigella*, producto de daños ocasionados en la membrana bacteriana (Killackey y col., 2016). El ácido nucleico bacteriano en el citosol de la célula hospedera, puede ser reconocido por detectores de ADN doble cadena (ADNs), entre las que se encuentran las sintasas cíclica (cGAS; GMP-AMP), que generan guanósín monofosfato cíclico (GAMPc). GAMPc, interviene en la activación del estimulador de los genes de interferón (STING), lo que conduce a la síntesis de interferón tipo 1 y de la activación NF- κ B (Broz y y Monack, 2013; Wu y col., 2013). Además, el aumento de GAMPc en el citoplasma celular, asegura su traspaso a las células vecinas a través de las uniones *gap junction*, lo cual representa una señal de alerta y posterior activación de la vía STING en las células no infectadas (Kasper y col., 2010; Ablasser y col., 2013). En su conjunto, la pronta producción de citoquinas, como el IL-8, que promueven la migración de las células PMN hacia el lugar de la infección, podría jugar un rol importante en la eliminación de *Shigella*, ya que ésta es incapaz de escapar del fagosoma de las PMN (Mandic-Mulec y col., 1997; Jennison y Verma, 2004).

No existe un perfil de inmunoglobulinas y de citoquinas establecidos para la protección frente a *Shigella*. Sin embargo, se han establecido varios factores inmunológicos importantes en la respuesta contra el patógenos tales como; el incremento de inmunoglobulinas IgG e IgA involucradas en la muerte mediada por complemento y neutralización de la bacteria, una respuesta predominante tipo Th1 mayor a Th2 las cuales se reflejan en un incremento de INF- γ , TNF- α , y disminución de la citoquina antiinflamatoria IL-4, y finalmente un aumento de la población Th17 y IL-17 que se relacionan con la protección en una reinfección (Sellge y col., 2010; Chitradevi y col., 2016; Pasetti y col., 2020).

1.7. Modulación de los eventos celulares en la invasión por *Shigella* spp.

El ingreso de *Shigella* en la célula hospedera y la expansión de la infección, es producto de la modulación de diferentes eventos y estructuras celulares por parte del patógeno. Esta modulación depende de diferentes proteínas efectoras de *Shigella*, las cuales trabajan en sincronía en la manipulación de procesos celulares claves (Killackey y col., 2016). *Shigella*, libera las proteínas efectoras en dos etapas; la primera liberación resulta en el remodelamiento del citoesqueleto y la polimerización de la actina de la célula hospedera, evento que permite la entrada del patógeno y la formación de la vesícula de entrada, todo esto por medio de las proteínas bacterianas IpaA, IpaB, IpaC, IpaD y VirA (Jennison y Verma, 2004; Wang y col., 2013; Killackey y col., 2016). La segunda liberación es luego de la entrada de *Shigella* a la célula hospedera y consiste en la secreción de proteínas efectoras, como VirA y IpgD entre otros, que ocasionan cambios en el tráfico en la membrana de la célula hospedera, autofagia, inflamación, señales de muerte celular, movimiento intercelular, entre otros (Ashida y col., 2015; Killackey y col., 2016).

La cantidad de efectores secretados por *Shigella* durante el proceso de invasión celular es muy amplia (Killackey y col., 2016). Por ejemplo, la membrana del aparato de Golgi de la célula invadida sufre cambios en el balance de lípidos y colesterol, por el efecto de la proteína bacteriana IpaB, lo cual se refleja en variaciones en el tráfico de proteínas (Ashida y col., 2015). Además, algunas enzimas como las GTPasas, que constituyen parte de la vía de secreción de proteínas hospederas, son afectadas por diferentes proteínas efectoras de *Shigella* (Killackey y col., 2016). La proteína efectora VirA, cataliza la hidrólisis del GTP que se encuentra unido a Rab1 (GTP-Rab1) y la convierte en su forma inactivada (GDP-Rab1). Rab1, pertenece a la familia de las GTPasa involucrada en la

formación, transporte y fusión de vesículas en el tráfico de proteínas y su hidrólisis por VirA, ocasiona la interrupción del tráfico desde el retículo endoplasmático hacia el Golgi (Ashida y col., 2015). Por otro lado, IpgD es otra proteína efectora que ha sido ampliamente estudiada, por su interacción indirecta con la membrana hospedera. Esta proteína efectora es una fosfatasa que promueve la producción de fosfatidil-inositol-5 fosfato (PI5P), que está involucrado en diferentes eventos como la interrupción de la vesícula celular de entrada (Ashida y col., 2015) y el bloqueo de los hemicanales de liberación de adenosina trifosfato (ATP), lo cual impide la transmisión de la señal de alerta, dependiente de ATP, a las células vecinas (Puhar y col., 2013). De esta forma, la dinámica de alteración de la membrana hospedera constituye un elemento clave de la infección por *Shigella* (Killackey y col., 2016).

Las señales inflamatorias, representan una estrategia inmune que permiten alertar a las células vecinas de la presencia de patógenos, por medio de la liberación de proteínas que permiten la localización y la eliminación del patógeno. Sin embargo, *Shigella* libera efectores que evitan la síntesis de citoquinas en la célula infectada, lo que impide que las células vecinas sean alertadas de la presencia del patógeno y favorece su infección (Killackey y col., 2016). Así, las proteínas efectoras Osp de *Shigella*, bloquean el factor de transcripción NF- κ B por medio de diferentes mecanismos como; el bloqueo de la subunidad estructural p65 de NF- κ B, impidiendo su translocación al núcleo, la interferencia con la degradación de I κ B-alfa, un inhibidor del NF- κ B, vía el sistema de ubiquitinación proteosomal, entre otros (Killackey y col., 2016). Esta estrategia de múltiple ataque al NF- κ B, confirma su importancia en la eliminación o remoción de *Shigella* y se refleja en la disminución de las señales proinflamatorias y de la expresión de genes relacionados con

estrés celular (Killackey y col., 2016). Por otro lado, la invasión de *Shigella flexneri* no conlleva fácilmente a la muerte celular programada a nivel de células epiteliales, sino que este evento es contrarrestado por la liberación de proteínas efectoras que, entre sus distintos blancos, modulan los procesos inmunes asociados a apoptosis dependientes de la mitocondria (Mantis y col., 1996; Raymond y col., 2013; Killackey y col., 2016). Por otra parte, la proteína VirA de *Shigella*, está involucrada en la degradación calpaína-dependiente del agonista de muerte BH3 (BID), “*BH3 interacting-domain death agonist*”, el cual permite la liberación del activador de caspasa derivado de la mitocondria “*second mitochondria-derived activator of caspases*” (SMAC), que antagoniza a la proteína de apoptosis inhibitoria unida a X (XIAP) (Andree y col., 2014; Ashida y col., 2014; Killackey y col., 2016). La degradación de BID resulta en la inhibición de la apoptosis y en la prolongación de *Shigella* dentro de la célula infectada.

1.8. Desarrollo de nuevas estrategias en la erradicación de la shigelosis

El aumento de cepas de *Shigella* resistentes a los antibióticos utilizados para el tratamiento de la disentería bacilar, representa un desafío en el desarrollo de nuevas estrategias para la eliminación o prevención de la infección, así como el desarrollo de una vacuna segura que confiera protección permanente (Livio y col., 2014). Actualmente, las proteínas de superficie y el LPS están siendo explorados como constituyentes para el desarrollo de distintas vacunas tales como las vacunas de subunidades (Oaks y col., 1986; Cohen y col., 1996; Venkatesan y Ranallo, 2006). Una de las desventajas que presentan las vacunas desarrolladas con bacterias atenuadas es la estimulación de una respuesta inmune muy débil (Venkatesan y Ranallo, 2006). Por otro lado, vacunas diseñadas con el antígeno-O induce inmunidad serotipo-específica, limitando o dejando una pobre reactividad cruzada, dentro

de los distintos serotipos de *Shigella* (Ashkenazi y col., 1999; Kaminski y Oaks 2009). Así, el gran número de serotipos de *Shigella*, representa uno de los grandes impedimentos en la erradicación de la shigelosis, debido a la dificultad en el diseño de una vacuna que permita conferir protección cruzada (Rasolofy y col., 2001; Kweon, 2008). Pese a estos inconvenientes, se ha enfocado la atención hacia el desarrollo de vacunas que confieran protección, frente a los agentes etiológicos más frecuentes de la shigelosis; *S. dysenteriae*, *S. sonnei* y *S. flexneri* (Kotloff y col., 1999).

El avance de la bioinformática, junto con el aumento en el conocimiento del genoma de muchos seres vivos ha facilitado su estudio, posibilitando además la identificación de secuencias claves para el desarrollo de vacunas contra bacterias o virus (Klade, 2002; Scarselli y col., 2005). En este campo, la vaccinómica juega un papel fundamental por la aplicación del conocimiento integrado de diferentes disciplinas como la inmunogenética, la inmunogenómica, inmunoproteómica y la inmunología básica, enfocado en el desarrollo de candidatos vacunales (Candidate Next Generation Vaccine) (Poland y col., 2009; Oany y col., 2017). La aplicación de la vaccinómica ha sido efectiva en la búsqueda de epítomos conservados en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Wilson y col., 2003), epítomos para tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) (Robinson y Amara, 2005) y epítomos para malaria (*Plasmodium falciparum*) (López y col., 2001), con resultados satisfactorios. Por otro lado, el manejo de algoritmos para la evaluación de secuencias de aminoácidos, lo cual es la base en el desarrollo de vacunas peptídicas (Korber y col., 2006; Soria-Guerra y col., 2015), permite la ubicación de epítomos inmunodominantes que pueden funcionar como activadores de células B y T (Brusic y col., 1998; Singh y Mishra 2016). Utilizando esta estrategia de predicción de búsqueda de

epítomos, se desarrolló la primera vacuna efectiva contra *Neisseria meningitidis* B (Kelly y Rappuoli, 2005).

Pahil y colaboradores el 2017, publicaron el desarrollo de una vacuna peptídica que inducía inmunidad frente a múltiples proteínas de membrana externa, compartidos por distintos serotipos de *Shigella* spp. Se seleccionó un péptido en base a la mayor eficiencia de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en una lipoproteína putativa (EL PGI I), una proteína de choque térmico hipotética (EL PGI II), Spa32 (EL PGI III), IcsB (EL PGI IV) y una proteína hipotética (EL PGI V). La inmunogenicidad fue evaluada en ratones BALB/c a través de ensayos de ELISA y citoquinas. Los péptidos predichos indujeron un aumento en anticuerpos de tipo IgG, IFN- γ y TNF- α , lo que indica una buena estimulación de una respuesta inmune humoral y celular (linfocitos T). Además, se reportó que la mayor inducción de la respuesta inmune tanto humoral como celular, fue producida al inmunizar con la mezcla de los cinco péptidos (Pahil y col., 2017). Anteriormente se había publicado el rol crucial de las citoquinas TNF- α e IFN- γ en la inmunidad contra *Shigella* (De Silva y col., 1993). El trabajo de Pahil y colaboradores, representa una base en el desarrollo de péptidos y vacunas con programas de algoritmos de predicción en otros patógenos (Pahil y col., 2017). Por otro lado, el uso de herramientas de predicción bioinformáticas no serían cien por ciento confiables, ya que algunos de los péptidos que se predijeron, no desencadenaron una respuesta inmune humoral detectable. Esto indica, que los resultados *in-silico* pueden diferir de los resultados *in-vivo* (Pahil y col., 2017).

El estudio de Oany y colaboradores el 2017, representa una puerta hacia la predicción de elementos inmunogénicos dentro de la isla de patogenicidad SHI-1. A partir de herramientas de predicción se identificaron potenciales péptidos inmunogénicos para

Shigella, utilizando como blanco al autotransportador serino-proteasa SigA (Oany y col., 2017). Para el diseño de los péptidos, determinaron por medio del servidor Vaxijen v2.0 (Doytchinova y Flower, 2007), la proteína más antigénica a partir de 44 secuencias de SigA de *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* y *S. sonnei*, descargadas de la base de datos del NCBI GenBank (Benson y col., 2012). Luego, se seleccionaron los péptidos basado en la alta afinidad (score), a los supertipos de los antígenos leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés), utilizando el servidor NetCTL (Larsen y col., 2007). Por otro lado, el número de epítomos seleccionados se disminuyó según la afinidad con los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Buus y col., 2003) y II (Wang y col., 2008; Wang y col., 2010) (MHC-I y MHC-II), por medio del servidor IEDB-AR (*T-cell Epitope Prediction Tools From Immune Epitope Database and Analysis Resource*). Además, realizaron la selección final de los péptidos según el porcentaje de conservación dentro de las 44 proteínas SigA evaluadas. Como resultado, se obtuvo un péptido con 83,86 % (IELAGTLTL) de cobertura en toda la población evaluada de *Shigella* spp. Sin embargo, en estos estudios no se evalúa el efecto *in vivo* del péptido seleccionado, lo que imposibilita el conocimiento de los elementos del sistema inmune que son activados y la posible protección frente a *Shigella* spp. (Oany y col., 2017). A manera de conclusión, se conoce que la respuesta inmune humoral es el mayor componente en la protección frente a *Shigella*, a través de la producción de inmunoglobulinas a nivel de mucosas (IgA) y sistémico (IgG, IgM) (Jennison y Verma, 2004), lo que es clave en el desarrollo de vacunas contra este patógeno, cuyos componentes deberían priorizar la inducción de la inmunidad humoral.

1.9. Proteínas de choque térmicos y su potencial como adyuvante en la elaboración de vacunas

Las proteínas de choque térmicos, por sus siglas en inglés *Heat shock proteins* (HSP), son proteínas altamente conservadas desde los microorganismos como las bacterias, hasta organismos altamente complejos como los mamíferos (Zügel y Kaufmann, 1999), las cuales actúan como chaperonas y su principal función está relacionada con importantes procesos fisiológicos bajo condiciones de estrés (Hendrick y Hartl, 1993; Bansal y col., 2010). Las HSPs interactúan con los receptores tipo toll (TLR,) tales como los TLR2 y TLR4, y estimulan la respuesta inmune innata (Vabulas y col., 2001). Además, las HSPs han sido utilizadas como antígenos y adyuvantes en el diseño de vacunas. Estas proteínas cuando se combinan con un antígeno, se ha visto que pueden conferir respuesta inmune de protección al hospedero frente al patógeno, como ha sido el caso de *Helicobacter pylori* (Ferrero y col., 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie y col., 1997), *Paracoccidioides brasiliensis* (Soares y col., 2008) y *Shigella* spp. (Chitradevi y col., 2016). La proteína GroEL de *Salmonella Typhi* se ha descrito como una HSP (HSP 60) (Lindler y Hayes, 1994; Paliwal y col., 2008), y su capacidad como adyuvante se ha evaluado en proteínas de fusión de tipo recombinante (*domain-GroEL*) con la proteína IpaB, la cual es un antígeno conservado en *Shigella* involucrado en la formación del poro translocón, invasión e inducción de la apoptosis en macrófagos. Los ratones inmunizados con la proteína quimérica mostraron un incremento en los niveles de Th1 y Th2, y un porcentaje de protección cerca del 90-95% en un desafío letal con *Shigella* (Chitradevi y col., 2016). De aquí la importancia en el uso de las HSPs en el diseño de vacunas contra la shigelosis.

1.10. Autotransportadores en el desarrollo de vacunas

En diferentes bacterias, los autotransportadores han sido utilizados como blanco para el desarrollo de vacunas por su relación con la patogenicidad y su inmunogenicidad. La pertectina, fue una de las primeras proteínas autotransportadoras utilizada como vacuna en humanos contra la tos ferina, la cual tiene como agente causal a *Bordetella pertussis* (Storsaeter y col., 1998). Este autotransportador, induce altos niveles de anticuerpos y mayor correlación de protección en comparación con otras proteínas de la bacteria como; la hemaglutinina filamentosa, la fimbria del serotipo 2 y serotipo 3 y la toxina pertussis (Cherry y col., 1998; Storsaeter y col., 1998; Wells y col., 2007). Además, se han realizado experimentos con el uso de diferentes autotransportadores de esta bacteria en una sola vacuna, enfocados en sus dominios pasajeros, lo cual ha sido efectivo en el desarrollo de inmunidad protectora frente a *B. pertussis* (Suzuki y col., 2017). Para esto, Suzuki y colaboradores sintetizaron por separado en *E. coli* BL21 las formas recombinantes de cinco dominios pasajeros de autotransportadores de *B. pertussis* (SphB1, BatB, SphB2, Phg, y Vag8), que posteriormente se inocularon de forma individual y mezclados por vía intranasal en ratones BALB/c. De aquí concluyeron que no todos los dominios pasajeros inducen el desarrollo de anticuerpos IgG y que los ratones inmunizados con la mezcla de los dominios de SphB1 y Vag8, presentaron la mayor disminución de la carga bacteriana en la parte baja del tracto respiratorio y protección frente a la infección por *B. pertussis*. En conjunto, el uso de autotransportadores de forma individual o mezclada en el desarrollo de vacunas, permite clasificar cuáles de ellos están relacionados con el desarrollo de inmunidad y protección frente a distintos microorganismos (Suzuki y col., 2017). Otro ejemplo en el uso de autotransportadores como vacunas, se encuentra el caso de la enfermedad del tracto respiratorio causado por *Haemophilus influenzae*, en el cual ratones

inmunizados con el dominio pasajero del autotransportador Hap de la bacteria, mostraron altos títulos de anticuerpo y protección frente a la colonización nasofaríngea por *H. influenzae* (Cutter y col., 2002). Por otro lado, el autotransportador ScaA ha sido utilizado como vacuna en la erradicación del tifus de matorral, una enfermedad producida por *Orientiatsut sugamushi* en el sur de Asia (Ha y col., 2015). La eficacia protectora de ScaA se evaluó en ratones BALB/c inoculados con una dosis letal de la bacteria, los cuales mostraron altos títulos de anticuerpos neutralizantes de tipo IgG, que inhibieron la infección en las células hospederas (Ha y col., 2015). Sin embargo, en *Shigella* son escasos los estudios en el diseño de vacunas a partir de autotransportadores, con la excepción de la proteína SigA (Al-Hasani y col., 2000; Al-Hasani y Navarro-García, 2009; Oany y col., 2017), la cual contiene péptidos altamente inmunogénicos, los que al ser utilizados como vacunas en ratones BALB/c, indujeron aumento de anticuerpos IgG, IFN- γ y TNF- α . Finalmente, con lo descrito para SigA, sumado a algunos marcos de lectura abiertos con características de autotransportador en la isla de patogenicidad SHI-1 de *Shigella flexneri* como Pic y Sap, se espera, que estos autotransportadores posean varias secuencias de péptidos inmunoestimulantes útiles en el diseño de vacunas contra *Shigella* spp.

2. Hipótesis de trabajo

Shigella flexneri, se posiciona entre los cuatro patógenos más importantes causantes de diarrea en el ámbito mundial y es la especie prevalente en casos de disentería bacilar en países en vía de desarrollo. En vista del creciente número de cepas de *Shigella* resistentes a los antibióticos utilizados en la terapia contra la disentería, la Organización Mundial de la Salud ha focalizado el desarrollo de terapias alternas como el diseño de una vacuna segura contra el mayor agente etiológico de la disentería. Además, El Instituto de Salud Pública de Chile, destaca a *Shigella flexneri* 2a como el serotipo de mayor prevalencia en los casos de disentería registrados en el país. El conjunto de proteínas codificadas en la isla de patogenicidad 1 (SHI-1) de *Shigella flexneri* permanece sin explorar, tanto en la patogenicidad como en su potencial inmunogénico. SHI-1, codifica dos proteínas pertenecientes a la familia de autotransportadores serino-proteasa (SPATE), Pic y SigA, que participan en distintos mecanismos de virulencia de la bacteria. Sin embargo, otra proteína codificada en SHI-1 denominada Sap (*Shigella autotransporter-like protein*), permanece sin caracterizar y posee alta similitud con el gen que codifica el autotransportador de superficie Antígeno 43 de *E. coli* (relacionado con autoagregación, adherencia y formación de biopelículas), indicando posible relación de Sap con diferentes mecanismos de patogenicidad de *Shigella flexneri*. Por otro lado, se conoce que el autotransportador SigA, es altamente inmunogénico y permanece como blanco en el diseño de vacunas, lo que es de esperar, que otros autotransportadores como Pic y Sap, posean varias secuencias de péptidos inmunoestimulantes útiles en el diseño de vacunas contra *Shigella* spp.

1. Los autotransportadores SigA, Pic y Sap codificados en la isla de patogenicidad SHI-1 de *Shigella flexneri* 2a, contienen epítomos inmunodominantes que inducen respuesta inmune y protección frente a la infección por *Shigella flexneri* en un modelo murino.
2. La proteína Sap codificada en la isla de patogenicidad SHI-1 está relacionada con algunos mecanismos de patogenicidad como formación de biopelícula, autoagregación y adherencia celular de *Shigella flexneri*.



3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Determinar la respuesta inmune inducida por la vacuna multiepítopo en base a los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap codificados en la isla de patogenicidad SHI-1 y evaluar el rol de la proteína Sap en diferentes mecanismos de patogenicidad de *Shigella flexneri* 2a.

3.2. Objetivos Específicos

1-Determinar los epítomos inmunodominantes y diseñar una vacuna multiepítopo en base a los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap, codificadas en los genes de la isla de patogenicidad SHI-1 de *Shigella flexneri* 2a.

2-Evaluar la inducción de respuesta inmune (IgA e IgG) y el perfil de citoquinas (IL-4, IL-17, IFN- γ y TNF- α) inducida por la vacuna multiepítopo, basada en los epítomos inmunodominantes de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap en ratones BALB/c.

3-Evaluar la efectividad de protección de la vacuna multiepítopo, en ratones BALB/c frente a dosis letal de *Shigella flexneri* 2a.

4-Determinar el efecto de la proteína Sap en los mecanismos de formación de biopelícula, autoagregación y adherencia de *Shigella flexneri* en líneas celulares inmortalizadas.

4. Materiales y Métodos

De Difco Laboratories (Detroit, MI, EEUU) se obtuvo: agar tripticasa de soya (TSA) y caldo LB.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: Tris ultra puro, Taq DNA Polimerasa, dTTP, dCTP, dATP, dGTP.

De Stratagene se obtuvo: DNA Polimerasa *Pfu* Ultra™ II Fusion HS, *DpnI* 200U.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. se obtuvo: etanol absoluto, cloruro de sodio, cloruro de potasio (KCl), fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), glicerol, alcohol isopropílico, ácido acético 99%, agarosa y Tween®20.

De Merck (ex Millipore®) se obtuvo: filtros de nitrocelulosa de 0,025 µm, filtros de 0,22 µm y Amicon Ultra 15 50K.



De New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) se obtuvo: DNA ligasa T4, enzimas de restricción *SmaI* y *KpnI*, sero-albúmina bovina (BSA) 10x.

De BD Biosciences (USA) se obtuvo: Kit de citoquinas IL-4, IFN-γ, TNF-α IL-17

De Oxoid Limited (Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) se obtuvo: placas de cultivo de 96 pocillos.

De Qiagen se obtuvo: kit para purificación de productos de PCR “QIAquick PCR purification kit”.

De Promega (Madison, WI, EEUU) se obtuvo: kit de purificación de DNA genómico Wizard®.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se obtuvo: kanamicina, ampicilina, gentamicina, proteinasa K, L-arabinosa, sodio dodecil sulfato (SDS) para biología molecular 99%, Triton®X-100, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, persulfato de amonio (APS), tetrametiletilendiamina (TEMED), acrilamida, bromuro de etidio, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄), hidróxido de sodio (NaOH), ácido tricloroacético (TCA).

De Spectrum Labs se obtuvo: membrana de diálisis Spectra/Por 30 kDa.

De SERVA se obtuvo: rojo Congo.

De BIO-RAD se obtuvo: bis acrilamida 40%, Bio-Rad Protein Assay

De Thermo Scientific HyClone (Waltham, MA, EEUU) se obtuvo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, High glucose), suero fetal bovino (SFB) y PBS 10x.

