

Índice

1	INTRODUCCIÓN	9
1.1	Bacterias vivas atenuadas	10
1.2	<i>Salmonella</i>	12
1.2.1	Infección por <i>Salmonella</i>	13
1.2.2	Respuesta inmune contra <i>Salmonella</i>	16
1.2.3	<i>Salmonellas</i> atenuadas	17
1.2.4	<i>Salmonella</i> como vector	19
1.2.5	<i>Salmonella</i> como vehículo para vacunas a ADN	20
1.3	Objetivos	21
1.3.1	Uso de <i>Salmonella</i> como vehículo para vacunas a ADN	21
1.3.2	Uso de <i>Salmonella</i> como vector de expresión de antígenos heterólogos	21
2	MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1	Bacterias y plásmidos	22
2.2	Animales	23
2.3	<i>Primers</i> y oligos	23
2.4	Antisueros y conjugados	23
2.5	Análisis y manipulación de ADN	25
2.5.1	Electroforesis en geles de agarosa	25
2.5.2	Amplificación de ADN por PCR	26
2.5.3	Restricción enzimática	26
2.5.4	Reacciones de ligación	26
2.5.5	Preparación y transformación de competentes	26
2.5.6	Electroporación de cepas de <i>Salmonella</i>	27
2.5.7	Clonado de <i>sseA</i>	28
2.5.8	Clonado de <i>egA31</i>	28
2.5.9	Construcción de plásmidos con fragmentos de <i>sseA</i>	29
2.6	Clonado de péptidos de OVA y <i>Listeria</i>	29
2.6.1	Construcción de fusiones a <i>SseA</i>	29
2.6.2	Construcción de fusiones a <i>TetC</i>	30
2.6.3	Construcción de fusiones con efectores del SSTT de SPI2	30
2.7	Análisis de expresión de proteínas	31
2.7.1	Preparación de proteínas de secreción	31
2.7.2	Preparación de lisados bacterianos	31
2.7.3	SDS-PAGE	32
2.7.4	Western Blot	32
2.7.5	Expresión de <i>TetC</i> en células eucariotas	33
2.7.6	Infección de macrófagos peritoneales primarios	33
2.7.7	Inmunohistoquímica	34
2.8	Inmunizaciones y desafío	35
2.8.1	Vacunación con <i>TetC</i>	35
2.8.2	Vacunación con <i>EgA31</i>	35
2.9	ELISA	35

2.9.1	ELISA contra TetC	35
2.9.2	ELISA contra LPS	36
2.9.3	ELISA contra EgA31	36
2.10	Ensayo de presentación antigénica	37
2.10.1	Cultivo de células derivadas de médula ósea	37
2.10.2	Infección de células presentadoras con Salmonella	37
2.10.3	Presentación antigénica	38
2.10.4	Citometría de flujo	38
3	USO DE <i>SALMONELLA</i> COMO VEHÍCULO PARA VACUNAS A ADN	40
3.1	Introducción	40
3.2	Objetivo	41
3.3	Resultados	41
3.3.1	Expresión de TetC en SL3261	42
3.3.2	Expresión de TetC en células eucariotas	42
3.3.3	Determinación in vitro de la transferencia de ADN entre Salmonella y células de mamífero	42
3.3.4	Inducción de anticuerpos específicos por inmunización con Salmonella portando un vector de expresión eucariota	42
3.3.5	Ensayo de protección	44
3.4	Discusión	44
4	USO DE SISTEMAS DE SECRECIÓN TIPO III PARA LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HETERÓLOGOS POR <i>S. Typhimurium</i>	48
4.1	Introducción	48
4.1.1	Islas de patogenicidad	48
4.1.2	Sistemas de secreción tipo III	48
4.1.3	Sistemas de secreción tipo III en Salmonella	49
4.1.3.1	IPS1	49
4.1.3.2	IPS2	50
4.1.3.3	Uso de sistemas de secreción tipo III para la generación de respuestas citotóxicas contra antígenos heterólogos vehiculizados por Salmonella	52
4.2	Objetivo	53
4.3	Resultados	54
4.3.1	Construcción de vectores de expresión de EgA31	54
4.3.1.1	Construcción de pFES1	54
4.3.1.2	Construcción de pFES1-egA31 y pTECH2-egA31	55
4.3.1.3	Construcción de pFES2-EgA31	55
4.3.1.4	Construcción de pFES1/4-egA31 y pFES1/2-egA31	56
4.3.2	Expresión in vitro de EgA31	56
4.3.2.1	Expresión como fusión con TetC	56
4.3.2.2	Expresión como fusión con SseA	57
4.3.2.3	Verificación de la secreción	57
4.3.2.4	Identificación de la señal de secreción	57
4.3.3	Selección de la cepa de vacunación	58
4.3.4	Expresión en macrófagos peritoneales primarios	58
4.3.5	Inmunización de animales con EgA31	58
4.3.6	Construcción de fusiones SseA-OVA y SseA-lis	59
4.3.7	Fusión de péptidos de OVA con efectores pertenecientes al SSTT de SPI2	61
4.3.8	Expresión de péptidos de OVA y Listeria	62

4.3.8.1	Expresión de péptidos de OVA y Listeria como fusiones a SseA	62
4.3.8.2	Expresión de péptidos de OVA como fusiones a SseF y SseG	62
4.3.9	Ensayo de procesamiento antigénico	63
4.4	Discusión	63
5	CONCLUSIONES	69
6	REFERENCIAS	71