De Thermo Scientific se obtuvo: Estándares de peso molecular GeneRuler de 100pb, 1Kb y 1Kb plus, estándar de peso molecular de proteína preteñido PageRuler™, Pierce™ BCA Protein Assay Kit y anticuerpo secundario anti-IgGs-IgA de conejo conjugado a peroxidase.

De Fisher Scientific se obtuvo: cubreobjetos 12mm.

De Biologix (Capitol Scientific, Inc.) se obtuvo: tubos Falcon de 15 y 50 ml.

De Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) se obtuvo: cubetas con 0,1 cm de separación de electrodos, partidores

De Biomatik Corporation (SilverSide, USA se obtuvo: Construcción del gen MESF.

4.1. Cepas bacterianas y cultivo celular

La cepa de *Shigella flexneri* 2a 2457T fue donada gentilmente por la Dra. Cecilia Toro del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile. Esta cepa se cultivó en condiciones aeróbicas durante toda la noche a 37 °C en medio Luria Bertani (LB). El cultivo celular se colectó por centrifugación a 6000 x g por 10 min a 4 °C. El pellet celular se resuspendió, centrifugó y se lavó con 50 mM Tris-HCL, pH 7.4. Para el crecimiento en placa, se utilizó agar tripticasa de soya (Oxoid Ltd, Cambridge, UK). En caso de requerimiento, los medios se suplementaron con los siguientes antibióticos; ampicilina (100 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml). Por último, el cultivo de *E. coli* DH5 α se realizó en medio LB. Todas las cepas y plásmidos utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 1.



Tabla 1. Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados en la expresión de la proteína quimérica multiepítipo y el desarrollo de la mutante.

Cepas bacterianas	Características	Referencia
<i>S. flexneri</i> 2457T	Cepa salvaje y virulenta	Facilitado por Dra. Cecilia Toro. (UChile)
<i>S. flexneri</i> Δ sap	<i>S. flexneri</i> mutante para el ORF <i>sap</i> (K _{Mr})	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa usada para el mantenimiento y clonación de los plásmidos	Stock Lab. Inmunología Molecular, UdeC.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa usada para la expresión de la proteína quimérica multiepítipo. Contiene el fago DE3 que porta el gen para la polimerasa ARN T7	Studier y Moffatt (1986)
Plásmidos	Características	Referencia
pUC57-MESF	Plásmido que contiene el gen de la proteína rMESF	Corporación Biomtik (Silverside, USA)
pQE-80L	Plásmido usado en la expresión de la proteína rMESF, el cual tiene una cola 6xHis al inicio del sitio de clonamiento	Facilitado por Dr. Juan Olate. (UdeC)
pQE-80L-MESF	Plásmido de expresión clonado con el gen de la proteína rMESF	Este trabajo
pKD4	Plásmido que contiene la secuencia para el casete de resistencia a Kanamicina (K _{Mr})	Datsenko y Wanner (2000)
pKD46	Plásmido de expresión que contiene la recombinasa Lambda Red (λ -Red), AmpR	Datsenko y Wanner, (2000)

K_{Mr}: Resistencia a kanamicina; Amp^r: Resistencia a ampicilina; 6xHis: secuencia de 6 histidinas.

4.2. Modelo animal

Para el modelo murino, se obtuvieron ratones hembras BALB/c de seis semanas de edad desde el Bioterio del Instituto de Salud Pública de Santiago, Chile. La manipulación de los animales se realizó bajo la aprobación del comité de Bioética de la Universidad de Concepción. Para la inmunización los ratones se anestesiaron con 0,1 ml/10g Ketamine-xylazine. Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura recibiendo alimento y agua *ad libitum*.

4.3. Técnicas básicas de biología molecular

4.3.1. Extracción de DNA cromosomal y plasmidial

El ADN cromosomal se extrajo con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La extracción comprende el lisado de las células, la digestión del ARN con RNAsas, la remoción de las proteínas a través de la precipitación con sales y la concentración, lavado y precipitación con isopropanol del ADN genómico. Para el aislamiento del ADN plasmidial se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega®, Madison, EUA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y se resuspendió el ADN en 50 µl de agua MiliQ estéril y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

4.3.2. Amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cada reacción de PCR contenía un volumen total de 50 µl: 35,5 µl de agua ultra-pura, 5 µl de 10X buffer para taq polimerasa (Promega, Madison, EUA), 2 µl de 50mM MgCl₂ (Promega Madison, EUA), 1 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 µl de cada iniciador y 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa y 4 µl de ADNc total. Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador (Mastercycler ep gradient, Eppendorf™, Hamburgo, Alemania). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes; 94 °C por 3 min; seguido de 25 ciclos de 94 °C por 60 seg; 60 °C por 45 seg y 72 °C por 60 seg. Finalmente, una fase de extensión, a 72 °C por 5 min. Los productos de la PCR se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

4.3.3. Transformación con plasmidios o productos de PCR

La transformación de las bacterias se realizó en bacterias electrocompetentes que se obtuvieron de la manera siguiente: Desde un cultivo bacteriano crecido en LB durante toda

la noche, se realizó una dilución 1/5 en 5 ml de caldo LB durante 2-3 h a 37 °C con agitación constante hasta una DO₆₀₀ de 0,4. El cultivo se centrifugó a 10000 x g por 2 min a 4°C (centrífuga Mikro22R, Hettich), se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 700 µl de agua MiliQ estéril y fría. Se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Luego las células se resuspendieron en 100 µl de agua MiliQ estéril fría y se procedió a la electrotransformación.

Para la transformación se mezcló 40 µl de células electrocompetentes con ADN plasmidial o producto PCR dializado en filtros de nitrocelulosa de 0,025 µm (Millipore) y se electrotransformó en cubetas con 0,1 cm de separación de electrodos (9 kV/cm) usando un electroporador “*E. coli* Pulser™” (Bio-Rad) a un voltaje de 1,8 kV. Luego, se agregó 1 ml de medio *Super Optimal Broth* (SOC) y se incubó a 30 o a 37 °C con agitación constante por 60 ó 120 min. Luego, se sembró 100 µl de las células transformadas en placas de agar LB con el antibiótico correspondiente y se incubó durante toda la noche a 30 ó 37°C. Los clones se seleccionaron en base a la resistencia al antibiótico otorgada por el material genético transformado.

4.4. Objetivo 1. Determinar los epítomos inmunodominantes y diseñar una vacuna multiepítomo en base a los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap, codificadas en los genes de la isla de patogenicidad SHI-1 de *Shigella flexneri* 2a.

4.4.1. Predicción de los epítomos inmunodominantes de las proteínas SigA, Pic y Sap

El estudio *in silico* fue dividido en dos pasos. Primero, las secuencias de aminoácidos de los autotransportadores fueron tomadas directamente de la secuencia de la isla de patogenicidad SHI-1 de *S. flexneri*, con n° de acceso AF200692, y la secuencia de la proteína HSP GroEL (HSP60) de *S. Typhi* (N° de acceso NP_458769.1), una proteína de 548 aminoácidos, se descargaron de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A partir de la secuencia de la isla, se creó una base de datos local, con cada uno de los marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de los genes de los autotransportadores SigA, Pic y Sap. Los ORF se tradujeron a su respectiva secuencia de aminoácidos a través de la herramienta de traducción del portal de Expsy. Luego, se seleccionó el dominio pasajero de los dos autotransportadores serino-proteasa (SigA y Pic), desde el aminoácido 53 hasta el 1093 (Gutiérrez y col., 2015), y el dominio pasajero del autotransportador Sap desde el aminoácido 52 hasta el 552, tal como está descrito para el dominio pasajero del antígeno 43 de *E. coli* (Van der Woude y Henderson, 2008). La estructura 3D del TLR2 (PDB ID: 2Z81) se obtuvo desde *Universal Protein Resource* (UniProt) en <http://www.uniprot.org> (Consortium, 2015). Luego, los tres dominios pasajeros se usaron para la selección de los péptidos más antigénicos e inmunodominantes de célula B y T, y la proteína GroEL se incluyó como adyuvante. Está descrito, que la adición de algunas secuencias de proteínas inmunogénicas pueden mejorar

la inmunogenicidad de las vacunas diseñadas basadas en epítomos (Capone y col., 2006). Segundo, la secuencia de los epítomos seleccionados y el adyuvante se ligaron *in silico* para la evaluación de la estructura con diferentes servidores bioinformáticos.

4.4.2. Predicción de epítomos de células B

A partir de la secuencia de aminoácidos de los dominios pasajeros de los tres autotransportadores, se identificaron los péptidos inmunodominantes para células B en ratones BALB/c. La selección de epítomos para células B en los dominios pasajeros de los tres autotransportadores, será realizó con un algoritmo de predicción basado en el modelo oculto de Márkov y escalas de propensión (Bepipred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) (Larsen y col., 2006)), y otro basado en las propiedades físico químicas como la flexibilidad, hidrofobicidad y polaridad etc. (Bcepred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) (Saha y Raghava, 2006). La selección de los epítomos se realizó con un punto de corte de 0,55 (Bepipred) y 2,38 (Bcepred). Los epítomos inmunodominantes que se presentaron en ambas herramientas de predicción, con un valor por encima del punto de corte, se consideraron como epítomos para las células B. Finalmente, se seleccionaron los péptidos más antigénicos a las células B a través del servidor VaxiJen v.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>).

4.4.3. Predicción de epítomos de células T

La selección de epítomos para células T en los dominios pasajeros de los tres autotransportadores, se realizó a través de cuatro herramientas de predicción: Los epítomos de unión a MHC de clase I se predijeron con respecto a los alelos H2-Dd, H2-Ld y H2-Kd a través del servidor nHLAPRED (<http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/>) (Bhasin y Raghava, 2007) y IEDB (*Immune Epitope Database*) (<http://tools.iedb.org/mhci/>) (Vita y

col., 2009), mientras que los epítomos de unión a moléculas del MHC-II se predijeron en base al alelo H2-IAd con los servidores NetMHCII versión 2.3 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>), Rankpep (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>) y IEDB (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) (Vita y col., 2009). Se nombraron como epítomos de MHC-II aquéllos que coincidieron en los tres servidores. Finalmente, se seleccionó los péptidos más antigénicos a las células T a través del servidor VaxiJen v.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). El servidor Rankpep, está basado en matrices de puntuación específicas (PSSM, *Position Specific Scoring Matrixes*) y el resto de los algoritmos están basados en una red neuronal artificial (ANN, *artificial neural network*) o en un método de matriz estabilizada (SMM, *stabilized matrix method*) (Pahil y col., 2017). La determinación de la afinidad a los alelos específicos de MCH (IC50) se realizó a través del algoritmo IEDB, el cual usa una matriz SMM.

4.4.4. Predicción de epítomos inductores de Interferón-gamma

El interferón-gamma juega un papel importante en la eliminación de patógenos vía la respuesta inmune de tipo innata y adaptativa, a través de la estimulación de los macrófagos y las células naturalmente asesinas. Para diseñar el candidato a vacuna más efectivo, los epítomos predichos para la presentación en MHC-II se evaluaron para conocer su “habilidad” de inducir la producción de interferón-gamma, usando el servidor IFN epitope en <http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/>. Este servidor predice los epítomos inductores de interferón-gamma usando una base de datos que contiene epítomos inductores y no inductores de unión al MHC-II con un modelo híbrido de alta precisión (81.39 %) (Dhanda y col., 2013).

4.4.5. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos

Para el análisis de los parámetros fisicoquímicos de la proteína quimérica multiepitopo diseñada, se utilizó el servidor ProtParam en <http://web.expasy.org/protparam> (Gasteiger y col., 2005). Los parámetros fisicoquímicos incluyeron la composición de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoelectrico, coeficiente de extinción, índice de inestabilidad, vida media *in vitro* e *in vivo*, hidropaticidad (GRAVY) e índice alifático. Además, se evaluó la propensión de solubilidad de la proteína luego de la sobreexpresión en *E. coli*, a través del servidor SOLpro server en <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>. Este servidor evalúa la solubilidad a través de múltiples presentaciones de la secuencia primaria de la proteína (Magnan et al., 2009).

4.4.6. Modelamiento de la proteína quimérica multiepitopo

El modelamiento por homología de la proteína diseñada se realizó utilizando el servidor ITASSER (*Iterative threading assembly refinement*) en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Yang y col., 2015). Este servidor emplea una aproximación jerárquica en la predicción de la proteína basado en múltiples alineamientos de fragmentos y ensamblajes con simulaciones. La confianza del modelo es expresada como C-score, que indica la calidad del alineamiento y el ensamblaje. EL C-score varía desde -5 a 2, donde el C-score más alto está relacionado con mayor confiabilidad. La visualización de la estructura 3D se realizó a través de UCSF Chimera y PyMOL.

4.4.7. Validación de la estructura terciaria de la proteína quimérica

Los errores potenciales de la estructura tridimensional inicial y final se evaluaron con los

formatos PDB a través del servidor ProSA-web server en <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php> (Wiederstein y Sippl, 2007) y Ramachandran plot en <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/rampage.php> (Lovell y col., 2003). ProSA-web está basado en la distribución de la energía en la estructura de la proteína y la comparación con proteínas nativas de una base de datos (Wiederstein y Sippl, 2007). Este servidor calcula la calidad de la proteína predicha a través de un valor denominado z-score, que indica posibles errores si la proteína evaluada cae fuera de la zona de las proteínas nativas con las cuales es comparada. En el caso de Ramachandran plot, este servidor es basado en el cálculo de los ángulos de torsión phi-psi para cada residuo en la estructura de la proteína, que será clasificada dentro de una región favorable, permitida y aislada (Lovell y col., 2003).



4.4.8. Interacción molecular entre la proteína quimérica diseñada con el receptor tipo toll-2 (TLR2)

Por un lado, la evaluación de las regiones hidrofóbicas en la estructura de la proteína multiépítopo se realizó usando el software Accelerlys Discovery Studio 3.5. Por otro lado, las regiones con funciones biológicas en el TLR2 se evaluaron a través de la localización de regiones de alta frustración con el servidor frustratometer en <http://frustratometer.qb.fcen.uba.ar/> (Jenik y col., 2012). Con el fin de predecir la interacción entre la proteína quimérica como ligando y el TLR2 como receptor, se utilizó el servidor Cluspro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu/login.php>), el cual es un servidor rápido de estructuras rígidas de interacción proteína-proteína (Kozakov y col., 2010). El servidor está basado en la correlación de la transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier transform*, FFT), análisis conformacional de energía, y la evaluación a través de una simulación Monte

Carlo. El modelo obtenido es refinado a través del paquete comercial CHARMM (Brooks y col., 1983; Torchala y col., 2013).

4.4.9. Adaptación de codones y construcción del gen

Con el fin de obtener un gen que pueda ser clonado y expresado a su máxima capacidad en un modelo bacteriano tipo *E. coli*, la secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica multiepítipo se sometió a traducción reversa a través del servidor EMBOSS backtranseq translation tool (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/), y se utilizó para la optimización de codones con la herramienta de optimización GenScript Rare Codon Analysis Tool (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis/>). La herramienta permite conocer diferentes características críticas como el índice de uso de codones (CAI, Codon Usage Index), el contenido GC, y la distribución de frecuencia de codones. Para mejorar la traducción, se adicionó la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de finalización (TAA) al inicio y al final del gen, respectivamente. Finalmente, para el proceso de clonamiento las secuencias de restricción, *Sma*I y *Kpn*I, se adicionaron al extremo 3'y 5'de la secuencia, respectivamente.

El gen construido se nombró como multiepítipo *S. flexneri* (MESF) y se clonó en el vector pUC57 (pUC57-MESF), éste fue construido por Biomatik Corporation (Silverdale, USA). La cepa *E. coli* DH5- α se transformó con el vector pUC57-MESF y seguidamente el ADN plasmidial se aisló con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Promega, USA). En paralelo, las *E. coli* DH5- α que contenían el plásmido de expresión pQE-80L (Addgene, MA, USA), se crecieron como se indicó previamente y se extrajo el plásmido. Después, los vectores pQE-80L y pUC57-MESF se sometieron a digestión enzimática con las enzimas *Sma*I y *Kpn*I

(NBL, USA) y los productos de digestión se separaron a través de electroforesis y se ligaron al vector pQE-80L con la ligase T4 ligase enzyme (NBL, USA) a 4 °C durante toda la noche. El vector recombinante pQE-80L-MESF, codifica una cola Hisx6 al extremo 5' de la región de clonamiento. Este vector recombinante se utilizó para la transformación por electroporación de *E. coli* BL21, y las colonias se evaluaron y seleccionaron con el antibiótico respectivo.

4.4.10. Expresión, aislamiento y purificación de la proteína quimérica multiepitopo

Las colonias *E. coli* BL21 que contenían el plásmido pQE-80L-MESF se cultivaron en medio LB con ampicilina hasta una densidad óptica D.O.600 = 0,6. La expresión del gen se indujo con 1 mM *isopropylthiogalactoside* (IPTG) por 4 h a 37°C seguido de centrifugación a 6000 x g a 4°C por 10 min. El pellet se resuspendió en buffer de lisis conteniendo Tris 50 mM, NaCl 200 mM, Imidazol 5 mM, pH 7,0, y se mantuvo en hielo por 10 min. La suspensión bacteriana se pasó cinco veces por condiciones de alta presión usando una prensa francesa French press (Avestin, Canada) con una presión de 12000 psi bajo condiciones de refrigeración. Seguidamente, la suspensión se centrifugó como previamente se mencionó, y las proteínas contenidas en la fase líquida y sólida se observaron a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*), marcadas con azul de Coomassie. La proteína quimérica expresada se confirmó a través de Western blot con el uso de anticuerpos primarios IgG anti-Hisx6 tap y secundario anti-IgG conjugado HRP (Santacruz, USA).

La fracción soluble se analizó por cromatografía en columnas de níquel en un ÄKTAprime (General Electric, USA) usando tres Buffers: Buffer de equilibrio (Urea 8M,

Tris-HCl 20mM, NaCl 200mM, Imidazol 5mM, pH 8.0), Buffer de lavado (Urea 8M, Tris-HCl 20mM, NaCl 200mM, Imidazol 50 -100 mM, pH 8.0), y Buffer de elución (Urea 8M, Tris-HCl 20mM, NaCl 200mM, Imidazol 200 - 250 mM, pH 8.0). La solución eluida se diluyó en Tris-HCl 7.4, luego se dializó a 4°C en Buffer Tris (50 mM Tris, 1 mM EDTA) y se concentró usando un Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Merck Millipore, Germany). La concentración de las proteínas totales obtenidas se determinó a través del método de BCA, *Bicinchoninic Acid* (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). La proteína recombinante (rMESF) se analizó y se confirmó a través de SDS-PAGE y western blot como se indicó previamente.



4.5. Objetivo 2. Evaluar la inducción de respuesta inmune (IgA e IgG) y el perfil de citoquinas (IL-4, IFN- γ y TNF- α) inducida por la vacuna multiepítipo en base a los epítotos inmunodominantes de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap en ratones BALB/c

4.5.1. Inmunización de los ratones

Los ratones BALB/c (n = 10/grupo) se distribuyeron al azar en cinco grupos, para las diferentes rutas de inmunización (5 animales por caja). El grupo I se inmunizó por vía i.n. con 25 μ l de la proteína recombinante (25 μ g/ratón) (rMESF), el grupo II se inyectó por vía intramuscular (i.m.) con una mezcla de 50 μ l de la proteína recombinante (25 μ g/ratón) más 50 μ l del adyuvante Imject alum adjuvant (Thermo Fisher Scientific, USA) (rMESF+alum), el grupo III se inyectó por vía intradérmica (i.d.) con una mezcla de 50 μ l de la proteína recombinante (25 μ g/ratón) más 50 μ l del adyuvante de Freund (CFA, *Completed Freund's adjuvant*) (Sigma-Aldrich, USA) (rMESF+CFA). Los siguientes dos refuerzos se dieron a todos los grupos experimentales en los días 14 y 28. Sin embargo, en el caso del grupo III, los dos refuerzos subsiguientes se aplicaron por vía subcutánea (s.c.) e i.m., respectivamente con adyuvante incompleto (IFA, *Incomplete Freund's adjuvant*), en los mismos días mencionados anteriormente. Se utilizaron dos grupos de ratones controles, uno inyectado con solución de Buffer fosfato (PBS, *phosphate Buffer saline*) más Imject alum adjuvant (grupo IV) (PBS+alum) y el otro inyectado con PBS+CFA (grupo V).

4.5.2. Determinación de anticuerpos específicos en sangre periférica

Para la determinación de los niveles de inmunoglobulina específicas, se extrajo sangre de desde la cola de los ratones de los cinco grupos establecidos, dos días antes de la primera inmunización y 12 días después de cada inmunización. Una vez coagulada la sangre, se

centrifugó y el suero se aisló para la detección específica de las inmunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2a e IgA a través del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Para esto, se cubrieron placas de poliestireno de 96-pocillos con Buffer de adhesión que contenía 1 µg de la proteína rMESF diluido en 200 µl de Buffer conteniendo 0,05 M carbonato-bicarbonato, pH 9,6. Luego de la incubación durante toda la noche a 4°C, las placas se lavaron 3 veces con una solución PBS al 0,05% Tween-20 (PBST) y se bloquearon con PBS al 0,8% de gelatina por 2 h a 37 °C. Luego las placas se lavaron 3 veces con PBST y cada pocillo se incubó con una dilución seriada de suero de los ratones a 37°C por 2 h. Después de lavar 3 veces con PBST, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón IgG/IgG1/IgG2a o IgA (1:2000), conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, Horseradish peroxidase) (Serotec, Oxford, UK). Luego, 200 µl del sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)/H₂O₂ (BD Biosciences, USA) se adicionó a las placas y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min, y la reacción se detuvo con la adición de 50 µl H₂SO₄ 2N. Finalmente, las placas se leyeron a una DO450 nm usando el VictorX3 (PerkinElmer, USA). Los títulos de los anticuerpos se expresaron como el promedio ± desviación estándar del log₁₀ del inverso de la dilución seriada.

4.5.3. Determinación de IgA de secreción

Los niveles de IgA a nivel secretor fue determinada en las fecas de los ratones experimentales y controles (Martinez-Becerra y col., 2013). Las fecas se colectaron, pesaron, homogenizaron y se diluyeron a una razón de 0,1 g/ml con PBS conteniendo 0,1% de azida de sodio, 1 mM de *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF). La suspensión fecal se centrifugó a 15.000 x g por 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a

15.000 x g por 15 min a 4°C y se guardaron a -80°C para su posterior uso. Los niveles específicos de anticuerpo IgA en fecas se determinaron por ELISA con anticuerpos anti-IgA (ThermoFisher Scientific, USA), tal como se describió previamente.

4.5.4. Linfoproliferación de linfocitos

Los ratones se sometieron a muerte por eutanasia 30 días después de la administración de la última inmunización y sus bazos se extrajeron bajo condiciones de esterilidad. Los bazos se utilizaron en la preparación de una suspensión celular a través de disgregación mecánica, y los eritrocitos se lisaron usando un Buffer de lisis (*ACK ammonium-chloride-potassium Buffer*) (Gómez y col., 2017). Luego, las células se lavaron con medio RPMI 1640 (Gibco TM, Life Technologies), y se utilizaron en el ensayo de linfoproliferación en respuesta a la proteína quimérica multiepítipo rMESF. Los esplenocitos se suspendieron en medio RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado por calor (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), y solución antibiótica/antimicótica (100 UI penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, y 0,25 µg/ml anfotericina B). Luego, se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Denmark), a una concentración de 1×10^5 células/pocillo. Las células se estimularon con 1 µg/ml ó 5 µg/ml de la proteína quimérica y se incubaron por 72 h a 37°C bajo 5% CO₂. Luego del tiempo de incubación, las células se pulsaron con 0.5 µCi de timidina tritiada (³H-TdR) por pocillo (Amersham, Life Science, London, UK) y luego de 8 h se midió la radioactividad del ADN usando un Contador de centelleo (Beckman LS 6500, USA). Los controles positivos y negativos consistieron en 10 µg/ml de concavalina A (Promega, Madison, WI, USA) y medio completo RPMI 1640, respectivamente. Los datos de proliferación celular se expresaron como el índice de estimulación del cultivo por triplicado desde cada grupo experimental. Los datos se obtuvieron a través de la división de

la cantidad de ^3H -Timidina incorporada (c.p.m.) en el cultivo celular estimulado con el antígeno, y el c.p.m. obtenido desde el cultivo celular sin antígeno (Escalona y col., 2017).

4.5.5. Evaluación de citoquinas

Los títulos de IL-4, TNF- α , IFN- γ y IL-17 se determinaron a través de ELISA de captura. Brevemente, los esplenocitos se ajustaron a una concentración de 4×10^6 células viables por ml en medio RPMI 1614 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y solución antibiótica/antimicótica (100 UI penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, y 0.25 $\mu\text{g/ml}$ anfotericina B). Las células en suspensión se cultivaron en placas de 24 pocillos (Nunclon, Denmark), y se estimularon con la proteína recombinante multiepítotope *S. flexneri* (rMESF) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ o medio RPMI solo. Luego, se incubó por 48 h bajo 5% CO_2 para inducir, *in vitro*, la expresión de las citoquinas. Finalmente, se colectó el sobrenadante y las citoquinas se cuantificaron a través de ELISA sándwich usando los kits de citoquinas de ratón IL-4, TNF- α , IFN- γ y IL-17 (BD Biosciences, USA), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

4.6. Objetivo 3. Evaluar la efectividad de protección de la vacuna multiepitopo en ratones BALB/c frente a dosis letal de *Shigella flexneri* 2a

4.6.1. Desafío de los ratones inmunizados frente a *S. flexneri*

La eficacia protectora del candidato vaccinal se evaluó en los ratones inmunizados (5 ratones/grupo) después de treinta días de la última inmunización. La dosis letal *S. flexneri* 2457T (1×10^7 unidades formadoras de colonia (UFC)/ratón) se determinó por dilución seriada, plaqueando y contando las colonias (Martinez-Becerra y col., 2013; Chitradevi y col., 2015). Brevemente, se cultivó *S. flexneri* en agar TSA con 0,05 % de rojo congo a 37°C, y las colonias se desarrollaron en caldo TSB a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una $DO_{600}=1$. El cultivo bacteriano se centrifugó a 6000 x g por 10 min, se resuspendió en PBS y se ajustó a 5×10^5 bacteria/ μ l para la infección. Todos los grupos de ratones se anestesiaron y se desafiaron por vía intranasal con 20 μ l de la suspensión bacteriana tal como se describe para el modelo pulmonar de ratón con una dosis letal de 1×10^7 (UFC)/ratón de *S. flexneri* (Mallett y col., 1993). Los ratones se observaron para el registro de la mortalidad durante 30 días.

4.6.2. Carga bacteriana en pulmones

La carga bacteriana en los pulmones se determinó a los 3 y 30 días después del desafío letal en los ratones de los grupos controles y experimentales, respectivamente (Chitradevi y col., 2016). Se eutanasiaron tres ratones por grupo y se removieron los pulmones bajo condiciones de esterilidad. Luego, los pulmones se homogenizaron en 5 ml de PBS frío y se realizaron diluciones seriadas de 10. Las diluciones seriadas bacterianas se plaquearon en agar LB a 37°C y se incubaron por 18 h para el posterior conteo de las UFC.

4.7. Objetivo 4. Determinar el efecto de la proteína Sap en los mecanismos de formación de biopelícula, autoagregación y adherencia, de *Shigella flexneri* 2a en líneas celulares inmortalizadas

4.7.1. Construcción de la mutante *Shigella flexneri* 2a del dominio pasajero del gen *sap* por intercambio alélico

La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* en *S. flexneri* 2457T se realizó por el método de disrupción génica en un solo paso, según lo descrito por Datsenko y Wanner (2000). Los cebadores utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 2. El plásmido pKD4 se utilizó como templado en la amplificación por PCR del gen de resistencia a kanamicina (*KmR*) con los cebadores diseñados, Sap_kanF y Sap_kanR. Estos cebadores están delimitados por secuencias específicas dentro del gen *sap*. Cada cebador contiene 40 nucleótidos hacia el extremo 5', idénticos a las regiones que dan inicio y término desde la secuencia señal hasta el dominio pasajero de la secuencia del gen *sap*, mientras que el extremo 3' de los cebadores contendrán 20 nucleótidos que complementan con la región del gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4. Luego de realizada la PCR, los productos de amplificación se purificaron para la transformación por electroporación de *S. flexneri* 2457T, la cual se transformó previamente con el sistema colaborador del fago lambda (λ -red helper plasmid pKD46), que contienen los genes que codifican para las subunidades de la recombinasa Red bajo el control del promotor inducible por arabinosa. Para la transformación con el pKD46, las células de *S. flexneri* se hicieron competentes por electroporación según lo descrito en el apartado 3.3.3. Previamente, el plásmido pKD46 se concentró y se inoculó 5 μ l de este con las células competentes. Luego, los clones

seleccionados por resistencia a ampicilina se denominaron *S. flexneri*/pKD46. Para la expresión del gen de la recombinasa Red, los clones se cultivaron en 50 ml de caldo LB suplementado con Amp (100 µg/ml) y L-arabinosa (10 mM) como inductor a 30 °C con agitación constante, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3-0,4. Luego, las células se hicieron electrocompetentes tal como se describe en el apartado 3.3.3. Se mezclaron 40 µl de bacterias competentes con 5 µl del producto de amplificación por PCR del pKD4 descrito anteriormente para la transformación. Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB a 37 °C durante 2 h y luego se sembraron en placas de agar LB suplementadas con Kan (50 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Finalmente, la eliminación del plásmido pKD46 de las células transformadas se realizó a 37 °C, seleccionando posteriormente, los clones resistentes a Kan y sensibles a Amp. El reemplazo alélico se comprobó desde la extracción del ADN cromosomal mediante el estuche comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®). Luego, se procedió a la amplificación por PCR con cebadores interno y externo al casete de resistencia (Km): (sap_conF: y sap_conR:). La cepa con la modificación genética se denominó 2457TΔsap.

Tabla 2. Cebadores usados en la creación de la mutante 2457TΔsap.

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos	Referencia
Sap_kanF/Sa p_kanR	ATGAAACGACATCTGAATACCTGCTACAGGCTGGTATGGAATCACATTACGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC/ GTTATCGGGAATATTCCAGGTGGCACCAGAGGCGAGAGTGACATTTCGTGGCA TATGAATACCTCCTTAG	Este trabajo
sap_conF/ sap_conR	CCTGCCGGTATCCACATCTG/ TGCCATATCCGGGCGTACAC	Este trabajo

4.7.2. Elaboración de curvas de Crecimiento

Con el fin de conocer si la tasa de crecimiento de *Shigella flexneri* 2457T es afectada por la deleción del dominio pasajero del gen *sap*, se elaboraron curvas de crecimiento para la cepas salvaje y mutante (*2457TΔsap*) en medio tripticasa de saya (TBS) con o sin sales de bilis (BS) al 0,4 % con la medición de la DO a 600 nm según lo descrito previamente (Nickerson y col., 2017). Brevemente, las cepas bacterianas correspondientes se cultivaron en caldo LB durante toda la noche a 37 °C. Luego, el cultivo se diluyó 1:50 en los medios correspondientes y se cultivaron por triplicado en agitación constante a 225 rpm a 37 °C. Finalmente, se midió la DO₆₀₀ cada hora por un período de 6 h blanqueando con el medio solo.

4.7.3. Ensayo de formación de biopelícula en superficie sólida

Con el fin de conocer si la eliminación del dominio pasajero del gen *sap* en *S. flexneri* afecta la formación de biopelículas en presencia o ausencia de sales biliares, se realizaron ensayos de formación de biopelícula en superficie sólida, tiñendo las bacterias con cristal violeta, el cual se une al peptidoglicano de la pared bacteriana (Nickerson y Faherty, 2018). Brevemente, se adicionó 1 ml de medio TBS solo o con sales biliares al 0,4% en placas de cultivo de 96 pocillos. Luego, se inoculó una colonia por pocillo de *S. flexneri* 2457T y de la mutante *2457TΔsap*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 h y el medio se aspiró cuidadosamente. Luego se lavaron dos veces los pocillos con PBS 1X y se dejó secar. Secadas las placas se procedió a teñir las bacterias en los pocillos con cristal violeta al 0,5 % y se dejó incubar por 5 min en oscuridad. Seguidamente las placas se lavaron 5 veces con agua destilada y se añadió 1 ml de etanol al 95 % a cada pocillo y se incubó durante 30

min a temperatura ambiente. Se suspendieron las bacterias en el etanol contenido en cada pocillo y finalmente se midió la absorbancia a DO₅₄₀ blanqueando con medio solo.

4.7.4. Ensayo de autoagregación bacteriana

Con el fin de conocer si la eliminación del gen *sap* de *S. flexneri* afectaba el mecanismo de autoagregación, se realizaron ensayos de autoagregación en presencia o ausencia de sales biliares con pequeñas modificaciones (Xu y col., 2016). Brevemente, un cultivo en TBS de la noche anterior de *S. flexneri* y la mutante 2457T Δ *sap*, se estandarizaron y se diluyeron a una relación 1:50 en tubos de polietileno con medio TBS solo o con sales de bilis al 0,4 %. Los cultivos se crecieron en agitación constante a 220 r.p.m. por 4 h. Luego los tubos de cultivos se dejaron en condición estática a temperatura ambiente y se midió la OD₆₀₀ en diferentes tiempos tomando una alícuota desde el centro del caldo de cultivo.

4.7.5. Ensayo de adherencia a línea celular

Con el fin de conocer el efecto de la eliminación del gen *sap* en el mecanismo de adherencia de *S. flexneri*, se realizaron ensayos de adherencia sobre células epiteliales de cáncer de colon humano HT-29 (Nickerson y col., 2017). Brevemente, se cultivaron las células HT-29 en placas de cultivo de seis pocillos, con medio DMEM hasta alcanzar una monocapa de 75 % de confluencia. Para el cultivo bacteriano, se inoculó una colonia de *S. flexneri* 2457T o de la mutante 2457T Δ *sap* en medio TBS con o sin sales de bilis al 0,4 % con agitación constante de 220 r.p.m. a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,7. Luego se estandarizó la DO₆₀₀ a 0,35, se lavaron las bacterias con PBS 1X y se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM. La suspensión bacteriana se adicionó a la monocapa del cultivo celular HT-29 sin centrifugación y se incubó a 37 °C bajo 5 % CO₂ por 3 h. Seguidamente, se lavó la monocapa cinco veces con PBS 1X y se lisaron las células con Tritón X-100 al 1

%. Luego se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de bacterias asociadas a la adherencia celular. El porcentaje de recuperación promedio se calculó en tres experimentos independientes como (título de bacterias recuperadas/ título de infección utilizado) X 100. La significancia estadística se determinó comparando los resultados de la sepa salvaje *S. flexneri* con la mutante 2457T Δ sap.

4.8. Análisis estadístico

Los anticuerpos específicos, los niveles de citoquinas y la respuesta linfoproliferativa se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) de doble vía. El estudio de la protección frente a *S. flexneri* se expresó a través de curvas de supervivencia de Kaplan Meyer. Las múltiples comparaciones se evaluaron usando el test Tukey Honest Difference. Los gráficos y las comparaciones estadísticas se generaron a través del paquete GraphPad Prism 5.04. Un valor de p igual o menor a 0,05 se consideró como significativo para todas las evaluaciones. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5. Resultados

5.1. Análisis inmunoinfomático

Los dominios pasajeros de los tres autotransportadores se evaluaron en la búsqueda de epítomos altamente inmunogénicos para la activación de células B, T-CD4 y T-CD8. Los epítomos más abundantes fueron para células B.

5.1.1. Predicción de epítomos para células B

Los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap mostraron epítomos de células B con altas puntuaciones de antigenicidad, entre los que se seleccionaron siete péptidos de mayor antigenicidad con puntajes sobre 1.7 (Tabla 3).



Tabla 3. Principales epítomos inmunodominantes para linfocitos B de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap, de acuerdo con los servidores Bcepred y BepiPred. Los epítomos seleccionados para este estudio están señalados en color rosado.

Passenger domain	Position aa	Epitope	VaxiJen (score)
SigA	92	YKASNRVSS	1.5959
	393	DALSESGNG	1.7233
	470	TQQHNNNAN	1.4223
	529	AAIKDQEST	1.1310
	539	NKRYNTEYK	0.9601
	622	QQLRSGDSA	1.8680
	699	PTENNKYSP	0.9987
	748	VDQYKEDNL	0.6340
	871	QKVGNNNSG	2.2768
	885	ITAPKGSNK	0.8660
	932	ENTASSGAA	1.8454
	963	GDLRDTNGE	2.9628
	1020	TDSHASSNA	1.6404
	Pic	96	DRNNHPSID
120		SAVTSEGTK	1.6706
292		HGQKDNDLN	1.3586
679		FVDKNDGTG	2.3278
700		DTVNDRSQY	0.7705
841		GSDTPAELA	0.4957
945		EKATGSDNS	1.7278
Sap	83	RDGGGQSLN	2.9945
	138	NTGAEGGPESE N	1.6370
	345	SGTRSDGKA	2.8234
	442	EKSGSGTLT	2.4054

5.1.2. Predicción de epítomos para linfocitos T citotóxico

Los epítomos con mejores valores IC50 (nM) de afinidad a los alelos MHC-I (H2-Dd, H2-Ld y H2-Kd), y mayores valores de antigenicidad se seleccionaron desde la predicción en los dominios pasajeros de las proteínas autotransportadoras SigA, Pic y Sap (Tabla 4). Sin embargo, dos epítomos se seleccionaron por cada proteína evaluada con un total de 6 epítomos para linfocitos T citotóxico (LTC), con valores de IC50 entre 0,09–202 y puntajes en VaxiJen entre 1,0807-2,2930.



Tabla 4. Principales epítomos inmunodominantes para LTC de los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap de acuerdo con los servidores nHLAPRED and IEDB. Los epítomos seleccionados para este estudio están señalados en color rosado.

Passenger domain	Position	Peptide	IC50 (nM)	VaxiJen (score)	
SigA	577	LSIGRDANVKGH	46.10	1.9740	
	997	QIGVDKKHELDG	50.78	0.4984	
	795	RVNGQSALQSLK	73.40	0.7332	
	358	NNLKIGNGTVIL	96.98	1.0807	
	Pic	961	NPAQGQALNIPL	0.09	1.4431
		362	GVAGDNLHKLGE	35.70	0.5835
		307	FSGQNGAIIKLD	72.73	0.5268
		889	TLGGDSAIHSLT	73.40	0.7947
		168	KTGGTTGVPLIS	38.52	1.222
		386	GGLKTGDGIVVL	96.98	0.8834
		621	SISGSAPVSLNQ	301.78	0.6944
		652	FHLSRNASLNSD	356.20	0.5723
		730	IDAYDSAVSITS	211.20	0.5472
		779	AGKNGKITLSGT	36.87	1.2479
	Sap	344	VSGTRSDGKAFS	10	1.5893
71		VQAGGTASDTVI	53	1.6908	
82		IRDGGGQSLNGL	123	2.2930	
40		GPDSIDENTGGQW	164	1.3689	
439		GSVEKSGSGTLT	202	1.8079	
138		NTGAEGGPESEN	786	1.6370	

5.1.3. Predicción de epítomos para linfocitos T colaboradores

Los epítomos con mejores rangos percentiles de unión al sistema mayor de histocompatibilidad de clase dos MHC-II (H2-IAd), y mejores puntajes de antigenicidad de acuerdo al servidor VaxiJen, se seleccionaron desde la predicción en los dominios pasajeros de las proteínas autotransportadoras Pic y Sap, a través de los servidores Rankpep, NetMHCII 2.3 y IEDB servers (Tabla 5). Sin embargo, SigA no se incluyó en la Tabla 5,

porque no se observaron buenos rangos percentiles en los epítomos que coincidían entre un servidor y otro, sobre el dominio pasajero de SigA. Se seleccionaron un total de tres epítomos altamente antigénicos en los dominios pasajeros de Pic y Sap para la activación de linfocito T colaboradores, con valores VaxiJen desde 0,8985 hasta 1,3404 (Tabla 5).

Tabla 5. Principales epítomos inmunodominantes para linfocitos T colaboradores de los dominios pasajeros de los autotransportadores Pic y Sap, de acuerdo con los servidores Rankpep, NetMHCII 2.3 y IEDB.

Passenger domain	Position	Peptide	Percentile rank	VaxiJen (score)
Pic	1014	DGFKAEADKAAAKA	2.48	1.3404
	824	AHASGDIHASAASTV	3.75	1.1355
Sap	261	GALVTSTAATVTGTN	27.08	0.8985



5.1.4. Predicción de epítomos inductores de interferón-gamma

Para obtener un constructo vaccinal con una inducción inmune completa, los epítomos de MHC-II se evaluaron en base a la inducción de IFN- γ a través del servidor IFNepitope server (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/>). Se evaluaron tres epítomos que se clasificaron, según el servidor, como inductores de IFN-gamma con puntajes entre 0,17-0,61 (Tabla 6).

Tabla 6. Epítomos inductores de IFN-gamma predichos por el servidor IFNepitope sever.

Start-end	Sequence	Score
649-660	DGFKAEADKAAAAKA	0.61
668-683	AHASGDIHASAASTV	0.17
687-702	GALVTSTAATVTGTN	0.54

5.1.5. Diseño completo de la vacuna multiepítopo

De acuerdo con el análisis inmunoinformático, el diseño final de la proteína quimérica consistió en cuatro dominios: el dominio adyuvante que contiene la proteína GroEL (desde el amino ácido 1 al 558), que activa los TLR2/4, el dominio BCL con siete péptidos activadores de células B (desde el aa 559 al 649), el dominio HTL con tres péptidos activadores de linfocitos T colaboradores (desde el aa 650 al 700), y el dominio CTL con siete péptidos activadores de linfocitos T citotóxicos (desde el aa 701 al 829). Dependiendo del dominio, los péptidos se unieron entre sí a través de secuencias de amino ácidos: EAAAK, GSGS, AYY y HEYGAEALERAG, que mejoran la presentación antigénica y la estabilización molecular de la proteína quimérica. El modelo diseñado está representado en el diagrama de la Figura 2, con las diferentes secuencias de enlace, *linkers*.

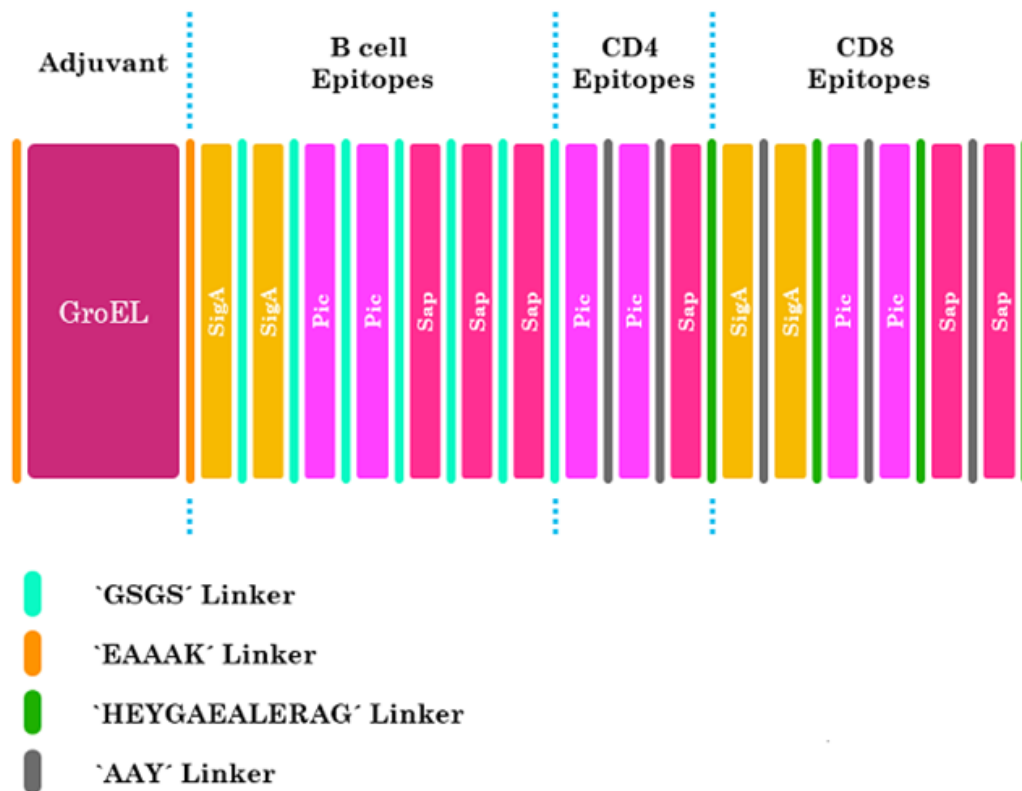


Figura 2. Diagrama del constructo final de la proteína quimérica multiepítipo basado en los dominios pasajeros de SigA, Pic y Sap, y la HSP GroEL de *S. Typhi*.

5.1.6. Parámetros fisicoquímicos y evaluación de antigenicidad

La antigenicidad del constructo completo de la proteína quimérica multiepítipo según los servidores ANTIGENpro y VaxiJen server, es de 0,93 y 0,90, respectivamente. Estos valores clasifican al constructo como altamente antigénico. Con respecto a las propiedades fisicoquímicas, la proteína multiepítipo tiene un peso molecular de 84.466.74 Da con un total de 829 aa y un punto isoeléctrico (pI) de 5,01, cuyo valor es importante para las evaluaciones fisiológicas. La vida media de la proteína multiepítipo fue calculada en 1 h en reticulocitos de mamíferos, 30 min en levadura (*in vivo*) y más de 10 h en *E. coli* (*in vivo*). Los valores de los índices alifático y GRAVY fueron de 83,91 y -0,191, respectivamente.

El alto índice alifático indica la estabilidad de la proteína en un amplio rango de temperaturas y el valor negativo del índice de GRAVY clasifica a la proteína quimérica como hidrofílica, lo que permite una mejor interacción con el agua. Además, el índice de inestabilidad fue de 23,13, lo que clasifica a la proteína quimérica como estable.

Por otro lado, la alergenicidad del constructo vaccinal evaluado a través de los servidores AlgPred y AllergenFP, clasifican al constructo como no-alérgico. Además, la propensión a la solubilidad de la proteína quimérica después de ser sobre-expresada en *E. coli*, a través del servidor SOLpro fue de 0,95. Con respecto a la importancia de la hidrofobicidad de la proteína quimérica en la expresión, el índice de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle mostraron regiones altamente hidrofílicas señalizadas por debajo de cero, lo que indica mayor probabilidad de ser presentada como antígeno por los sistemas MHCI y MHCII (Figura 3).



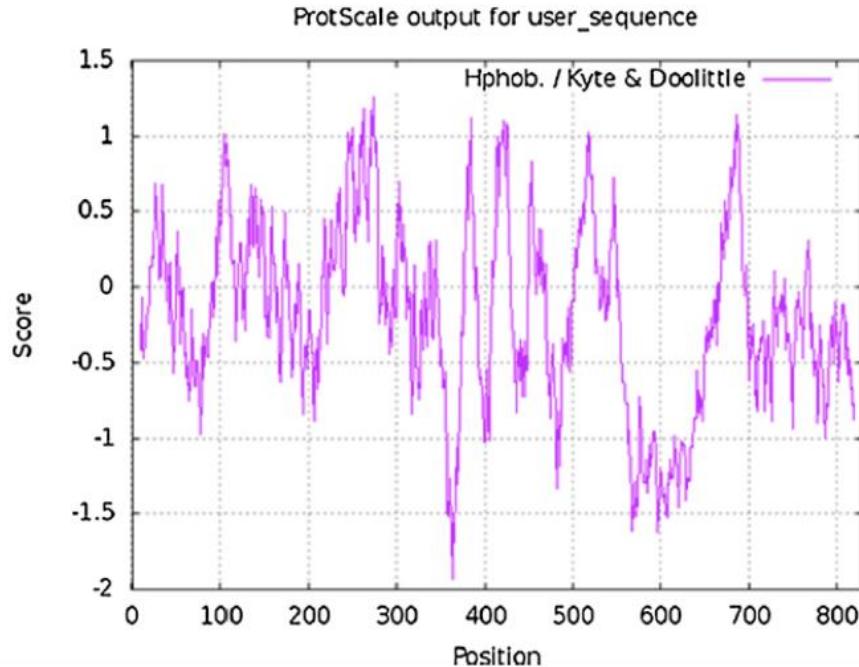


Figura 3. Perfil de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle para el constructo de la proteína quimérica multiepitopo. Regiones por encima de cero (0) son definidas como regiones hidrofóbicas. Las regiones antigénicas son presentadas en la región hidrofílica.

5.1.7. Refinamiento y validación de la estructura modelada

La calidad del mejor modelo predicho por I-TASSER evaluado a través de las herramientas de ProSa-web y Ramachandran, indicaron un valor *Z-score* de -12,97 y porcentaje de 82,2 % de los residuos de amino ácidos en la región favorable, respectivamente. Después del proceso de refinamiento y minimización de energía del modelo inicial, el modelo final se validó a través de ProSa-web, que indicó un valor *Z-score* de -12,73 (Figura 4), localizando al constructo vaccinal con las proteínas nativas de pesos moleculares similares contenidas en la base de datos del sistema. El análisis del punto de Ramachandran indicó porcentajes de residuos de amino ácidos de 93,9 %, 4,4 %, y 1,7 % localizados en las regiones

favorable, permitida, y atípica, respectivamente (Figura 5). El modelo tridimensional 3D final se muestra en la Figura 6.

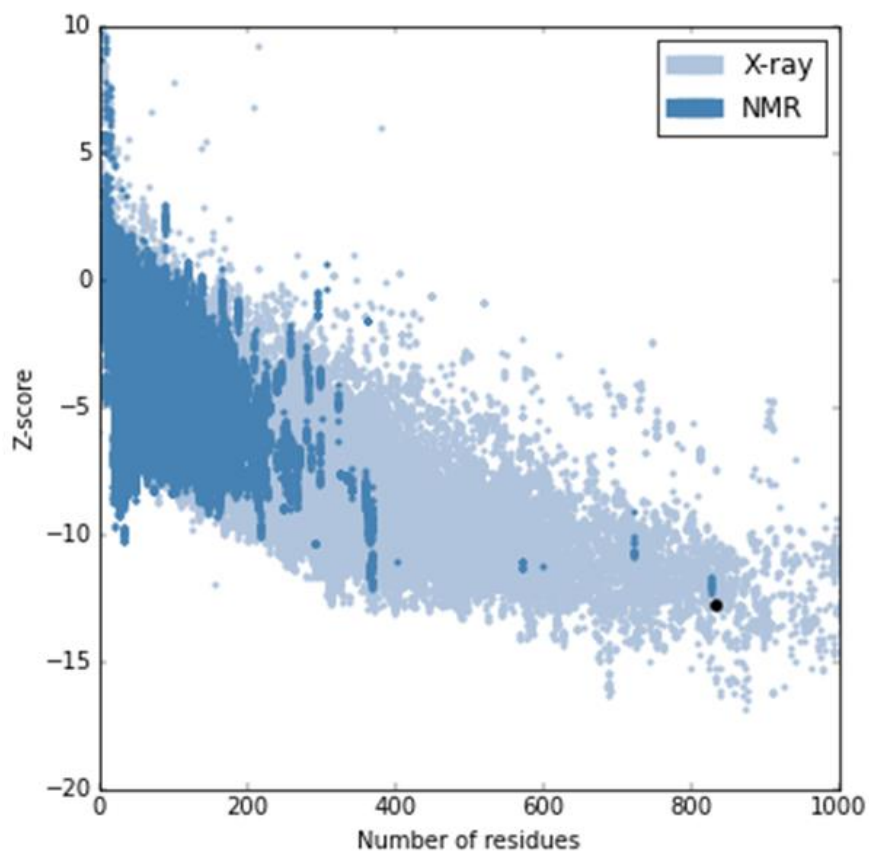


Figura 4. Evaluación ProSA-web de la estructura tridimensional de la proteína quimérica multiepitopo después del refinamiento estructural. El valor *z-score* del modelo final del constructo es de -12.73, que significa que la proteína está en el rango de conformación de las proteínas nativas registradas en la base de datos. El punto negro representa la proteína diseñada.

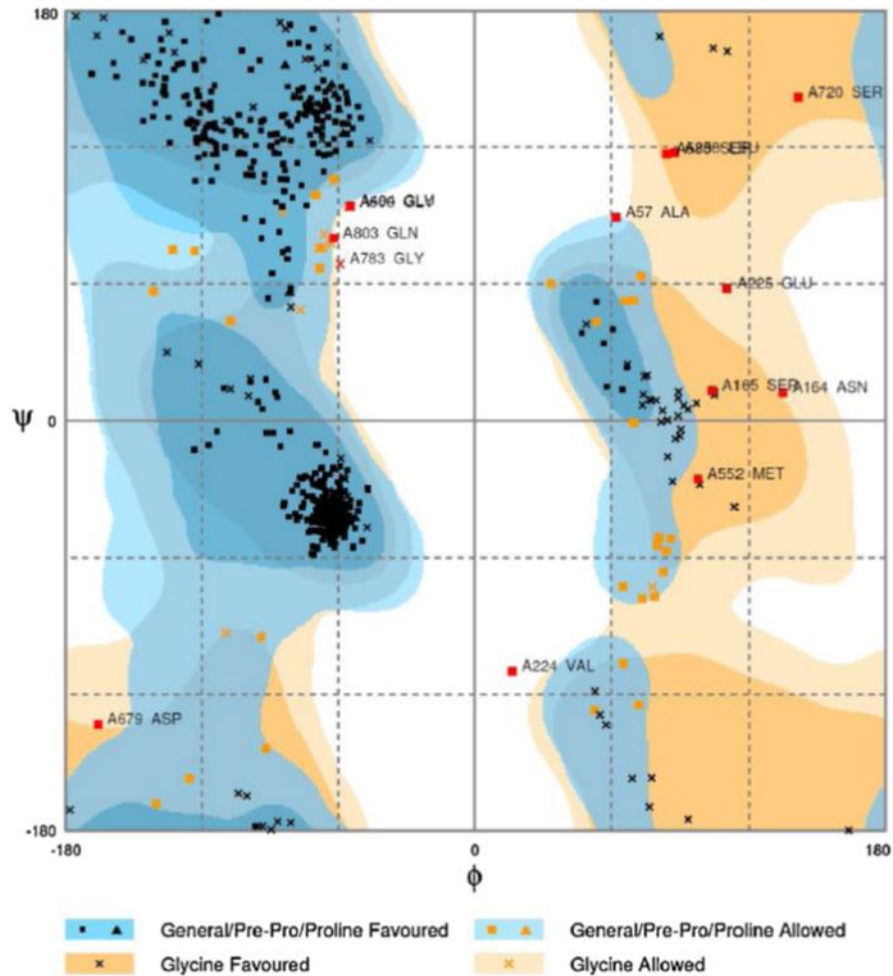


Figura 5. Validación de la estructura 3D de la proteína quimérica multipéptido después del proceso de refinamiento usando el punto Ramachandran. El modelo indica residuos de amino ácidos de 93.9 %, 4.4 %, y 1.7 % en las regiones favorable, permitidas y atípicas, respectivamente.



Figura 6. Estructura 3D modelada por el servidor I-TASSER después del proceso de refinamiento visualizada a través de Chimera 1.1. El color purpura muestra la región de la proteína GroEL y el resto de los epítomos son mostrados en color verde.



5.1.8. Interacción molecular entre la proteína quimérica multiepítomo y el TLR2

Después del análisis de frustración local del TLR2, se localizaron tres regiones altamente frustradas (Figura 7), donde la posición desde el aminoácido 250 al 383 fue la mejor región para posibles interacciones, lo que corresponde al sitio de unión del ligando del TLR. Este análisis permitió la realización de la interacción molecular a través del servidor ClusPro 2 el cual hace uso de la electrostática y energía libre de desolvatación (Comeau y col., 2004). En este estudio se evaluaron los 10 mejores modelos presentados por el servidor ClusPro y se escogió el modelo número 5 de acuerdo a las características y sitio de unión del TLR2 y otros ligandos (Jin y col., 2007; Kang y col., 2009; Nezafat y col., 2016). El mejor modelo

de la interacción del complejo de la proteína quimérica multiepítipo y el TLR2 se muestra en la Figura 8.

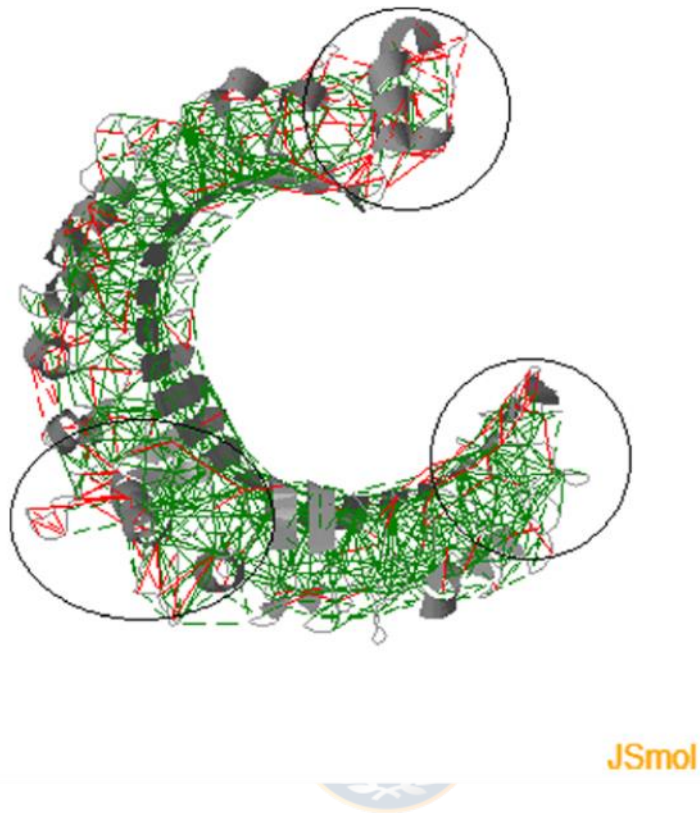


Figura 7. Patrones de frustración en el TLR2. El esqueleto molecular del receptor se muestra en gris y las regiones de alta frustración se muestran en color rojo marcadas con un círculo.

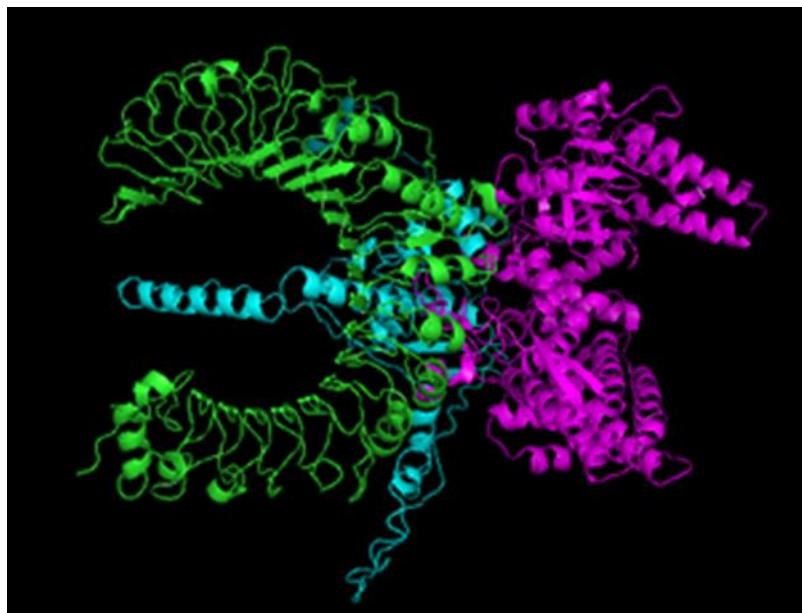


Figura 8. Modelo de interacción entre el TLR2 y la proteína multiepítipo realizado a través del servidor ClusPro y visualizado con el software de PyMOL. Los colores purpuras y cian muestran la región de GroEL y la región multiepítipo a través de la cual es posible la interacción con el TLR2, mostrado en verde.

5.2. Construcción del gene, clonamiento y producción de la proteína quimérica recombinante multiepítipo

El gen para la proteína recombinante multiepítipo de *S. flexneri* (rMESF) se obtuvo desde Biomatik Corporation y luego se clonó en el vector de expresión pQE-80L. El tamaño total del gen de la proteína rMESF fue de 2508 pb, el tamaño completo del vector clonado pQE-80L-rMESF fue de 7259 pb, y el producto de digestión con las enzimas *Sma*I y *Kpn*I del vector clonado se observaron en electrophoresis en gel de agarosa después de la extracción y purificación desde la *E. coli* BL21 transformada (Figura 9.A.). La cola 6xHis está codificada en el vector de expresión en el extremo final 5' del gene de la proteína rMESF. La proteína recombinante rMESF se indujo con 1 mM de IPTG, y la expresión de la proteína se confirmó a través de electroforesis SDS-PAGE (Figura 9.B.) y Western blot

(Figura 9.C.). La expresión de rMESF mostró que la proteína posee un peso molecular de alrededor 84,5 kDa. La proteína fue encontrada mayormente en la fracción soluble después de la disrupción de la membrana bacteriana. La elución y purificación se realizó usando cromatografía de afinidad Ni-NTA. La proteína replegada, dializada y concentrada se confirmó a través de electroforesis SDS-PAGE seguido de un Western blot (Figura 9.D.).



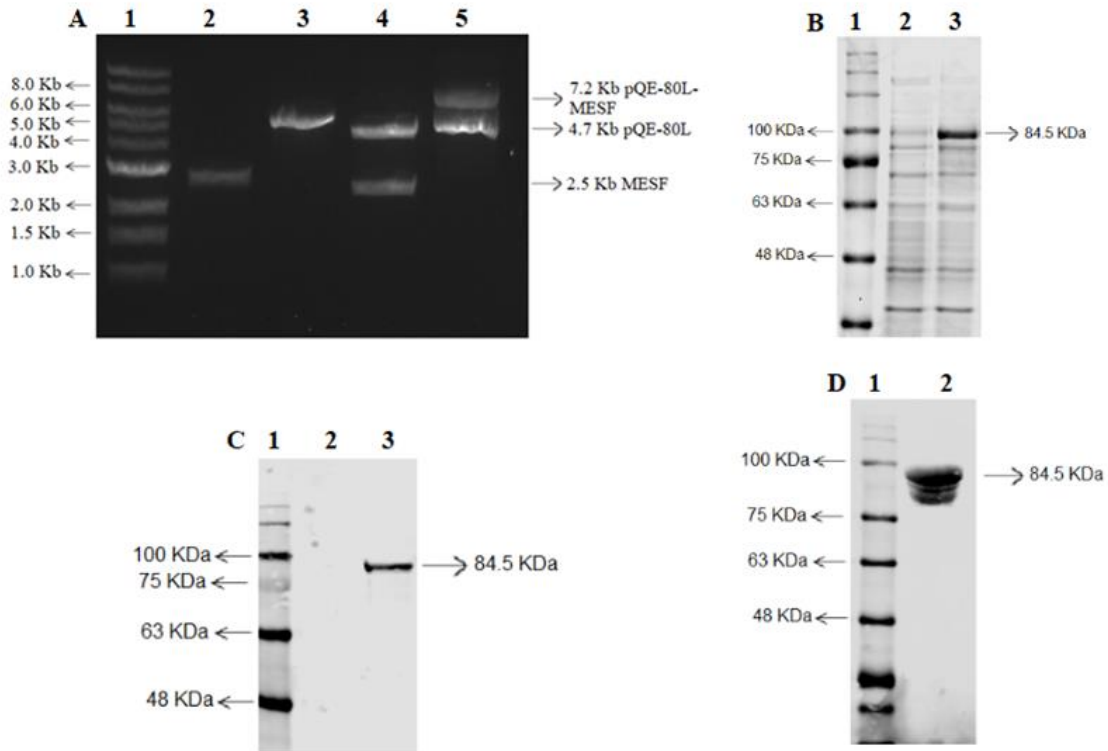


Figura 9. Clonamiento del gen quimérico (MESP), expresión y purificación de la proteína recombinante multiepítipo (rMESP). (A) Clonamiento del gene MESP en el vector de expresión pQE-80L con la ligasa T4. Línea 1: marcador de peso molecular 1 kb DNA. Línea 2: gen MESP. Línea 3: pQE-80L. Línea 4: producto de digestión del vector clonado pQE-80L-rMESP con las enzimas *Sma*I y *Kpn*I después de la ligación. Línea 5: tamaño completo circular del vector recombinante pQE-80L-rMESP (B). Electroforesis SDS-PAGE de la proteína expresada rMESP en *E. coli* BL21 después de la inducción con 1 mM IPTG por 4 h a 37°C. Línea 1: marcador de peso molecular. Línea 2: proteínas totales antes de la inducción con IPTG. Línea 3: proteínas después de la inducción con IPTG mostrando la proteína rMESP con un peso molecular de 84,5 kDa. (C) Western blot de la expresión de rMESP después de la inducción con IPTG. (D) Western blot de confirmación de la proteína rMESP después de la elución-purificación por cromatografía de Ni-NTA. IPTG, isopropylthiogalactoside; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electroforesis.

5.3. La proteína quimérica multiepítopo rMESF induce fuerte respuesta inmune humoral y de mucosas

Se determinaron los anticuerpos contra la proteína rMESF con el fin de evaluar la respuesta inmune humoral. Todas las inmunoglobulinas evaluadas incrementaron después de la primera inmunización y se mantuvieron en el tiempo, mostrando diferencias altamente significativas comparado con los controles PBS+CFA y PBS+alum ($p < 0,0001$). El suero de los ratones inmunizados por vía i.n. con la proteína rMESF alcanzaron los niveles más altos de IgG e IgG1 después de la segunda inmunización (Figura 10.A., Figura 10.B.). Sin embargo, la IgG (Figura 10.A.) e IgG1 (Figura 10.B.) en ratones inmunizados con rMESF+CFA o rMESF+alum alcanzaron sus niveles más altos después de la primera inmunización, y no se observaron diferencias significativas para ambas inmunoglobulinas en los grupos experimentales después de la tercera inmunización. Además, los picos máximos de IgG2a se alcanzaron en todos los grupos experimentales después de la tercera inmunización (Figura 10.C.), sin diferencias significativas entre ellos.

La IgA sérica y fecal, mostraron sus niveles más altos en los ratones inmunizados por vía i.n. con la proteína rMESF sola (Figura 10.D y Figura 11, respectivamente) con diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) comparado con los controles respectivos. El grupo de ratones inmunizados con rMESF+CFA mostraron niveles altos de IgA sérica y fecal con diferencias significativas comparados con los controles y el resto de los grupos experimentales ($p < 0,0001$). Todos los grupos experimentales mostraron diferencias significativas comparados entre ellos mismos ($p < 0,0001$), donde los niveles más altos de IgA fecal y sérica se encontraron en los ratones inmunizados por vía i.n. En general, todos los ratones inmunizados presentaron altos niveles predominantes de IgG1 e IgG2a seguido de IgA, a excepción del grupo rMESF+alum, donde no se observaron niveles de IgA fecal.

Los títulos de los anticuerpos en el suero de los animales controles permanecieron por debajo de los límites de detección durante el tiempo de evaluación.

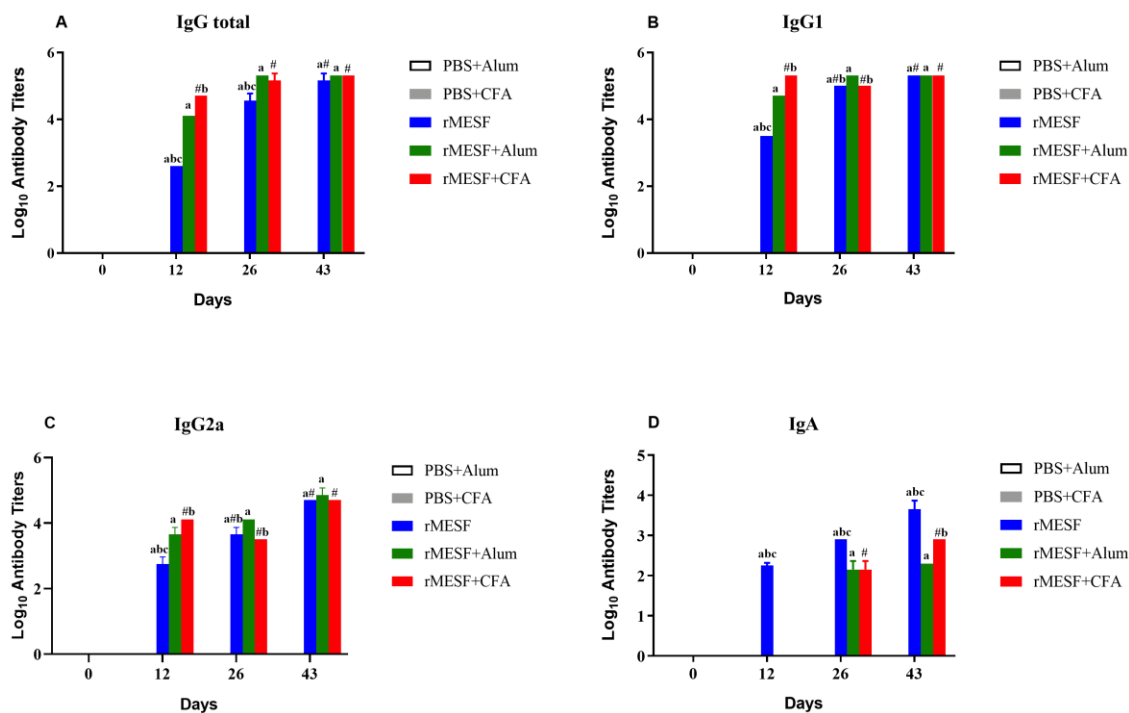


Figura 10. Títulos de anticuerpos en suero de ratones controles e inmunizados. (A) IgG. (B) IgG1. (C) IgG2a. (D) IgA sérica. Controles, PBS+alum y PBS+CFA. Los ratones del grupo rMEFS+alum se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.). rMEFS +CFA, se inmunizaron por vía intradérmica (i.d.) y el primer y segundo refuerzo se realizó en este grupo por vía subcutánea (s.c.) e i.m., respectivamente con adyuvante incompleto de Freund (IFA). El grupo rMEFS se inmunizó con la proteína rMEFS sola por vía intranasal (i.n.). Las últimas dos últimas inmunizaciones fueron administradas en los días 14 y 28. El título de anticuerpo se expresó como el promedio \pm desviación estándar (SD) del log₁₀ del recíproco de la última dilución sérica por encima del punto de corte. Los símbolos y letras indican diferencias estadísticas significativas con valores de $p < 0.0001$ comparado con el grupo ratones respectivos, # vs. PBS+CFA, a vs. PBS+alum. b vs. rMESF +alum, c vs. rMESF +CFA. PBS, phosphate-buffered saline. CFA, complete Freund's adjuvant.

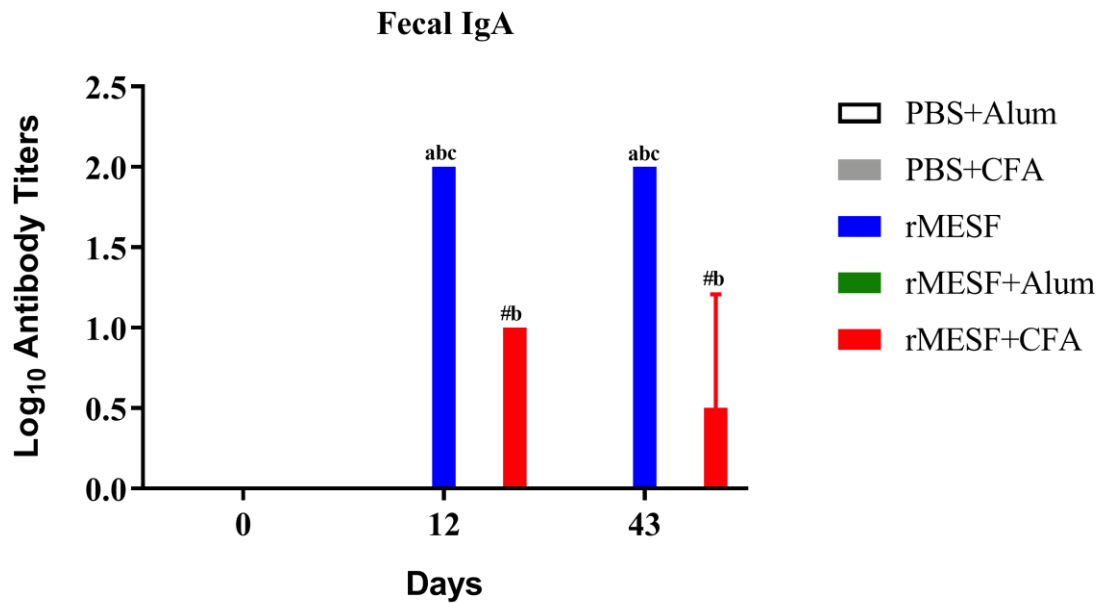


Figura 11. Título de anticuerpo de IgA fecal en ratones controles e inmunizados. Controles, PBS+alum y PBS+CFA. Los ratones del grupo rMEFS+alum se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.). rMEFS +CFA, se inmunizaron por vía intradérmica (i.d.) y el primer y segundo refuerzo se realizó en este grupo por vía subcutánea (s.c.) e i.m., respectivamente con adyuvante incompleto de Freund (IFA). El grupo rMEFS se inmunizó con la proteína rMEFS sola por vía intranasal (i.n.). Las últimas dos últimas inmunizaciones fueron administradas en los días 14 y 28. El título de anticuerpo se expresó como el promedio \pm desviación estándar (SD) del \log_{10} del recíproco de la última dilución sérica por encima del punto de corte. Los símbolos y letras indican diferencias estadísticas significativas con valores de $p < 0.0001$ comparado con el grupo ratones respectivos, # vs. PBS+CFA, a vs. PBS+alum, b vs. rMESF +alum, c vs. rMESF +CFA. PBS, phosphate-buffered saline. CFA, complete Freund's adjuvant.

5.4. La proteína quimérica multiepítipo rMESF induce un perfil de citoquinas

Se evaluó el perfil de citoquinas desde los esplenocitos cultivados con la proteína quimérica multiepítipo. Los niveles de IL-4 fueron significativamente diferentes ($p < 0,0001$) entre todos los grupos experimentales y comparados con los grupos controles negativos PBS+CFA y PBS+alum. Sin embargo, se encontraron bajos títulos de IL-4 en ratones

inmunizados por vía i.n. con la proteína sola rMESF, y los niveles mas altos se observaron en los ratones inmunizados con rMESF+alum y rMESF+CFA, respectivamente (Figura 12.A.). Con respecto al TNF- α , todos los grupos experimentales presentaron niveles de TNF- α significativamente mayores comparados con los controles ($p < 0,0001$, Figura 12.B.). Los títulos mas altos de TNF- α se observaron en los grupos de ratones inmunizados con rMESF sola y rMESF+alum, con diferencias significativas entre ellos ($p = 0,002$) y los ratones inmunizados con rMESF+CFA. Concerniente al IFN- γ y IL-17, estos incrementaron significativamente en todos los grupos experimentales comparado con los controles, PBS+CFA y PBS+alum ($p < 0,0001$ para INF- γ y $p = 0,03$ para IL-17), con valores similares en todos los grupos experimentales (Figura 12.C., Figura 12.D.).



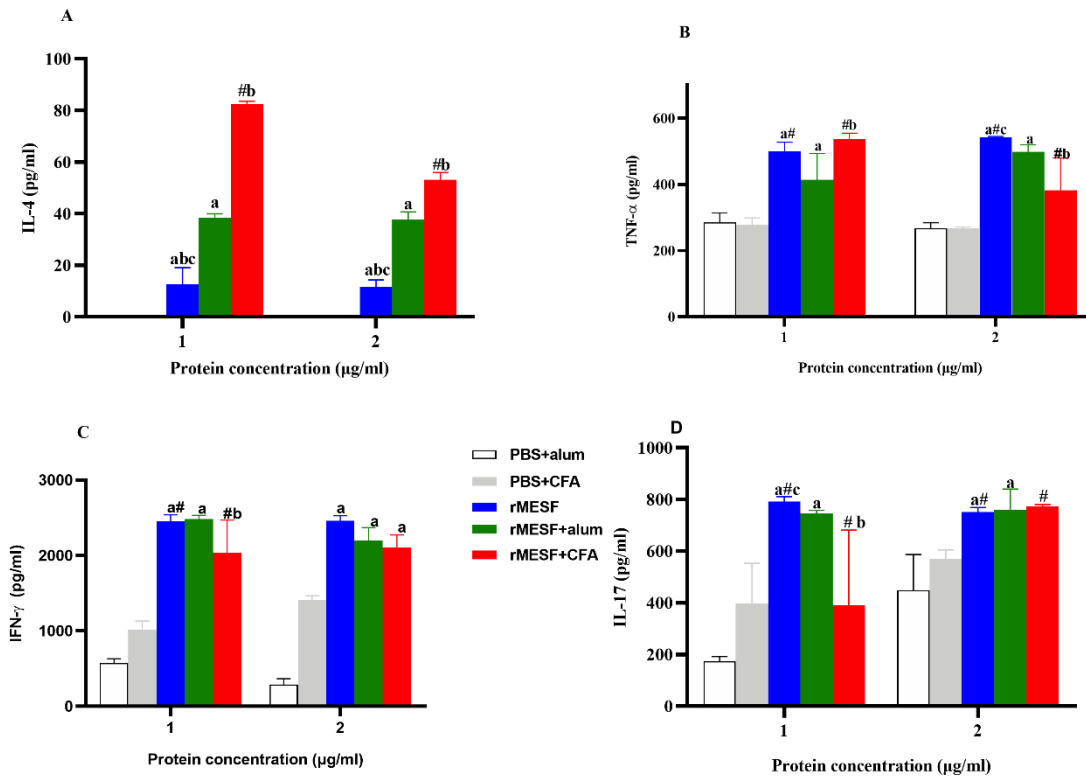


Figura 12. Niveles de citoquinas cuantificados con ELISA tipo sándwich. Producción de (A) IL-4, (B) TNF- α , (C) IL-17 y (D) IFN- γ , presentes en el sobrenadante de los esplenocitos estimulados *in vitro* con 1 ó 2 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína recombinante rMESF por 72 h. Los esplenocitos se colectaron después de 30 días de la última inmunización ($n = 5$ ratones/grupo). La absorbancia se midió a 450 nm. Los símbolos y letras indican diferencias estadísticas significativas con valores p entre <0.05 y 0.0001 (para mayor información dirjase al texto) comparado con el grupo de ratones respectivos. # vs. PBS+CFA, a vs. PBS+alum, b vs. rMESF+alum, c vs. rMESF+CFA. PBS, phosphate-buffered saline. CFA, complete Freund's adjuvant. Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar.

5.5. La proteína quimérica multiepítipo rMESF induce una fuerte respuesta linfoproliferativa

La respuesta linfoproliferativa fue evaluada en los esplenocitos proveniente de animales en estudio. Todos los grupos experimentales presentaron diferencias significativas entre ellos en la linfoproliferación contra la proteína multiepítipo y comparados con los controles

negativos respectivos ($p < 0,0001$), PBS+CFA y PBS+alum. Al estimular las células esplénicas con 1 ó 5 μg de la proteína recombinante, los mayores niveles de linfoproliferación se observan en los ratones inmunizados por vía i.n. con la proteína rMESF sola, seguido de los grupos ratones inmunizados con rMESF+CFA y rMESF+alum (Figura 13). No se observó respuesta linfoproliferativa en los grupos controles negativos.

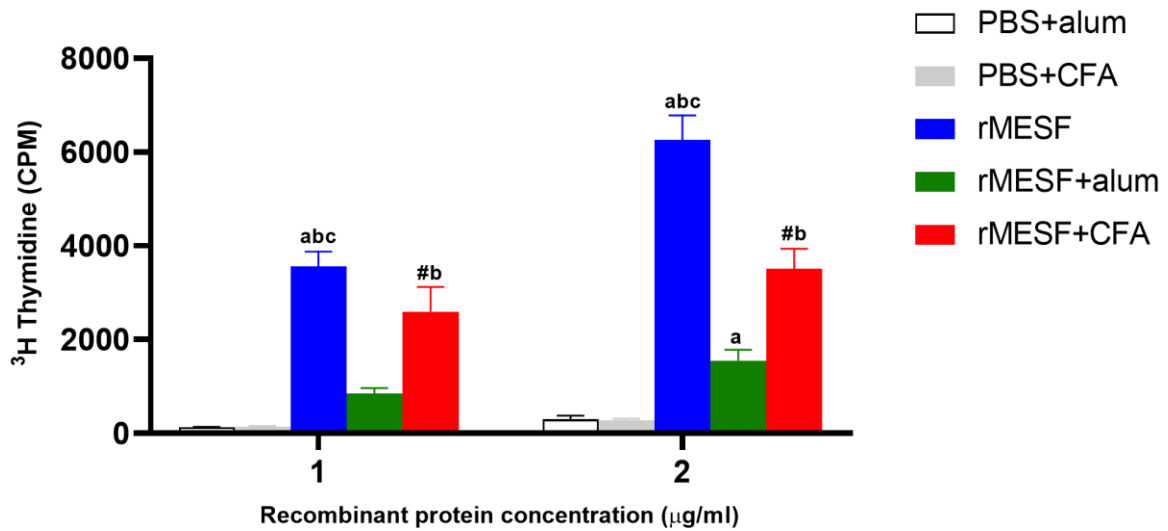


Figura 13. Linfoproliferación. Los esplenocitos se colectaron desde los ratones ($n = 5$ ratones/grupo) después de 30 días de la última inmunización y se estimularon *in vitro* con 1 $\mu\text{g/ml}$ ó 2 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína quimérica multipeptido rMESF. Los símbolos y letras indican diferencias estadísticas significativas con valores $p < 0.0001$ comparado con el grupo de ratones respectivos. # vs. PBS+CFA, a vs. PBS+alum, b vs. rMESF + alum, c vs. rMESF + CFA. PBS, phosphate-buffered saline. CFA, complete Freund's adjuvant. Los resultados son representados como el promedio \pm desviación estándar.

5.6. La proteína quimérica multiepítopo rMESF confiere respuesta protectora contra *Shigella flexneri* 2457T

La fuerte respuesta inmune humoral y el perfil de citoquinas se avalaron para una respuesta protectora a través del modelo de infección pulmonar contra *S. flexneri*. Las curvas Kaplan–Meier de supervivientes mostraron que el grupo de ratones inmunizados por vía i.m. con rMESF+alum provocaron un bajo porcentaje de protección, con 20% de supervivientes después del ensayo de protección. Por otro lado, el grupo de ratones inmunizados con rMESF+CFA mostró un porcentaje mayor a 60% de supervivientes después de la infección. Sin embargo, los mayores porcentajes de supervivientes se observaron en los grupos de ratones inmunizados por vía i.n. con rMESF sola, donde el 100% de los ratones sobrevivieron 30 días después del desafío (Figura 14.). Los ratones controles, PBS+CFA y PBS+alum, murieron antes de los primeros 5 días después del desafío.



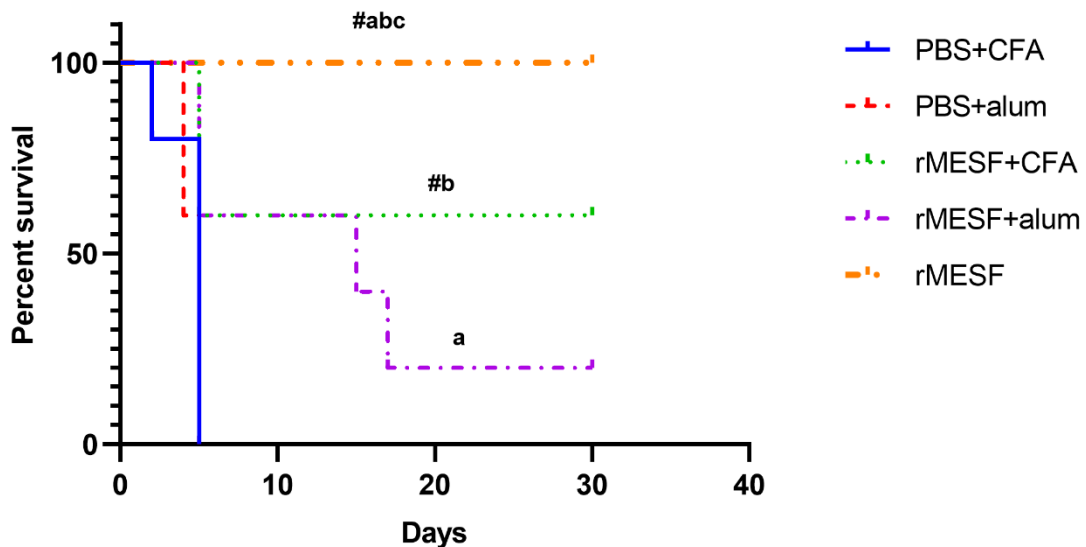


Figura 14. Eficacia protectora de la proteína quimérica multiepítopo rMESF en ratones. Los grupos de ratones hembras BALB/c ($n = 5$ ratones/grupo) se inmunizaron a través de diferentes rutas con $25 \mu\text{g}/\text{ratón}$ de rMESF. Treinta días después de la última inmunización, los ratones se desafiaron por vía i.n. con una dosis letal de *S. flexneri* de 1×10^7 UFC/ratón. Se observó la mortalidad por 30 días. Los símbolos y letras indican valores estadísticos significativos de $p < 0.0001$ comparado con el grupo de ratones respectivo. # vs. PBS+CFA, a vs. PBS+alum b vs. rMESF + alum, c vs. rMESF + CFA. PBS, phosphate-buffered saline. CFA, complete Freund's adjuvant. UFC, unidades formadoras de colonias. i.n., intranasal. La eficacia protectora fue presentada como curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

5.7. La carga bacteriana en pulmones disminuye en los ratones vacunados

Para evaluar la intervención de la proteína quimérica multiepítopo rMESF en la eliminación de *S. flexneri*, se realizó un estudio de la carga bacteriana en los pulmones de los ratones controles y los ratones supervivientes sometidos al desafío. Los grupos controles mostraron los valores más altos de UFC en los pulmones, mientras que todos los ratones supervivientes de los grupos experimentales, mostraron una disminución significativa en la

carga bacteriana ($p < 0.0001$; $< 1.3 \times 10^2$ UFC/ml) comparado con los grupos controles. Sin embargo, en los ratones inmunizados por vía i.n. con la proteína rMESF sola, se observa la carga bacteriana más baja en los pulmones, $< 10^2$ UFC/ml (Figura 15.).

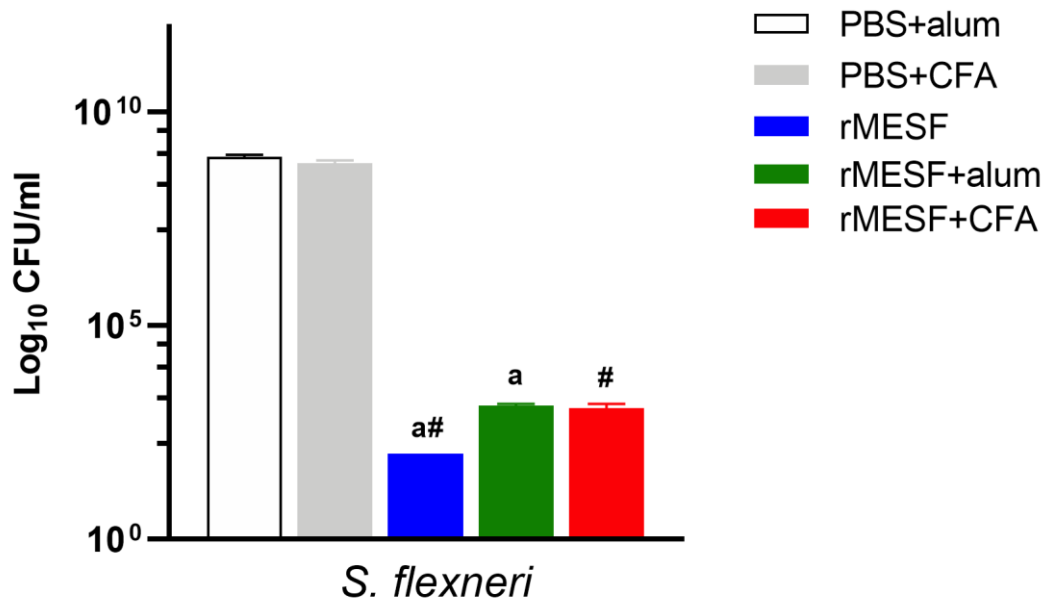


Figure 15. Carga bacteriana en pulmones después del ensayo de desafío en ratones controles e inmunizados. Los pulmones se colectaron de los ratones supervivientes y grupos controles 30 y 3 días después del desafío letal con *S. flexneri* (1×10^7 CFU/mouse), respectivamente. La carga bacteriana se determinó a través de diluciones 10 veces-seriadas y plaqueadas en agar LB a 37 °C por 18 h. Los símbolos y letras indican valores estadísticos significativos de $p < 0,0001$ comparado con el grupo control respectivo. # vs. PBS+CFA, a vs. PBS+alum. PBS, phosphate-buffered saline. CFA, complete Freund's adjuvant. UFC, unidades formadoras de colonias. i.n., intranasal.

5.8. Construcción y análisis conformacional de la mutante *S. flexneri* 2457TΔsap.

La cepa mutante *sap* construida a partir del método de desplazamiento alélico de Datsenko y Wanner (2000) se comprobaron vía PCR con cebadores internos y externos al casete del gen de kanamicina. La región eliminada del gen *sap* correspondió a la secuencia señal y al dominio pasajero (Figura 16.A.) y fue reemplazada por el gen de kanamicina. La electroforesis en gel de agarosa muestra las cepas positivas en las que se insertó correctamente el gen de kanamicina con un peso molecular de 1,3 kb (Figura 16.B.).

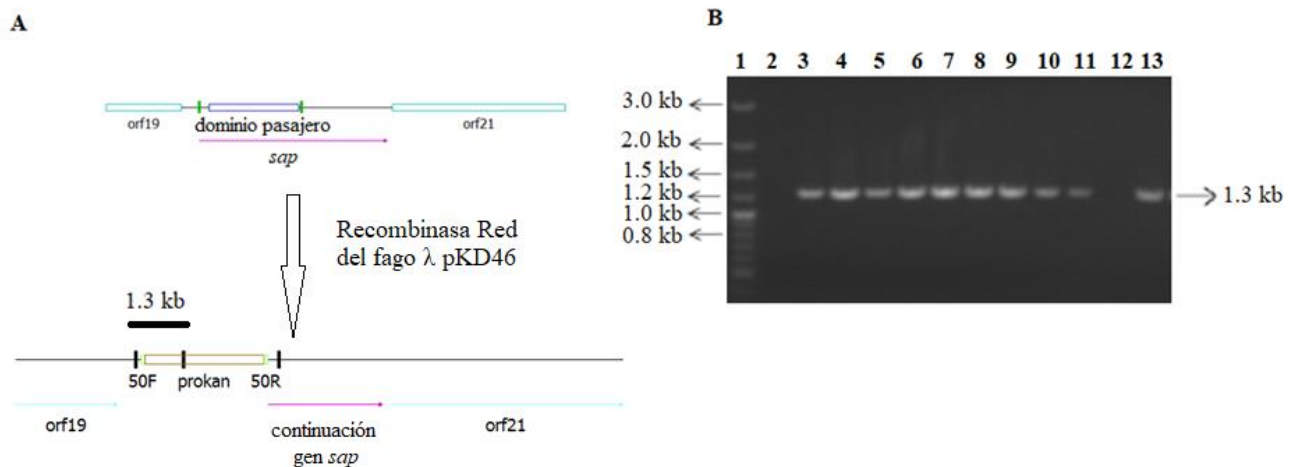


Figura 16. Construcción de la cepa mutante de *S. flexneri* 2457T 2a para el dominio pasajero del gen *sap* mediante intercambio alélico. A, Recombinación mediada por la recombinasa red del fago λ codificado en el vector pKD46 a través de las regiones homólogas entre las zonas flanqueantes del dominio secuencia señal-pasajero del gen *sap* y el gen de resistencia a kanamicina. Se observa la incorporación del gen de kanamicina delimitado por los cebadores 50F y 50R. B, electroforesis en gel de agarosa al 0,5 % de los amplicones por PCR de 1,3 kb de los clones seleccionados por resistencia a la kanamicina. 1, Marcador de peso molecular 3 kb. 2, *S. flexneri* 2457T. 3-11 y 13, clones positivos *sap:kan*. 12, falso positivo.

Luego, se realizaron curvas de crecimiento con cada uno de los clones *Δsap* y la cepa 2457T, en medio TBS en presencia y ausencia de sales de bilis al 0,4 %, esto a fin de analizar posibles diferencias metabólicas entre ellas. No se observaron diferencias significativas entre la cepa 2457T y la mutante *Δsap* en medio TBS solo (Figura 17). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticas significativas entre la cepa 2457T en medio TBS solo y las mutantes *Δsap* y 2457T cultivadas en TBS con sales de bilis ($p < 0,05-0,0001$).

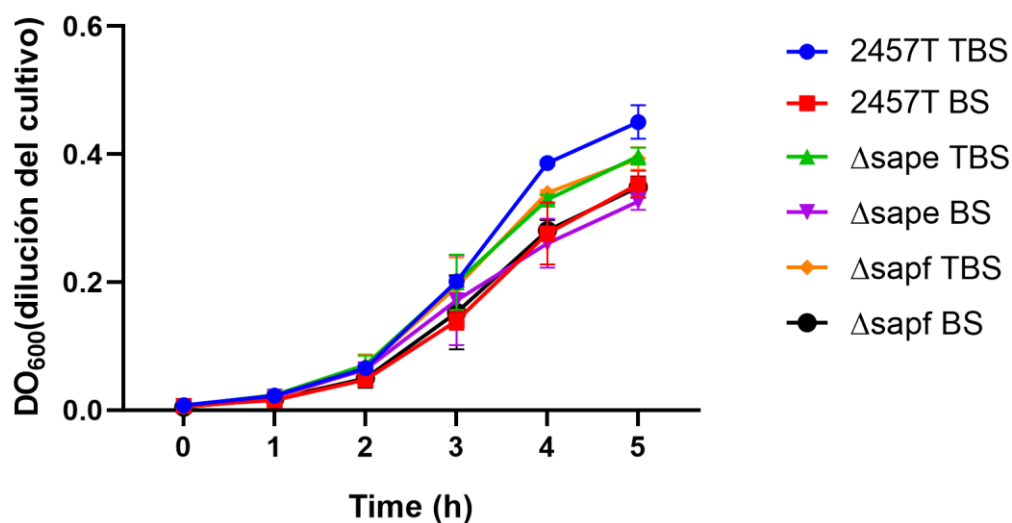


Figura 17. Curvas de crecimiento de cepas de *Shigella flexneri* 2457T y mutante *Δsap* en presencia y ausencia de sales de bilis. El crecimiento bacteriano se monitoreó en medio TBS con agitación constante en ausencia y presencia de sales de bilis al 0,4%. La DO₆₀₀ de la dilución del cultivo se midió durante cinco horas. Se muestra el promedio y la desviación estándar de la DO de tres experimentos independientes. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre la cepa 2457T en medio TBS solo y la mutante *Δsap* y 2457T cultivadas en TBS con sales de bilis con valores significativos $p < 0,05-0,0001$.

5.9. La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* en *S. flexneri* 2457T no interfiere en la formación de biopelículas

La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* de *S. flexneri* no mostró relación alguna con la formación de biopelícula en presencia y ausencia de sales de bilis. La formación de biopelículas detectado con cristal violeta y medidas a través de la DO₅₄₀, no mostraron diferencias significativas entre la cepa 2457T cultivadas en TBS solo o con sales de bilis al 0,4 % y la mutante Δ *sap* cultivada en las mismas condiciones luego de 3 y 4 horas de exposición a las sales, respectivamente (Figura 18).

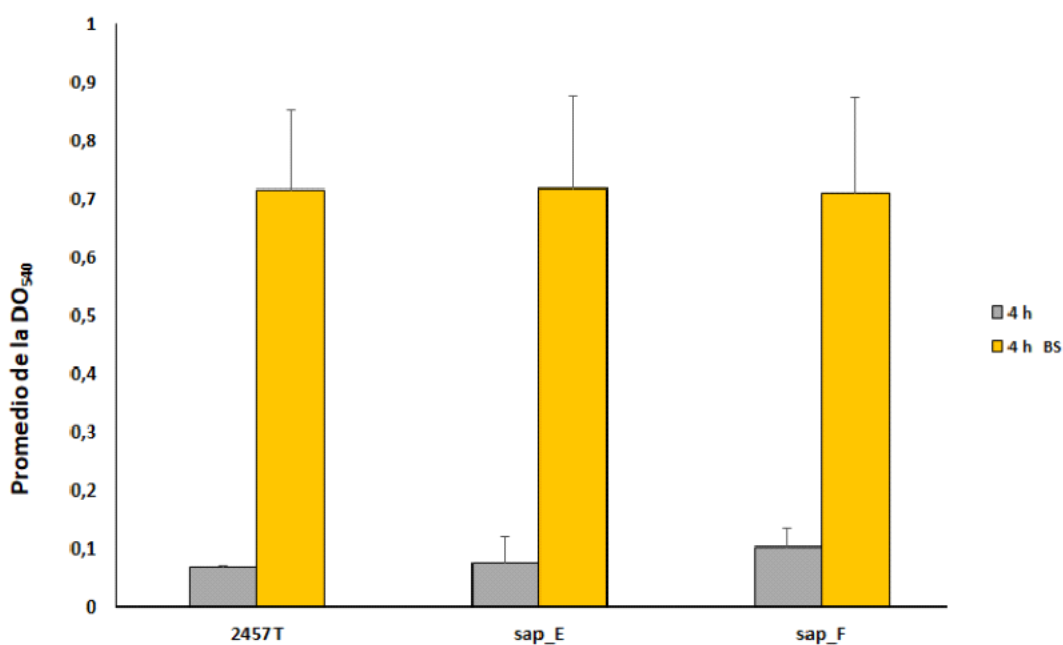


Figura 18. Cuantificación de la formación de biopelícula en sales de bilis. Una sola colonia de la cepa 2457T y la mutante Δ *sap* se inocularon en medio TBS en presencia y ausencia de sales de bilis al 0,4% y se cultivaron en condiciones estáticas a 37 °C durante 4 hrs y se tiñeron con cristal violeta. En el medio sin sales de bilis la formación de biopelículas fue mínima tanto en la cepa 2457T como en la mutante. Sin embargo, la formación de la biopelícula aumentó considerablemente en presencia de sales de bilis, sin diferencias significativas entre la cepa 2457T y los clones mutantes Δ *sap*_E y Δ *sap*_F.

5.10. La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* en *S. flexneri* 2457T afecta el mecanismo de autoagregación

La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* de *S. flexneri* 2457T afectó la autoagregación, visualizada a través de la aceleración de la formación este fenotipo. La cepa 2457T y los clones Δsap_E y Δsap_F en medio TBS en ausencia de sales de bilis, no mostraron el fenotipo de autoagregación medido a través de la DO_{600} durante 120 min. Sin embargo, en exposición a las sales de bilis, los clones mostraron autoagregación inmediata en los primeros 15 min, mientras que la cepa 2457T presentó autoagregación a los 45 min, siendo máxima a los 120 min. No se encontraron diferencias estadísticas significativas a los 120 min entre la cepa 2457T y los clones mutantes Δsap_E y Δsap_F (Figura 19).



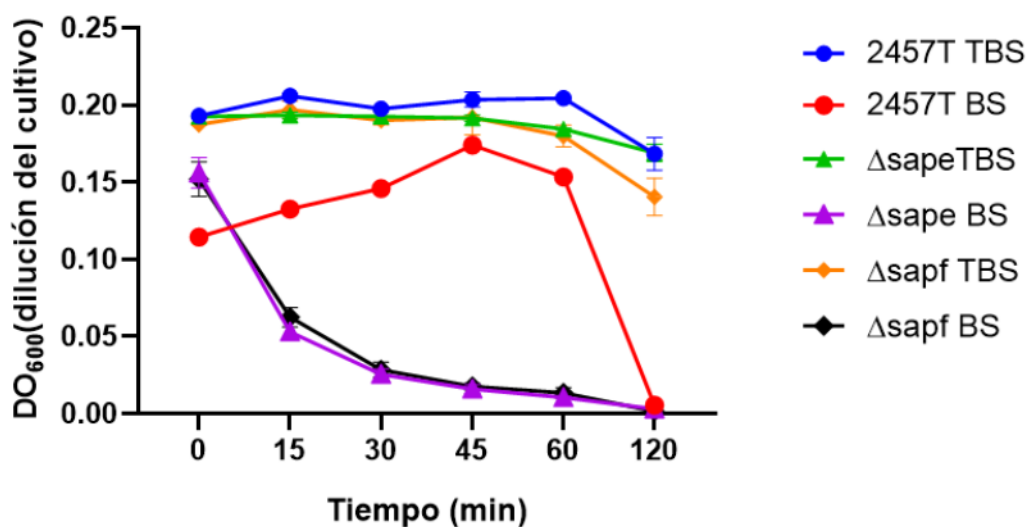


Figura 19. Análisis de la formación de autoagregación. Los cultivos de *S. flexneri* 2457T y los clones de las mutantes Δsap_E y Δsap_F se estandarizaron, se cultivaron en medio TBS en presencia y ausencia de sales de bilis al 0,4 % a 220 r.p.m. por 4 h, y se utilizaron para la evaluación de la autoagregación. Los resultados muestran los promedios de la dilución de la DO_{600} en diferentes tiempos. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre las mutantes y la cepa 2457T en TBS con sales de bilis a los 120 min.

5.11. La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* en *S. flexneri* 2457T afecta el mecanismo de adherencia de la bacteria a células HT-29

La eliminación del dominio pasajero del gen *sap* en *S. flexneri* 2457T no mostró aumento en el porcentaje de recuperación de bacterias cultivadas en sales de bilis en el ensayo de adherencia sobre células HT-29. El porcentaje de recuperación bacteriana fue mayor para la cepa 2457T en medio con sales de bilis (Figura 20). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación bacteriana de la cepa 2457T en medio con sales de bilis comparados con la cepa 2457T en medio TBS solo y los clones mutantes Δsap_E y Δsap_F en presencia y ausencia de sales de bilis. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación bacteriana

de la cepa 2457T en medio TBS comparado con los clones mutantes Δsap_E y Δsap_F , tanto en medio TBS solo como en medio con sales de bilis.

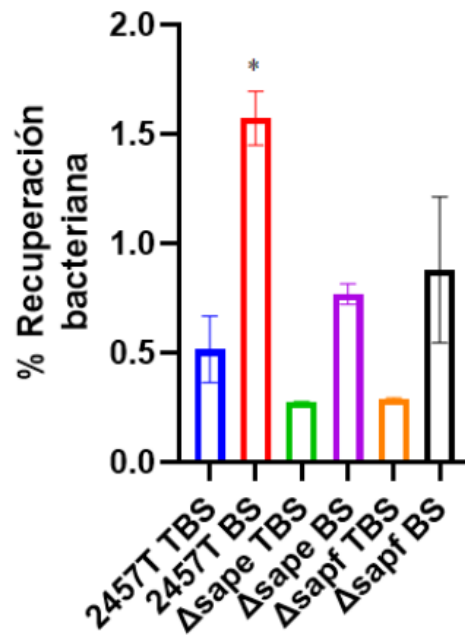


Figura 20. Adherencia de *S. flexneri* y mutante Δsap a células HT-29. Se cultivaron las células HT-29 en placas de cultivo con medio DMEM. Se inoculó una colonia de *S. flexneri* 2457T y de la mutante 2457T Δsap en medio TBS en presencia o ausencia de sales de bilis al 0,4 % con agitación constante de 220 r.p.m. a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,7. Luego, la suspensión bacteriana respectiva estandarizada se adicionó a la monocapa del cultivo celular por 3 h. Se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de bacterias asociadas a la adherencia celular. El porcentaje de recuperación promedio se calculó en tres experimentos independientes como: (título de bacterias recuperadas/ título de infección utilizado) X 100. La cepa 2457T presentó diferencias significativas (*, $p < 0,0001$) en medio con sales de bilis comparado con TBS solo. No se encontraron diferencias significativas entre la cepa 2457T en TBS solo comparado con la mutante en las dos condiciones evaluadas.

6. Discusión

Shigella spp. es un patógeno intracelular que causa la disentería bacilar a través de la invasión de las células epiteliales intestinales (Schnupf y Sansonetti, 2019). El proceso de virulencia, al igual que en otros patógenos intracelulares, es mediado por diferentes proteínas que pueden formar parte de la membrana externa de la bacteria o que pueden ser secretadas directamente en el citosol de la célula hospedera, a través de estructuras bien definidas como los sistemas de secreción (Lampel y col., 2018). La terapia actual contra la shigelosis es basada en antibióticos. Sin embargo, el incremento en el número de bacterias resistentes a antibióticos conlleva a la búsqueda de nuevas alternativas, como es el desarrollo de vacunas en contra del mayor agente causal de shigelosis, *S. flexneri*. Muchos estudios están enfocados en proteínas localizadas en la superficie bacteriana, que están presentes en diferentes serotipos de *Shigella* (Martinez-Becerra y col., 2013; Chitradevi y col., 2015). Las vacunas de tipo subunidades son usadas en varios estudios de laboratorio, pero tienen la desventaja de producir una pobre inducción de la inmunidad (De Groot y col., 2009). Por esta razón, el uso de adyuvantes unidos a este tipo de vacunas incrementa la probabilidad de “entrega” de los antígenos a las células dendríticas y en consecuencia el mejoramiento de la respuesta inmune (Perrie y col., 2008; Liu y col., 2008; Farhadi y col., 2016). El uso de adyuvantes en estudios *in silico* de vacunas está incrementando y muchos de esos estudios están enfocados en el desarrollo de constructos multiepítomos contra bacterias y virus (Negaharipour y col., 2018; Hajighahramani y col., 2019).

Las HSPs son chaperonas que interactúan con los TLR e inducen la estimulación de la respuesta inmune innata (Vabulas y col., 2001). Además, estas proteínas son muy versátiles y multifuncionales debido a la amplia variedad de ligando a los que están

asociados y sus diferencias estructurales. En el caso de las HSP60, interactúan con los TLR2, TLR4 o las moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*), enlazando las respuestas inmunes innata y adaptativa (Argueta y col., 2006). Conjuntamente, otras proteínas de *S. flexneri*, como la proteína mayor de membrana externa de 34 kDa (MOMP, *major outer membrane protein*) y la proteína A de membrana externa (OmpA, *outer membrane protein A*) están involucradas en la activación de los TLR2 en macrófagos y la subsecuente inducción del factor nuclear de translocación NF- κ B y la secreción de citoquinas proinflamatorias (Pore y col., 2011, 2012). Por ende, resalta la importancia del uso de agonistas de los TLRs en el desarrollo de vacunas contra *Shigella*.

La eficacia y el uso de GroEL como adyuvante, el cual desencadena una respuesta inmune humoral y celular, es una herramienta en el diseño de vacunas (Panchanathan y col., 1998; Chitradevi y col., 2013, 2016). La proteína GroEL de *S. Typhi*, se ha utilizado en un estudio de diseño de vacuna *in silico* contra *Klebsiella pneumoniae*, lo que representa una ventana abierta para su uso en otras cepas bacterianas (Farhadi y col., 2015). En nuestro estudio, se utilizó la proteína GroEL de *S. Typhi* debido a que ésta ha sido evaluada en ratones como adyuvante en un candidato vaccinal (IpaB-GroEL) contra la shigelosis en un desafío letal frente a *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei* (Chitradevi y col., 2016). *Shigella* spp., por ser un patógeno intracelular que invade el epitelio intestinal a través de la ruta oral, requiere el diseño de vacunas que contengan epítomos que estimulen tanto la respuesta inmune humoral como la innata. Muchas investigaciones sustentan la inducción de la respuesta inmune humoral en una infección causada por *Shigella* o la activación de los linfocitos T, especialmente los T-CD4, Th1, Th2 y Th17, los cuales juegan un papel crucial en la erradicación de la infección por *Shigella*, por lo que se destaca la importancia de la

selección de epítomos para células B y linfocitos colaboradores HTL en el diseño de vacunas contra éste patógeno (Agnello y col., 2003; Mukhopadhaya y col., 2006; Farhani y col., 2019). Además, está documentado que el IFN-gamma liberado por los Th1 interviene en la eliminación de patógenos intracelulares (Dhanda y col., 2013); por lo tanto, el énfasis de incluir epítomos inductores de la liberación de IFN-gamma en el diseño de vacunas contra *Shigella* (Farhani y col., 2019).

En el presente estudio, se realizó un diseño “*in silico*” de una vacuna multiepítomo basada en la selección de epítomos para células B y T unidos a la proteína GroEL de *S. Typhi*, con la propiedad de inducir una fuerte respuesta inmune y de protección contra *S. flexneri*. La búsqueda de epítomos antigénicos se llevó a cabo en tres proteínas autotransportadoras de *S. flexneri*, localizadas en la isla de patogenicidad SHI-1, donde la mayoría de sus marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) permanecen sin caracterizar y algunos de ellos se conservan en varias especies de *Shigella* (Jin, 2002). Una característica del dominio pasajero de los autotransportadores, es su exposición al ambiente externo o la secreción por la bacteria, lo que incrementa la posibilidad de una interacción temprana con algunos elementos del sistema inmune (Oany et al., 2017). Además, el rol de los autotransportadores en la virulencia e interacción con la célula hospedera los hacen clasificarlos como “blancos” para el diseño de nuevas vacunas (Wells y col., 2007). En este estudio se seleccionaron dos autotransportadores (SigA y Pic), como se mencionó anteriormente, estas proteínas están relacionadas con algún mecanismo de virulencia de *Shigella* y son descritos como proteínas antigénicas (Henderson y col., 1999; Navarro-García y col., 2010; Rajakumar y col., 1997). Además, se seleccionó la proteína Sap debido a que su secuencia de aminoácidos está relacionada con un 87 % de identidad con el

autotransportador Ag43 *E. coli*, involucrado con los mecanismos de adherencia, agregación, formación de biopelículas y evasión del sistema inmune (Van der Woude y Henderson, 2008). Por lo explicado, estas tres proteínas mencionadas son candidatos elegibles para el diseño de una vacuna en la erradicación de la shigelosis.

Los tres autotransportadores seleccionados de *S. flexneri* se han descrito en importantes patógenos responsables de infecciones a nivel intestinal y del tracto urinario, como también en sepsis y el síndrome hemolítico urémico, lo que posibilita la evaluación de nuestro candidato vaccinal contra otros microorganismos. Pic, se encuentra en *E. coli* Enteroagregativa y Uropatogénica (EAEC/UPEC), *E. coli* Enteroagregativa-productora de toxina shiga (O104:H4) y *Shigella flexneri* 2a (Heimer y col., 2004; Navarro-García y col., 2010; Ruiz-Pérez y col., 2011; Munera y col., 2014; Abreu y col., 2015). El autotransportador SigA, se encuentra en *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. dysenteriae* y la cepa de *E. coli* O104:H4 (Nave y col., 2016; Oany y col., 2017). Sap, como se mencionó está con Ag43 que se encuentra en patógenos como EAEC y UPEC (Mendez-Arancibia y col., 2008; Zalewska-Pia y col., 2015).

El esqueleto principal del candidato vaccinal se ensambló a través de pequeñas secuencias llamadas *linkers*, que son esenciales en el mantenimiento estructural y funcional de la proteína multiepitopo (Chen y col., 2013; Aurora y col., 1997, Le-Barillec y col., 2005). La secuencia EAAAK, reduce interferencia con otras proteínas y mejora la separación, GSGS es una secuencia que brinda flexibilidad y finalmente, las secuencias AAY y HEYGAEALERAG mejoran la presentación antigénica a las moléculas MHC (Livingston y col., 2002; Nezafat y col., 2014; Farhadi y col., 2015). Por lo tanto, todos los análisis bioinformáticos indicaron que nuestro candidato vaccinal es altamente antigénico y

podría inducir una fuerte respuesta inmune humoral y celular, la cual es importante en la prevención y tratamiento de la enfermedad. Además, los parámetros fisicoquímicos como el alto índice alifático, mostraron la estabilidad de la proteína en un amplio rango de temperaturas. La vida media del constructo se estimó en ser más de 10 h en *E. coli*, lo que denota alta probabilidad de producción y purificación de la proteína a gran escala, y concuerda con los valores CAI y G/C del gen optimizado. El punto isoeléctrico (pI) menor a 7 indicó mejor uso la proteína en estudios fisiológicos.

El modelo estructural 3D se realizó, y se seleccionó el mejor modelo con el concomitante refinamiento indicado por los resultados del Prosa-web y Ramachandran plot. Estos análisis permitieron la minimización de energía y el subsecuente estudio *in silico* de interacción o *docking* entre el receptor y el ligando. Los receptores tipo toll (*TLRs*, *Toll-like receptors*) son estructuras moleculares bien conservadas que se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPs*, *pathogen-associated molecular patterns*) y promueven la activación de la respuesta inmune innata, lo que incrementa la inmunogenicidad contra el patógeno (Duthie y col., 2011; Negahdaripour y col., 2018). Por esta razón, la región hidrofóbica de la proteína quimérica multiepítopo y la región de alta frustración del TLR2 se seleccionaron para el análisis de interacción como está descrito por Nezafat y col. (2014) y Hajighahramani y col. (2017). Este análisis indicó interacción a través de las regiones evaluadas lo cual está en concordancia con lo descrito para las interacciones TLR2-ligando (Kang y col., 2009; Hajighahramani y col., 2017). En este sentido, el estudio de simulación dinámica molecular (MDS) del complejo receptor-ligando, mostró que nuestro candidato vaccinal es muy estable durante 100 ns con una clara

región de interfase o interacción entre los aminoácidos 250–285 del TLR2, y una región de interacción desde los residuos 540 al 660 de aminoácidos del constructo vaccinal.

La expresión, purificación y evaluación del constructo vaccinal se llevó a cabo con el fin de definir el tipo de respuesta inmune producida por el constructo en un modelo murino que luego sería desafiado frente a *S. flexneri*. Un candidato vaccinal exitoso contra *Shigella* requiere de la inducción de una respuesta inmune celular, la cual juega un rol esencial en la eliminación de esta bacteria a través de la secreción de mediadores proinflamatorios desde células del sistema inmune innato y el incremento de células T CD8⁺ y de los niveles de citoquinas liberadas por CD4⁺, que incrementan a su vez la producción de anticuerpos (Martinez-Becerra y col., 2013; Chitradevi y col., 2015). Además, la ruta de administración, el adyuvante y la dosis de la vacuna administrada están correlacionados con la efectividad de la misma (Bansal y col., 2010). En este estudio, la respuesta inmune humoral se indujo durante y después del proceso de inmunización por diferentes rutas, medidos a través de la producción de IgG, IgG1 e IgG2a, las cuales presentaron un fuerte incremento en todos los grupos experimentales. Sin embargo, los ratones inmunizados a través de la ruta i.n. mostraron un incremento levemente retardado en los niveles de inmunoglobulinas G comparados con los obtenidos a través de otras rutas de inmunización. Algunos candidatos a vacunas han conferido altos niveles de protección en ratones contra *Shigella* por medio del concomitante incremento de los títulos de los isotipos IgG1 y IgG2a (Chitradevi y col., 2015; 2016), tal como es mostrado en el candidato vaccinal presentado en nuestro estudio. Sin embargo, los niveles de IgA sistémica y de mucosa incrementaron en todos los grupos experimentales, presentando los mayores títulos de IgA en los ratones inmunizados por la ruta i.n. Estos resultados apoyan

el uso de la ruta i.n. para la vacunación contra *Shigella*, al mismo tiempo que induce la respuesta inmune sistémica y de mucosa (Chitradevi y col., 2015; Chitradevi y col., 2016; Pasetti y col., 2020). En este contexto, la IgA sistémica se incrementa en pacientes infectados con *Shigella* (Islam y col., 1995), mientras que los niveles de IgG e IgA incrementan también en pacientes que adquirieron naturalmente inmunidad contra *Shigella* (Islam y col., 1995; Islam y col., 1997). La IgA de mucosas es considerada una de las mayores inmunoglobulinas cruciales en la eliminación de *Shigella*, como en la prevención de la reinfección (Pasetti y col., 2020). Por tal razón, la inducción de este anticuerpo es clave en la protección del hospedero debido a que la IgA contra el LPS y otros antígenos de *Shigella* interfieren con la invasión de la bacteria en el intestino, y la IgG facilita la muerte mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis de *Shigella* (Pasetti y col., 2020).

En la infección por *Shigella*, varias citoquinas y la población de células T son activadas en el hospedero. La citoquina IL-4, en conjunto con citoquinas proinflamatorias de las células Th1 y Th2, se han encontrado extensivamente secretadas en biopsias del recto provenientes de pacientes adultos con shigelosis con cuadros agudos y convalecientes que presentan inflamación severa de las mucosas (Raqib y col., 1995). En nuestro trabajo, la secreción de IL-4 varió significativamente en todos los grupos experimentales, con los niveles más bajos encontrados en los ratones inmunizados a través de la ruta i.n. Estos resultados concuerdan con los estudios acerca del efecto de adyuvantes en la respuesta inmune contra *S. Typhi*, donde los niveles de IL-4 en ratones disminuyen cuando GroEL es usado solo, en comparación cuando es acompañado del adyuvante CFA o el adyuvante de aluminio (Bansal y col., 2010). Desde este punto, puede ser interesante conocer el nivel exacto necesario de IL-4 para una vacuna efectiva contra *Shigella* y el rol central de IL-4 en

la protección del hospedero. Adicionalmente, las células produjeron altos niveles de IFN- γ en todos los grupos experimentales, lo que es un indicativo de la infección por *Shigella* (Le-Barillec y col., 2005; Martínez-Becerra y col., 2013; Nag y col., 2015; Chitradevi y col., 2016). El IFN- γ inducido por nuestro candidato vaccinal indicó una fuerte respuesta de linfocitos Th1, los cuales inducen la producción de IgG2a por las células murinas plasmáticas (Finkelman y col., 1988). Esta citoquina se ha observado incrementada en las heces y el plasma de pacientes convalecientes comparados con pacientes adultos que presentan infección aguda, lo que sugiere el papel fundamental del IFN- γ en la eliminación de *Shigella*, siendo esencial en el desarrollo de una respuesta inmune de protección contra la shigelosis (Raqib y col., 1995).

La segunda citoquina con los niveles más altos fue la IL-17, que incrementó en todos los grupos experimentales. Esta citoquina es producida principalmente por las células Th17 las cuales están relacionadas con la eliminación de patógenos en tejidos de las mucosas (Curtis y Way 2009; Ishigame y col., 2009) y es considerado un buen indicador de la eficacia protectora de una vacuna (Martínez-Becerra y col., 2013). En ratones, la infección aguda con *S. flexneri* induce una respuesta dominante de células Th17, lo que indica un rol importante en la respuesta inmune secundaria que restringe el crecimiento bacteriano después de la reinfección en este modelo animal (Sellge y col., 2010). Finalmente, la producción de TNF- α , una citoquina asociada a la inmunidad por Th1 se encontró altamente elevada en todos los grupos (Kisuya y col., 2019). Sin embargo, el rol del TNF- α en la respuesta inmune contra *Shigella* no es claro, lo que representa un campo abierto en la investigación de la protección del hospedero contra este patógeno.

Interesantemente, en este estudio, la respuesta linfoproliferativa fue mayor en ratones inmunizados por la ruta i.n. con la proteína rMESF sola. Estos resultados indican que la misma proteína recombinante tiene diferentes efectos dependiendo de la ruta de inmunización y el adyuvante usado. La respuesta linfoproliferativa más baja se encontró en ratones inmunizados por vía i.m. con rMESF+alum, lo cual concuerda con otros estudios que reportaron una prominente inducción Th2 por GroEL+alum que presentó la respuesta linfoproliferativa más baja (Cribbs y col., 2003; Bansal y col., 2010). El cambio de fenotipo de Th2 a Th1 se evidencia con la mayor respuesta de linfoproliferación y niveles de IFN- γ en los ratones inmunizados con rMESF sola o rMESF+CFA, comparado con la encontrada en los esplenocitos aislados del grupo de ratones inmunizados con rMESF+alum. El mecanismo de protección contra *Shigella* no está claro, pero la activación de la respuesta inmune de mucosas está relacionada con la neutralización de la bacteria, previniendo la adhesión y la subsiguiente invasión de las células epiteliales del hospedero (Chitradevi y col., 2015).

La inmunización con HSP como adyuvante en una proteína quimérica frente al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o contra *Shigella*, induce ambas respuestas inmunes, tanto humoral como celular (Suzue y col., 1996; Chitradevi y col., 2016). Estas observaciones demostraron que las vacunas diseñadas con la proteína GroEL como adyuvante, convergen en un alto título en los niveles de IgG1 e IgG2a o citoquinas asociadas con la respuesta inmune Th1 y Th2, y además de la capacidad inmunogénica protectora frente a *Shigella* (Chitradevi y col., 2015; 2016).

La protección del hospedero frente a patógenos intracelulares requiere en gran medida de una respuesta dominante de células Th1. Esto ha sido demostrado con *S. Typhi*,

una bacteria intracelular, a través de la inmunización en ratones con adyuvante alum y GroEL, en los que se evidenció inducción predominante de células Th2 asociado con los menores porcentajes de supervivencia después del desafío (Bansal y col., 2010). En el presente estudio se observaron resultados similares en los ratones inmunizados con rMESF+alum y rMESF+CFA, en los que se encontraron los niveles más altos de IL-4. Pese a eso, la baja secreción de IL-4, no debe ser considerada como una “huella” en la protección frente a *Shigella* debido a que los ratones inmunizados rMESF+CFA secretaron altos niveles de IL-4 y mejores porcentajes de protección comparados con los encontrados en los ratones inmunizados con rMESF+alum. Sin embargo, los ratones inmunizados por vía i.n. presentaron 100 % de protección, además de los mayores niveles en los títulos de IgA de secreción, indicando un efecto positivo de esta ruta de inmunización en la protección frente a *Shigella*. Sumado a lo anterior descrito, el uso de GroEL como adyuvante evita los efectos secundarios causados por otros adyuvantes comerciales como es la excesiva inflamación, artritis, y otros efectos tóxicos del CFA presentados en primates (Broderson, 1989; Bennett y col., 1992; Bansal y col., 2010), y tiene ventaja sobre el adyuvante alum ya que solo éste estimula la respuesta inmune humoral (Allison y Byars 1991). También, la inmunización por vía i.n. en *Shigella* ofrece la oportunidad de inducir una fuerte respuesta inmune local y sistémica, como ocurre en una exposición natural a la bacteria (Pasetii y col., 2020). La protección conferida por el candidato vaccinal se evidenció en la carga bacteriana encontrada en el tejido pulmonar, que mostró un mejoramiento en la eliminación de *S. flexneri*, reduciendo las unidades formadoras de colonias (UFC) en todos los ratones supervivientes vacunados a través de las diferentes rutas ya mencionadas comparado con los controles. Sin embargo, tal como se esperaba, la menor carga UFC se encontró en los ratones inmunizados a través de la ruta i.n., $<10^2$

UFC/ml. La disminución de la carga bacteria de *Shigella* en los pulmones de los ratones inmunizados por vía i.n. está relacionado con altos niveles de protección contra *Shigella* spp. (Chitradevi y col., 2015; 2016).

En resumen, el presente estudio mostró que la inmunización de los ratones con rMESF sola o en combinación con adyuvantes induce ambas armas del sistema inmune, tanto la vía humoral como la respuesta inmune mediada por células. El porcentaje de protección conferido por rMESF+alum (i.m.), rMESF+CFA (s.c.) y rMESF sola (i.n.) es de 20, 60, y 100 %, respectivamente. Las diferencias encontradas en la eficacia protectora se atribuyeron a la naturaleza de la respuesta inmune y la ruta de administración. Este es el primer estudio completo *in vivo* y de desafío usando una mezcla de epítomos de proteínas autotransportadoras conservadas en *Shigella* unidas a la proteína GroEL en una vacuna recombinante contra *S. flexneri*. Los resultados sugieren que la producción de esta vacuna recombinante sin ningún adyuvante puede ser efectiva en la prevención de la shigelosis causada por *S. flexneri*. Sin embargo, debido a la presencia de las proteínas autotransportadoras SigA, Pic, y Sap en *Shigella* spp. y otras *E. coli* patogénicas de importancia, la eficacia protectora de amplio espectro de nuestra vacuna debe ser evaluada.

Finalmente, esta última parte de la discusión será dedicada a los resultados concerniente a la mutación del gen de la proteína Sap, la que, como se indicó previamente, está relacionada con un 87 % de identidad con el autotransportador Ag43 de *E. coli*. El Ag43 está involucrado con los mecanismos de adherencia, agregación, formación de biopelículas y evasión del sistema inmune (Van der Woude y Henderson, 2008). Debido a esto se esperaba que la proteína Sap de *S. flexneri* estuviese involucrada en dichos mecanismos, por lo que se realizaron ensayos de autoagregación, formación de biopelículas

y adherencia en ausencia y presencia de sales de bilis, ya que las sales de bilis son una importante señal fisiológica en la activación de los genes de virulencia de *S. flexneri* 2457T, incluyendo los mecanismos evaluados en este estudio (Nickerson y col., 2017). Hasta la fecha la proteína Sap permanece sin caracterizar, por lo que estos primeros ensayos representan una ventana en el estudio de dicha proteína, su relación con la virulencia de *S. flexneri* y su uso como blanco terapéutico. Las curvas de crecimiento tanto de la mutante Δsap como de la cepa salvaje 2457T en medio TBS solo, indicaron que la ausencia de la proteína Sap no produce diferencias metabólicas por lo que fue posible la realización de los subsiguientes ensayos de caracterización.

La formación de biopelículas en *S. flexneri* es incrementada por la exposición a las sales de bilis, el cual es un mecanismo de resistencia para muchas bacterias patógenas (Nickerson y col., 2017). En la formación de las biopelículas es característico la adherencia a superficie, formación de la matriz de exopolisacáridos, resistencia a los antimicrobianos como los antibióticos, radiación UV, y estrés por cambios de pH (Gupta y col., 2016). En el presente estudio se evaluó la relación de la proteína Sap, específicamente del dominio pasajero del autotransportador, con la formación de biopelículas. No se encontró evidencia alguna en la disminución de la formación de biopelícula en las bacterias mutantes expuestas a las sales de bilis. Lo que conlleva a inferir que la proteína Sap no está relacionada con el mecanismo de formación de biopelícula en *S. flexneri*, como el Ag43 en *E. coli* Uropatogénica (Van der Woude y Henderson, 2008). Sin embargo, la extensión del tiempo en el ensayo de formación de biopelícula se requiere para una conclusión final del rol de Sap en la formación del fenotipo.

El mecanismo de autoagregación es un fenotipo presentado en *S. flexneri* en la presencia de sales de bilis (Nickerson y col., 2017). En el presente estudio no se encontró diferencia alguna entre la mutante Δsap con la cepa salvaje 2457T en presencia de sales de bilis al finalizar el ensayo. Sin embargo, la velocidad con la que se presentó el fenotipo de autoagregación en la mutante fue mayor en los primeros minutos del ensayo comparado con la cepa 2457T. Lo que podría indicar que otros genes relacionados con este fenotipo están siendo sobreexpresados debido a la eliminación de la proteína Sap. Sin embargo, esta hipótesis debe ser contrastada con un análisis de la expresión de genes en la cepa mutante. Nuestro estudio indicó que la proteína Sap no está relacionada directamente con el mecanismo de autoagregación tal como se ha descrito para el Ag43 en *E. coli* (Van der Woude y Henderson, 2008).

Shigella utiliza diversas proteínas para adherirse a las células epiteliales y originar la subsiguiente invasión celular. Este mecanismo de adherencia es expresado en presencia de las sales de bilis, que inducen la expresión de los genes de las proteínas OspE1 y OspE2 localizadas en la membrana externa en la que funcionan como adhesinas (Faherty y col., 2012; Nickerson y col., 2017). En el presente trabajo, los resultados indican que la proteína Sap podría estar relacionada con la inducción del mecanismo de adherencia, ya que el porcentaje de recuperación de bacterias mutantes del gen *sap* inducidas con sales de bilis, mostraron diferencias significativas muy por debajo del porcentaje de recuperación comparado con la cepa salvaje 2457T.

Finalmente, a pesar del porcentaje de identidad de 87 % que presenta la secuencia de amino ácidos de la proteína Sap con el Ag43 de *E. coli*, la evidencia indica que la proteína Sap no está involucrada en la formación de biopelícula ni en el mecanismo de

autoagregación. Sin embargo, se deben realizar nuevos ensayos con mayor tiempo en la formación de la biopelícula y extenderlo a modelos organoides. Por otro lado, al igual que el Ag43, la proteína Sap puede afectar la adherencia. A pesar de los resultados obtenidos en esta primera caracterización, la construcción de la cepa complementada fue imposible de obtener, y se requiere de ésta para resultados concluyentes en la caracterización de Sap, así como de la evaluación en otros mecanismos de virulencia como la invasión y dispersión celular.

Como reflexiones finales y evaluaciones futuras, en términos generales se debe seguir el estudio del candidato vaccinal construido, especialmente en la evaluación del espectro de protección frente a otros serotipos de *Shigella* y *E. coli*. Además de la evaluación del conjunto de poblaciones celulares que son inducidas por el constructo vaccinal y desafío en otros modelos animales. En el caso de la caracterización del gen Sap, aunado a lo recomendado anteriormente, sería importante evaluar la virulencia de la mutante en un ensayo de infección pulmonar en ratones.

7. Conclusiones

Shigella flexneri es un patógeno intracelular estricto que se transmite al ser humano principalmente por la ruta fecal-oral y causa la disentería bacilar a través de la invasión de las células epiteliales del colon. Una vacuna efectiva contra este patógeno requiere de la utilización de proteínas de la bacteria, como los autotransportadores, que naturalmente quedan expuestas al sistema inmune y pueden inducir inmunidad innata, humoral y celular, y además están conservadas a lo largo de los serogrupos de *Shigella*. Por lo tanto, el estudio de los autotransportadores ofrece blancos terapéuticos útiles en el diseño de vacunas. Aunado a ello, el uso de adyuvantes como las proteínas de choque térmico HSP, incrementan el potencial de la respuesta inmune. El estudio y la utilización de autotransportadores permitió concluir:

- I. Los dominios pasajeros de los autotransportadores SigA, Pic y Sap poseen regiones *in silico* con epítomos altamente inmunodominantes y antigénicos.
- II. La incorporación de GroEL a la vacuna diseñada permitió la interacción *in silico* con el TLR2.
- III. La proteína quimérica multiepítopo rMESF induce una fuerte respuesta inmune humoral-celular y de protección frente a *S. flexneri*.
- IV. La activación de la inmunidad de mucosas medidas a través de la IgA evidencian el papel de esta inmunoglobulina en la eliminación de *S. flexneri*.
- V. El diseño de la vacuna multiepítopo basada en autotransportadores y en GroEL como adyuvante administrados por vía intranasal, favorece la inducción de inmunidad protectora contra *S. flexneri*.

VI. El autotransportador Sap no está involucrado en el mecanismo de autoagregación.



8. Referencias bibliográficas

Abreu, A. G., Fraga, T. R., Granados Martínez, A. P., Kondo, M. Y., Juliano, M. A., Juliano, L., y Elias, W. P. (2015). The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. *The Journal of infectious diseases*, 212(1), 106-115.

Allison, A. C., & Byars, N. E. (1991). Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular immunology*, 28(3), 279-284.

Al-Hasani, K., Henderson, I. R., Sakellaris, H., Grant, T., Nataro, J. P., Adler, B., Henderson, I. A. N. R., y cols. (2000) The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect Immun*, 68: 2457–2463.

Al-Hasani, K., Adler, B. E. N., Rajakumar, K., y Sakellaris, H. (2001) Distribution and structural variation of the she pathogenicity island in enteric bacterial pathogens. *J Med Microbiol*, 50: 780–786.

Al-Hasani, K., y Navarro-García, F. (2009) The immunogenic SigA enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a binds to HEp-2 cells and induces fodrin redistribution in intoxicated epithelial cells. *PloS One*, 4: e8223.

Agnello, D., Lankford, C. S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J. J., y Frucht, D. M. (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *Journal of clinical immunology*, 23(3), 147-161.

Andree, M., Seeger, J. M., Schüll, S., Coutelle, O., Wagner-Stippich, D., Wiegmann, K. y Fritsch, M. (2014). BID-dependent release of mitochondrial SMAC dampens XIAP-mediated immunity against *Shigella*. *The EMBO journal*, 33(19), 2171-2187.

Ablasser, A., Schmid-Burgk, J. L., Hemmerling, I., Horvath, G. L., Schmidt, T., Latz, E., y Hornung, V. (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature*, 503(7477), 530.

Argueta, J. G. M., Shiota, S., Yamaguchi, N., Masuhiro, Y., y Hanazawa, S. (2006). Induction of Porphyromonas gingivalis GroEL signaling via binding to Toll-like receptors 2 and 4. *Oral microbiology and immunology*, 21(4), 245-251.

Ashida, H., Kim, M., & Sasakawa, C. (2014). Manipulation of the host cell death pathway by *Shigella*. *Cellular microbiology*, 16(12), 1757-1766.

Ashida, H., Mimuro, H., y Sasakawa, C. (2015). *Shigella* manipulates host immune responses by delivering effector proteins with specific roles. *Frontiers in immunology*, 6.

Ashkenazi, S., Passwell, J. H., Harlev, E., Miron, D., Dagan, R., Farzan, N., y Robbins, J. B. (1999). Safety and immunogenicity of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2a O-specific polysaccharide conjugates in children. *The Journal of infectious diseases*, 179(6), 1565-1568.

Aurora, R., Creamer, T. P., Srinivasan, R., y Rose, G. D. (1997). Local interactions in protein folding: lessons from the α -helix. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), 1413-1416.

- Bansal, A., Paliwal, P. K., Sagi, S. S., y Sairam, M. (2010). Effect of adjuvants on immune response and protective immunity elicited by recombinant Hsp60 (GroEL) of *Salmonella typhi* against *S. typhi* infection. *Molecular and cellular biochemistry*, 337(1-2), 213-221.
- Bennett, B., Check, I. J., Olsen, M. R., y Hunter, R. L. (1992). A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *Journal of immunological methods*, 153(1-2), 31-40.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.
- Berge, A., Kihlberg, B. M., Sjöholm, A. G., y Björck, L. (1997). Streptococcal protein H forms soluble complement-activating complexes with IgG, but inhibits complement activation by IgG-coated targets. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20774-20781.
- Bhasin, M., y Raghava, G. P. S. (2007). A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes. *Journal of biosciences*, 32(1), 31-42.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., y Sansonetti, P. (1999). The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *The Journal of cell biology*, 147(3), 683-693.
- Broderson, J. R. (1989). A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Laboratory animal science*, 39(5), 400-405.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. A., y Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187-217.

Broz, P., y Monack, D. M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 551-565.

Brusic, V., Rudy, G., y Harrison, L. C. (1998). MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1997. *Nucleic Acids Research*, 26(1), 368-371.

Buus, S., Lauemøller, S. L., Worning, P., Kesmir, C., Frimurer, T., Corbet, S., y Brunak, S. (2003). Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee artificial neural network approach. *HLA*, 62(5), 378-384.

Capone, S., Zampaglione, I., Vitelli, A., Pezzanera, M., Kierstead, L., Burns, J., y Ercole, B. B. (2006). Modulation of the immune response induced by gene electrotransfer of a hepatitis C virus DNA vaccine in nonhuman primates. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7462-7471.

Castellani, A., y Chambers, A. J. (1919). *Manual of tropical medicine*. William Wood. New York.

Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., y Valvano, M. A. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, 4(7), 702.

Cherry, J. D., Gornbein, J., Heininger, U., y Stehr, K. (1998). A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*, 16(20), 1901-1906.

Chen, X., Zaro, J. L., y Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*, 65(10), 1357-1369.

Chitradevi, S. T. S., Kaur, G., Singh, K., Sugadev, R., y Bansal, A. (2013). Recombinant heat shock protein 60 (Hsp60/GroEL) of *Salmonella enterica* serovar Typhi elicits cross-protection against multiple bacterial pathogens in mice. *Vaccine*, 31(16), 2035-2041.

Chitradevi, S. T. S., Kaur, G., Uppalapati, S., Yadav, A., Singh, D., y Bansal, A. (2015). Co-administration of rIpaB domain of *Shigella* with rGroEL of *S. Typhi* enhances the immune responses and protective efficacy against *Shigella* infection. *Cellular & molecular immunology*, 12(6), 757-767.

Chitradevi, S. T. S., Kaur, G., Sivaramakrishna, U., Singh, D., y Bansal, A. (2016). Development of recombinant vaccine candidate molecule against *Shigella* infection. *Vaccine*, 34(44), 5376-5383.

Cohen, D., Ashkenazi, S., Green, M., Lerman, Y., Slepon, R., Robin, G., ... & Shiloach, J. (1996). Safety and immunogenicity of investigational *Shigella* conjugate vaccines in Israeli volunteers. *Infection and immunity*, 64(10), 4074-4077.

Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004). ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W96-W99.

Cribbs, D. H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N., y Agadjanyan, M. G. (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with β -amyloid. *International immunology*, 15(4), 505-514.

Curtis, M. M., y Way, S. S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 126(2), 177-185.

Cutter, D., Mason, K. W., Howell, A. P., Fink, D. L., Green, B. A., y St. Geme III, J. W. (2002). Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. *The Journal of infectious diseases*, 186(8), 1115-1121.

Datsenko, K. A., y Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.

Dautin, N. y Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in Gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 89–112.

Dautin, N. (2010). Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins*, 2(6), 1179-1206.

De Groot, A. S., Moise, L., McMurry, J. A., y Martin, W. (2009). Epitope-based Immunome-derived vaccines: a strategy for improved design and safety. In *Clinical applications of immunomics* (pp. 39-69). Springer, New York, NY.

De Silva, D. G., Mendis, L. N., Sheron, N., Alexander, G. J., Candy, D. C., Chart, H., y Rowe, B. (1993). Concentrations of interleukin 6 and tumour necrosis factor in serum and stools of children with *Shigella dysenteriae* 1 infection. *Gut*, 34(2), 194-198.

Dhanda, S. K., Vir, P., y Raghava, G. P. (2013). Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biology direct*, 8(1), 30.

Doytchinova, I. A., y Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*, 8(1), 4.

DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B., y Formal, S. B. (1989). Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *The Journal of infectious diseases*, 159(6), 1126-1128.

Duthie, M. S., Windish, H. P., Fox, C. B., y Reed, S. G. (2011). Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews*, 239(1), 178-196.

Dutta, S., Rajendran, K., Roy, S., Chatterjee, A., Dutta, P., Nair, G. B., y Yoshida, S. I. (2002). Shifting serotypes, plasmid profile analysis and antimicrobial resistance pattern of *shigella* strains isolated from Kolkata, India during 1995–2000. *Epidemiology & Infection*, 129(2), 235-243.

Egile, C., Loisel, T. P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P. J., y Carlier, M. F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *The Journal of cell biology*, 146(6), 1319-1332.

Escalona, E., Sáez, D., y Oñate, A. (2017). Immunogenicity of a Multi-epitope DNA Vaccine encoding epitopes from Cu–Zn superoxide Dismutase and Open reading Frames of *Brucella abortus* in Mice. *Frontiers in immunology*, 8, 125.

Faherty, C. S., Redman, J. C., Rasko, D. A., Barry, E. M., y Nataro, J. P. (2012). *Shigella flexneri* effectors OspE1 and OspE2 mediate induced adherence to the colonic epithelium following bile salts exposure. *Molecular microbiology*, 85(1), 107-121.

Farfán, M.J. y Torres, A.G. (2012) Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*, 80: 903-913.

Farhadi, T., Nezafat, N., Ghasemi, Y., Karimi, Z., Hemmati, S., y Erfani, N. (2015). Designing of complex multi-epitope peptide vaccine based on omps of *Klebsiella pneumoniae*: an in silico approach. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 21(3), 325-341.

Farhadi, T., Ovchinnikov, R. S., y Ranjbar, M. M. (2016). In silico designing of some agonists of toll-like receptor 5 as a novel vaccine adjuvant candidate. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 5(1), 31.

Farhani, I., Nezafat, N., & Mahmoodi, S. (2019). Designing a novel multi-epitope peptide vaccine against pathogenic *Shigella* spp. based immunoinformatics approaches. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(2), 541-553.

Fasano, A., Noriega, F. R., Maneval Jr, D. R., Chanasongcram, S., Russell, R., Guandalini, S., y Levine, M. M. (1995). *Shigella enterotoxin 1*: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 95(6), 2853.

Fasano, A., Noriega, F. R., Liao, F. M., Wang, W., y Levine, M. M. (1997). Effect of *Shigella enterotoxin 1* (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo. *Gut*, 40(4), 505-511.

Ferrero, R. L., Thiberge, J. M., Kansau, I., Wuscher, N., Huerre, M., y Labigne, A. (1995). The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6499-6503.

Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R., y Coffman, R. L. (1988). IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *The Journal of Immunology*, 140(4), 1022-1027.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., y Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). Humana press.

GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388 (10053), 1459–1544.

Girardin, S. E., Tournebise, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., y Philpott, D. J. (2001). CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO reports*, 2(8), 736-742.

Gómez, L., Llanos, J., Escalona, E., Sáez, D., Álvarez, F., Molina, R., y Oñate, A. (2017). Multivalent fusion DNA vaccine against *Brucella abortus*. *BioMed research international*, 2017.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., y Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology*, 198(1), 1-15.

Gutiérrez, D., Pardo, M., Montero, D., Oñate, A., Farfán, M. J., Ruiz-Pérez, F., y Vidal, R. (2015). TleA, a Tsh-like autotransporter identified in a human enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Infection and immunity*, 83(5), 1893-1903.

Ha, N. Y., Sharma, P., Kim, G., Kim, Y., Min, C. K., Choi, M. S., y Cho, N. H. (2015). Immunization with an autotransporter protein of *Orientia tsutsugamushi* provides protective immunity against scrub typhus. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003585.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., y Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*, 23(6), 1089-1097.

Hajighahramani, Nasim, y col., (2017). Immunoinformatics analysis and in silico designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 48, p. 83-94.

Hajighahramani, N., Eslami, M., Negahdaripour, M., Ghoshoon, M. B., Dehshahri, A., Erfani, N., y Ghasemi, Y. (2019). Computational design of a chimeric epitope-based vaccine to protect against *Staphylococcus aureus* infections. *Molecular and cellular probes*, 46, 101414.

Hale, T. L., y Keusch, G. T. (1996). *Shigella*. In *Medical Microbiology*. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston.

Hamilton-West, C., Prado, V., Hormazábal, J. C., Lagos, R., Benadof, D., Mendoza, C., y Hernández, M. (2007). Epidemiología clínica y molecular de las infecciones por *Shigella* spp en niños de la Región Metropolitana durante el verano 2004-2005. *Revista médica de Chile*, 135(11), 1388-1396.

Heiman K., Bowen A. Shigellosis [Internet]. Centers for Diseases Control-Travelers'Health; 2013 [citado Nov 25 2014].

<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/shigellosis>.

Heimer, S. R., Rasko, D. A., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., y Mobley, H. L. (2004). Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and immunity*, 72(1), 593-597.

Henderson, I. R., y Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and immunity*, 69(3), 1231-1243.

Henderson, I. R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., y Nataro, J. P. (1999). Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 67(11), 5587-5596.

Hendrick, J. P., y Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual review of biochemistry*, 62(1), 349-384.

Huang, Z., Sutton, S. E., Wallenfang, A. J., Orchard, R. C., Wu, X., Feng, Y., ... & Alto, N. M. (2009). Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics. *Nature structural & molecular biology*, 16(8), 853.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., y Foster, S. J. (2003). Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2 implications for crohn' s disease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5509-5512.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., y Sudo, K. (2009). Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 30(1), 108-119.

Islam, D., Bardhan, P. K., Lindberg, A. A., y Christensson, B. (1995). *Shigella* infection induces cellular activation of T and B cells and distinct species-related changes in peripheral blood lymphocyte subsets during the course of the disease. *Infection and immunity*, 63(8), 2941-2949.

Islam, D., Veress, B., Bardhan, P. K., Lindberg, A. A., y Christensson, B. (1997). Quantitative assessment of IgG and IgA subclass producing cells in rectal mucosa during shigellosis. *Journal of clinical pathology*, 50(6), 513-520.

Izard, T., Van Nhieu, G. T., y Bois, P. R. (2006). *Shigella* applies molecular mimicry to subvert vinculin and invade host cells. *The Journal of cell biology*, 175(3), 465-475.

Jenik, M., Parra, R. G., Radusky, L. G., Turjanski, A., Wolynes, P. G., y Ferreiro, D. U. (2012). Protein frustratometer: a tool to localize energetic frustration in protein molecules. *Nucleic acids research*, 40(W1), W348-W351.

Jennison, A. V., y Verma, N. K. (2004). *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 43-58.

Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., y Zhang, X. (2002). Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic acids research*, 30(20), 4432-4441.

Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., y Lee, J. O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130(6), 1071-1082.

Kaminski, R. W., y Oaks, E. V. (2009). Inactivated and subunit vaccines to prevent shigellosis. *Expert review of vaccines*, 8(12), 1693-1704.

Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S. J., Ryu, Y. H., Mah, S., y Lee, J. O. (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, 31(6), 873-884.

Karlsson, M. S., Bowen, A., Reporter, R., Folster, J. P., Grass, J. E., Howie, R. L., y Whichard, J. M. (2013). Outbreak of infections caused by *Shigella sonnei* with reduced susceptibility to azithromycin in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1559-1560.

Kasper, C. A., Sorg, I., Schmutz, C., Tschon, T., Wischnewski, H., Kim, M. L., y Arrieumerlou, C. (2010). Cell-cell propagation of NF- κ B transcription factor and MAP kinase activation amplifies innate immunity against bacterial infection. *Immunity*, 33(5), 804-816.

Kayath, C. A., Hussey, S., Nagra, K., Philpott, D., y Allaoui, A. (2010). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy requires binding to cholesterol through the type III effector, IcsB. *Microbes and infection*, 12(12), 956-966.

Kelly, D. F., y Rappuoli, R. (2005). Reverse vaccinology and vaccines for serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Advances in experimental medicine and biology*, 568, 217.

Killackey, S. A., Sorbara, M. T., y Girardin, S. E. (2016). Cellular aspects of *Shigella* pathogenesis: focus on the manipulation of host cell processes. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6.

Kisuya, J., Chemtai, A., Raballah, E., Keter, A., & Ouma, C. (2019). The diagnostic accuracy of Th1 (IFN- γ , TNF- α , and IL-2) and Th2 (IL-4, IL-6 and IL-10) cytokines response in AFB microscopy smear negative PTB-HIV co-infected patients. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Klade, C. S. (2002). Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. *Current opinion in molecular therapeutics*, 4(3), 216-223.

Korber, B., LaBute, M., y Yusim, K. (2006). Immunoinformatics comes of age. *PLoS Computational Biology*, 2(6), e71.

Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., et al., (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ.* 77 (8), 651–666.

Kozakov, D., Hall, D. R., Beglov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., Shen, Y., y Vajda, S. (2010). Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13–19. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(15), 3124-3130.

Kozyreva, V. K., Jospin, G., Greninger, A. L., Watt, J. P., Eisen, J. A., y Chaturvedi, V. (2016). Recent outbreaks of shigellosis in California caused by two distinct populations of *Shigella sonnei* with either increased virulence or fluoroquinolone resistance. *Msphere*, 1(6).

Kweon, M. N. (2008). Shigellosis: the current status of vaccine development. *Current opinion in infectious diseases*, 21(3), 313-318.

Lampel, K. A., Formal, S. B., y Maurelli, A. T. (2018). A Brief History of *Shigella*. *EcoSal Plus*, 8(1).

Larsen, J. E., Lund, O., y Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*, 2(1), 2.

Larsen, M. V., Lundegaard, C., Lamberth, K., Buus, S., Lund, O., y Nielsen, M. (2007). Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC bioinformatics*, 8(1), 424.

Le-Barillec, K., Magalhaes, J. G., Corcuff, E., Thuizat, A., Sansonetti, P. J., Phalipon, A., y Di Santo, J. P. (2005). Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *The Journal of Immunology*, 175(3), 1735-1740.

Lindler, L. E., y Hayes, J. M. (1994). Nucleotide sequence of the Salmonella typhi *groEL* heat shock gene. *Microbial pathogenesis*, 17(4), 271-275.

Liu, X., Wetzler, L. M., y Massari, P. (2008). The PorB porin from commensal *Neisseria lactamica* induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant. *Vaccine*, 26(6), 786-796.

Livingston, B., Crimi, C., Newman, M., Higashimoto, Y., Appella, E., Sidney, J., & Sette, A. (2002). A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5499-5506.

Livio, S., Strockbine, N. A., Panchalingam, S., Tennant, S. M., Barry, E. M., Marohn, M. E., y Oundo, J. O. (2014). *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clinical Infectious Diseases*, 59(7), 933-941.

López, J. A., Weilenman, C., Audran, R., Roggero, M. A., Bonelo, A., Tiercy, J. M., y Corradin, G. (2001). A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte immune response in humans. Implications for vaccination strategies. *European journal of immunology*, 31(7), 1989-1998.

Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall III, W. B., De Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., y Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50(3), 437-450.

Lowrie, D. B., Silva, C. L., Colston, M. J., Ragno, S., & Tascon, R. E. (1997). Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*, 15(8), 834-838.

Mallett, C. P., VanDeVerg, L., Collins, H. H., y Hale, T. L. (1993). Evaluation of *Shigella* vaccine safety and efficacy in an intranasally challenged mouse model. *Vaccine*, 11(2), 190-196.

Mandic-Mulec, I., Weiss, J., y Zychlinsky, A. (1997). *Shigella flexneri* is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed. *Infection and immunity*, 65(1), 110-115.

Magnan, C. N., Randall, A., y Baldi, P. (2009). SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, 25(17), 2200-2207.

Mantis, N., Prévost, M. C., y Sansonetti, P. (1996). Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. *Infection and immunity*, 64(7), 2474-2482.

Marteyn, B., West, N., Browning, D., Cole, J., Shaw, J., Palm, F., y Tang, C. (2010). Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*, 465(7296), 355.

Martinez-Becerra, F. J., Scobey, M., Harrison, K., Choudhari, S. P., Quick, A. M., Joshi, S. B., y Picking, W. L. (2013). Parenteral immunization with IpaB/IpaD protects mice against lethal pulmonary infection by *Shigella*. *Vaccine*, 31(24), 2667-2672.

Mendez-Arancibia, E., Vargas, M., Soto, S., Ruiz, J., Kahigwa, E., Schellenberg, D., y Vila, J. (2008). Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78(6), 985-989.

Ministerio de Salud de Chile. Departamento de Epidemiología. Informe de brotes de diarrea por *Shigella sonnei*, Diciembre – Mayo del 2009. [Internet] [citado 2014 Dic 5] Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/BrotesShigellasonnei.pdf>

Moss, J. E., Cardozo, T. J., Zychlinsky, A., y Groisman, E. A. (1999). The selC-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Molecular microbiology*, 33(1), 74-83.

Mukhopadhyaya, A., Mahalanabis, D., y Chakrabarti, M. K. (2006). Role of *Shigella flexneri* 2a 34áKDa outer membrane protein in induction of protective immune response. *Vaccine*, 24(33-34), 6028-6036.

Munera, D., Ritchie, J. M., Hatzios, S. K., Bronson, R., Fang, G., Schadt, E. E., y Waldor, M. K. (2014). Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4. *Nature communications*, 5(1), 1-9.

Nag, D., Sinha, R., Mitra, S., Barman, S., Takeda, Y., Shinoda, S., y Koley, H. (2015). Heat killed multi-serotype *Shigella* immunogens induced humoral immunity and protection against heterologous challenge in rabbit model. *Immunobiology*, 220(11), 1275-1283.

Navarro-García, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., y Nataro, J. P. (1999). Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 67(5), 2184-2192.

Navarro-Garcia, F., Gutierrez-Jimenez, J., Garcia-Tovar, C., Castro, L. A., Salazar-Gonzalez, H., & Cordova, V. (2010). Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the *Enterobacteriaceae* family, is a potent mucus secretagogue. *Infection and immunity*, 78(10), 4101-4109.

Nave, H. H., Mansouri, S., Emaneini, M., y Moradi, M. (2016). Distribution of genes encoding virulence factors and molecular analysis of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhea in Kerman, Iran. *Microbial pathogenesis*, 92, 68-71.

Nezafat, N., Ghasemi, Y., Javadi, G., Khoshnoud, M. J., y Omidinia, E. (2014). A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: an in silico approach. *Journal of theoretical biology*, 349, 121-134.

Negahdaripour, M., Nezafat, N., Eslami, M., Ghoshoon, M. B., Shoolian, E., Najafipour, S., y Ghasemi, Y. (2018). Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. *Infection, Genetics and Evolution*, 58, 96-109.

Nezafat, N., Karimi, Z., Eslami, M., Mohkam, M., Zandian, S., y Ghasemi, Y. (2016). Designing an efficient multi-epitope peptide vaccine against *Vibrio cholerae* via combined

immunoinformatics and protein interaction based approaches. *Computational biology and chemistry*, 62, 82-95.

Nickerson, K. P., Chanin, R. B., Sistrunk, J. R., Rasko, D. A., Fink, P. J., Barry, E. M., y Faherty, C. S. (2017). Analysis of *Shigella flexneri* resistance, biofilm formation, and transcriptional profile in response to bile salts. *Infection and immunity*, 85(6).

Nickerson, K. P., y Faherty, C. S. (2018). Bile salt-induced biofilm formation in enteric pathogens: techniques for identification and quantification. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (135), e57322.

Nygren, B., y Bowen, A. (2013). *Shigella*. In *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press, pp. 217-222.

Oaks, E. V., Wingfield, M. E., y Formal, S. B. (1985). Plaque formation by virulent *Shigella flexneri*. *Infection and immunity*, 48(1), 124-129.

Oany, A. R., Pervin, T., Mia, M., Hossain, M., Shahnaaj, M., Mahmud, S., y Kibria, K. M. (2017). Vaccinomics Approach for Designing Potential Peptide Vaccine by Targeting *Shigella* spp. Serine Protease Autotransporter Subfamily Protein SigA. *Journal of immunology research*, 2017, vol. 2017.

Ochiai, K., Kurita-Ochiai, T., Kamino, Y., y Ikeda, T. (1993). Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *Journal of medical microbiology*, 39(3), 183-190.

Pahil, S., Taneja, N., Ansari, H. R., y Raghava, G. P. S. (2017). In silico analysis to identify vaccine candidates common to multiple serotypes of *Shigella* and evaluation of their immunogenicity. *PloS one*, 12(8), e0180505.

Panchanathan, V., Naidu, B. R., Devi, S., Di Pasquale, A., Mason, T., y Pang, T. (1998). Immunogenic epitopes of *Salmonella typhi* GroEL heat shock protein reactive with both monoclonal antibody and patients sera. *Immunology letters*, 62(2), 105-109.

Paliwal, P. K., Bansal, A., Sagi, S. S., Mustoori, S., & Govindaswamy, I. (2008). Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of *Salmonella enterica* serovar Typhi and its role in protective immunity against lethal *Salmonella* infection in mice. *Clinical Immunology*, 126(1), 89-96.

Pasetti, M. F., Venkatesan, M. M., y Barry, E. M. (2020). Oral *Shigella* Vaccines. In *Mucosal Vaccines* (pp. 515-536). Academic Press.

Payne, S. M., Wyckoff, E. E., Murphy, E. R., Oglesby, A. G., Boulette, M. L., y Davies, N. M. (2006). Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals*, 19(2), 173-180.

Philpott, D.J., Yamaoka, S., Israel, A. and Sansonetti, P.J. (2000). Invasive *Shigella flexneri* activates NF- κ B through a lipopolysaccharide dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.*, 165, 903–914.

Perrie, Y., Mohammed, A. R., Kirby, D. J., McNeil, S. E., y Bramwell, V. W. (2008). Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International journal of pharmaceuticals*, 364(2), 272-280.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., y Freudenberg, M. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088.

Pore, D., Mahata, N., Pal, A., y Chakrabarti, M. K. (2011). Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a, induces protective immune response in a mouse model. *PloS one*, 6(7), e22663.

Pore, D., Mahata, N., y Chakrabarti, M. K. (2012). Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a links innate and adaptive immunity in a TLR2-dependent manner and involvement of IL-12 and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12589-12601.

Phalipon, A., y Sansonetti, P. J. (2007). *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?. *Immunology and cell biology*, 85 (2).

Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., y Jacobson, R. M. (2009). Application of pharmacogenomics to vaccines. *Pharmacogenomics*, 10(5), 837-852.

Puhar, A., Tronchère, H., Payrastra, B., Van Nhieu, G. T., y Sansonetti, P. J. (2013). A *Shigella* effector dampens inflammation by regulating epithelial release of danger signal ATP through production of the lipid mediator PtdIns5P. *Immunity*, 39(6), 1121-1131.

Rajakumar, K., Sasakawa, C., y Adler, B. (1997). Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infection and immunity*, 65(11), 4606-4614.

Ravenscroft, N., Braun, M., Schneider, J., Dreyer, A. M., Wetter, M., Haeuptle, M. A., y Carranza, P. (2019). Characterization and immunogenicity of a *Shigella flexneri* 2a O-antigen bioconjugate vaccine candidate. *Glycobiology*, 29(9), 669-680.

Raqib, R., Lindberg, A. A., Wretling, B., Bardhan, P. K., Andersson, U. L. F., y Andersson, J. A. N. (1995). Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infection and immunity*, 63(1), 289-296.

Raymond, B., Young, J. C., Pallett, M., Endres, R. G., Clements, A., y Frankel, G. (2013). Subversion of trafficking, apoptosis, and innate immunity by type III secretion system effectors. *Trends in microbiology*, 21(8), 430-441.

Restieri, C., Garriss, G., Locas, M.C. y Dozois, C. M. (2007) Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol*, 73: 1553–1562.

Robinson, H. L., y Amara, R. R. (2005). T cell vaccines for microbial infections. *Nature medicine*, 11, S25-S32.

Roehrich, A. D., Martinez-Argudo, I., Johnson, S., Blocker, A. J., y Veenendaal, A. K. (2010). The extreme C terminus of *Shigella flexneri* IpaB is required for regulation of type III secretion, needle tip composition, and binding. *Infection and immunity*, 78(4), 1682-1691.

Rasolofo-Razanamparany, V., Cassel-Beraud, A. M., Roux, J., Sansonetti, P. J., y Phalipon, A. (2001). Predominance of serotype-specific mucosal antibody response in *Shigella flexneri*-infected humans living in an area of endemicity. *Infection and immunity*, 69(9), 5230-5234.

Ruiz-Pérez, F., Wahid, R., Faherty, C. S., Kolappaswamy, K., Rodriguez, L., Santiago, A., Murphy, E., y cols. (2011) Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and

pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci*, 108: 12881-12886.

Saha, S., y Raghava, G. P. S. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(1), 40-48.

Salam, M. A., Dhar, U., Khan, W. A., y Bennish, M. L. (1998). Randomised comparison of ciprofloxacin suspension and pivmecillinam for childhood shigellosis. *The Lancet*, 352(9127), 522-527.

Sasakawa, C. (1997). Early stages of *Shigella* interaction with host cells. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 3(2), 63-72.

Scarselli, M., Giuliani, M. M., Adu-Bobie, J., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2005). The impact of genomics on vaccine design. *Trends in biotechnology*, 23(2), 84-91.

Schembri, M. A., Dalsgaard, D., y Klemm, P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of bacteriology*, 186(5), 1249-1257.

Schmidt, H., y Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 17: 14–56.

Schnupf, P., y Sansonetti, P. J. (2019). *Shigella* pathogenesis: new insights through advanced methodologies. *Bacteria and Intracellularly*, 15-39.

Schroeder, G. N., y Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 134-156.

Sellge, G., Magalhaes, J. G., Konradt, C., Fritz, J. H., Salgado-Pabon, W., Eberl, G., y Phalipon, A. (2010). Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by *Shigella flexneri* mediating protective immunity. *The journal of immunology*, 184(4), 2076-2085.

Singh, S. P., y Mishra, B. N. (2016). Major histocompatibility complex linked databases and prediction tools for designing vaccines. *Human immunology*, 77(3), 295-306.

Soares, R. D. B. A., Gomez, F. J., de Almeida Soares, C. M., & Deepe, G. S. (2008). Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infection and immunity*, 76(9), 4214-4221.

Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., y Rosales-Mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *Journal of biomedical informatics*, 53, 405-414.

Stensrud, K. F., Adam, P. R., La Mar, C. D., Olive, A. J., Lushington, G. H., Sudharsan, R., y Picking, W. D. (2008). Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18646-18654.

Storsaeter, J., Hallander, H. O., Gustafsson, L., y Olin, P. (1998). Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 16(20), 1907-1916.

Studier, F., Moffatt, B. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-30.

Suzue, K., y Young, R. A. (1996). Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24. *The Journal of Immunology*, 156(2), 873-879.

Suzuki, K., Shinzawa, N., Ishigaki, K., Nakamura, K., Abe, H., Fukui-Miyazaki, A., y Horiguchi, Y. (2017). Protective effects of in vivo-expressed autotransporters against *Bordetella pertussis* infection. *Microbiology and immunology*, 61(9), 371-379.

Talukder, K. A., Khajanchi, B. K., Islam, M. A., Dutta, D. K., Islam, Z., Safa, A., y Niyogi, S. K. (2004). Genetic relatedness of ciprofloxacin-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains isolated in south Asia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 730-734.

Talukder, K. A., Khajanchi, B. K., Islam, M. A., Islam, Z., Dutta, D. K., Rahman, M., y Sack, D. A. (2006). Fluoroquinolone Resistance Linked to Both gyrA and parC Mutations in the Quinolone Resistance–Determining Region of *Shigella dysenteriae* Type 1. *Current microbiology*, 52(2), 108-111.

Taneja, N., Mewara, A., Kumar, A., Verma, G., y Sharma, M. (2012). Cephalosporin-resistant *Shigella flexneri* over 9 years (2001–09) in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(6), 1347-1353.

Torchala, M., Moal, I. H., Chaleil, R. A., Fernandez-Recio, J., y Bates, P. A. (2013). SwarmDock: a server for flexible protein–protein docking. *Bioinformatics*, 29(6), 807-809.

Turner, S. A., Luck, S. N., Sakellaris, H., Adler, B., y Rajakumar, K. (2003) Molecular epidemiology of the SRL pathogenicity island. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47: 727-734.

Ud-Din, A., y Wahid, S. (2014). Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1131-1138.

Ulett, G. C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J. M., y Schembri, M. A. (2007). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infection and immunity*, 75(7), 3233-3244.

Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Häcker, H., y Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31332-31339.

Van der Woude, M. W., y Henderson, I. R. (2008). Regulation and function of Ag43 (flu). *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 153-169.



Venkatesan, M. M., & Ranallo, R. T. (2006). Live-attenuated *Shigella* vaccines. *Expert review of vaccines*, 5(5), 669-686.

Vita, R., Zarebski, L., Greenbaum, J. A., Emami, H., Hoof, I., Salimi, N., y Peters, B. (2009). The immune epitope database 2.0. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D854-D862.

Veenendaal, A. K., Hodgkinson, J. L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S. F., y Blocker, A. J. (2007). The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Molecular microbiology*, 63(6), 1719-1730.

Vokes, S. A., Reeves, S. A., Torres, A. G., y Payne, S. M. (1999). The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Molecular microbiology*, 33(1), 63-73.

Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothe, B., Sette, A., y Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS computational biology*, 4(4), e1000048.

Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., Nielsen, M., y Peters, B. (2010). Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC bioinformatics*, 11(1), 568.

Wang, F., Jiang, Z., Li, Y., He, X., Zhao, J., Yang, X., y Liu, W. (2013). *Shigella flexneri* T3SS effector IpaH4. 5 modulates the host inflammatory response via interaction with NF- κ B p65 protein. *Cellular microbiology*, 15(3), 474-485.

Way, S. S., Borczuk, A. C., Dominitz, R., y Goldberg, M. B. (1998). An essential role for gamma interferon in innate resistance to *Shigella flexneri* infection. *Infection and immunity*, 66(4), 1342-1348.

Wei, Y., y Murphy, E. R. (2016). *Shigella* iron acquisition systems and their regulation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6.

Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C., y Schembri, M. A. (2007) Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett*, 274: 163–172.

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W407-W410.

Wilson, C. C., McKinney, D., Anders, M., MaWhinney, S., Forster, J., Crimi, C., y Livingston, B. D. (2003). Development of a DNA vaccine designed to induce cytotoxic T lymphocyte responses to multiple conserved epitopes in HIV-1. *The Journal of Immunology*, 171(10), 5611-5623.

Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., y Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, 339(6121), 826-830.

Xu, D., Zhang, W., Zhang, B., Liao, C., & Shao, Y. (2016). Characterization of a biofilm-forming *Shigella flexneri* phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis. *PeerJ*, 4, e2178.

Yang, J., Zhao, Y., Shi, J., y Shao, F. (2013). Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14408-14413.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., y Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1), 7-8.

Zalewska-Pia, B., Pia, R., Olszewski, M., y Kur, J. (2015). Identification of antigen Ag43 in uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains and defining its role in the pathogenesis of urinary tract infections. *Microbiology*, 161(5), 1034-1049.

Zügel, U., y Kaufmann, S. H. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 19-39.

Zumsteg, A. B., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., y Zychlinsky, A. (2014). IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell host & microbe*, 15(4), 435-445.

